

MOLÉCULAS DE UNIÓN A ANTÍGENO QUE COMPRENDEN UN TRÍMERO DE LIGANDO DE LA FAMILIA DE TNF Y UN RESTO DE UNIÓN A PD1

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a nuevas moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de
5 ligando de la familia de TNF que comprenden (a) al menos un resto capaz de unirse
específicamente a PD1 y (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí
mediante un enlace disulfuro, en donde las moléculas de unión a antígeno se caracterizan por
que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de
10 ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí mediante un
enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de
dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo. La invención se
refiere además a métodos para producir estas moléculas y a métodos para usar las mismas.

ANTECEDENTES

Los ligandos que interactúan con moléculas de la superfamilia de receptores de TNF (factor
15 de necrosis tumoral) tienen papeles centrales en la organización y función del sistema
inmunitario. Mientras que regulan las funciones normales, tales como las respuestas
inmunitarias, la hematopoyesis y la morfogénesis, los ligandos de la familia de TNF (también
llamados citocinas) tienen un papel en la tumorigénesis, rechazo de trasplantes, choque
séptico, la replicación viral, la resorción ósea, la artritis reumatoide y la diabetes (Aggarwal,
20 2003). La familia de ligandos de TNF comprende 18 genes que codifican 19 proteínas
transmembrana de tipo II (es decir, extremo N-terminal intracelular y extremo C-terminal
extracelular), caracterizadas por la presencia de un dominio C-terminal conservado acuñado
como el "dominio de homología de TNF" (THD). Este dominio es responsable de la unión a
receptor y por lo tanto es crítico para la actividad biológica de los miembros de la familia de
25 ligandos de TNF. La identidad de secuencia entre miembros de la familia es de ~20–30 %
(Bodmer, 2002). Los miembros de la familia de ligandos de TNF ejercen su función como
trímeros autoensamblantes, no covalentes (Banner et al., Cell 1993, 73, 431-445). Por lo tanto,
los ligandos de la familia de TNF forman un trímero que es capaz de unirse y activar a los
receptores correspondientes de la superfamilia de TNFR.

30 4-1BB (CD137), un miembro de la superfamilia de receptores de TNF, se identificó
originalmente como una molécula cuya expresión esta inducida por la activación de células T
(Kwon y Weissman, 1989). Estudios posteriores demostraron la expresión de 4-1BB en

- linfocitos T y B (Snell et al., 2011; Zhang et al., 2010), células NK (Lin et al., 2008), células NKT (Kim et al., 2008), monocitos (Kienzle y von Kempis, 2000; Schwarz et al., 1995), neutrófilos (Heinisch et al., 2000), mastocitos (Nishimoto et al., 2005) y células dendríticas así como células de origen no hematopoyético, tales como células endoteliales y de músculo liso (Broll et al., 2001; Olofsson et al., 2008). La expresión de 4-1BB en diferentes tipos celulares es en su mayor parte inducible y está impulsada por varios factores estimulantes, tales como la activación del receptor de células T (TCR) o el receptor de células B, así como la señalización inducida a través de moléculas o receptores coestimuladores de citocinas proinflamatorias (Diehl et al., 2002; von Kempis et al., 1997; Zhang et al., 2010).
- 10 La expresión del ligando de 4-1BB (4-1BBL o CD137L) está más restringida y se observa en células presentadoras de antígenos profesionales (APC), tales como células B, células dendríticas (DC) y macrófagos. La expresión inducible de 4-1BBL es característica de las células T, incluyendo los subconjuntos de células T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ y células endoteliales (revisado en Shao y Schwarz, 2011).
- 15 Se sabe que la señalización de CD137 estimula la secreción de IFN γ y la proliferación de células NK (Buechele et al., 2012; Lin et al., 2008; Melero et al., 1998) a la vez que promueve la activación de DC, tal como se indica por el aumento de su supervivencia y capacidad de secretar citocinas y regular positivamente moléculas coestimuladoras (Choi et al., 2009; Futagawa et al., 2002; Wilcox et al., 2002). Sin embargo, CD137 se ha caracterizado mejor
- 20 como una molécula coestimuladora que modula la activación inducida por TCR en los subconjuntos tanto CD4⁺ como CD8⁺ de células T. En combinación con la activación de TCR, los anticuerpos agonistas específicos de 4-1BB potencian la proliferación de células T, estimulan la secreción de linfocitos y reducen la sensibilidad de los linfocitos a la muerte celular inducida por activación (revisado en Snell et al., 2011).
- 25 En línea con estos efectos coestimuladores de los anticuerpos para 4-1BB en las células T *in vitro*, su administración a ratones portadores de tumores da lugar a potentes efectos antitumorales en muchos modelos de tumor experimentales (Melero et al., 1997; Narazaki et al., 2010). Sin embargo, 4-1BB normalmente muestra su potencia como agente antitumoral únicamente cuando se administra en combinación con otros compuestos inmunomoduladores
- 30 (Curran et al., 2011; Guo et al., 2013; Morales-Kastresana et al., 2013; Teng et al., 2009; Wei et al., 2013), reactivos quimioterapéuticos (Ju et al., 2008; Kim et al., 2009), vacunación específica de tumor (Cuadros et al., 2005; Lee et al., 2011) o radioterapia (Shi y Siemann,

2006). Los experimentos de eliminación *in vivo* demostraron que las células T CD8+ desempeñan el papel más importante en el efecto antitumoral de los anticuerpos específicos de 4-1BB. Sin embargo, dependiendo del modelo de tumor o de la terapia combinada, que incluye anti-4-1BB, se han comunicado contribuciones de otros tipos de células, tales como

5 DC, células NK o células T CD4+ (Melero et al., 1997; Murillo et al., 2009; Narazaki et al., 2010; Stagg et al., 2011).

Además de sus efectos directos en diferentes subconjuntos de linfocitos, los agonistas de 4-1BB también pueden inducir la infiltración y la retención de células T activadas en el tumor mediante la regulación positiva mediada por 4-1BB de la molécula 1 de adhesión intercelular

10 (ICAM1) y de la molécula 1 de adhesión de células vasculares (VCAM1) en el endotelio vascular tumoral (Palazon et al., 2011).

La activación de 4-1BB también puede revertir el estado de anergia de las células T inducido por la exposición a antígeno soluble que puede contribuir a la alteración de la tolerancia inmunológica en el microambiente tumoral o durante infecciones crónicas (Wilcox et al.,

15 2004).

Parece ser que las propiedades inmunomoduladoras de los anticuerpos agonistas de 4-1BB *in vivo* requieren de la presencia de la porción Fc de tipo silvestre en la molécula de anticuerpo, implicando de este modo la unión al receptor de Fc como un acontecimiento importante necesario para la actividad farmacológica de dichos reactivos, tal como se ha descrito para

20 anticuerpos agonistas específicos para otros miembros inductores de la apoptosis o inmunomoduladores de la superfamilia de TNFR (Li y Ravetch, 2011; Teng et al., 2009). Sin embargo, la administración sistémica de anticuerpos agonistas específicos de 4-1BB con el dominio Fc funcionalmente activo también induce la expansión de células T CD8+ asociadas con toxicidad hepática (Dubrot et al., 2010) que se reduce o alivia significativamente en

25 ausencia de receptores de Fc funcionales en ratones. En ensayos clínicos en seres humanos (ClinicalTrials.gov, NCT00309023), los anticuerpos agonistas de 4-1BB competentes para Fc (BMS-663513) administrados una vez cada tres semanas durante 12 semanas indujeron la estabilización de la enfermedad en pacientes con melanoma, carcinoma de ovario o de células renales. Sin embargo, el mismo anticuerpo administrado en otro ensayo (NCT00612664)

30 causó hepatitis de grado 4, lo que dio lugar a la finalización del ensayo (Simeone y Ascierto, 2012).

Colectivamente, los datos preclínicos y clínicos disponibles demuestran claramente que existe

una alta necesidad clínica de agonistas de 4-1BB eficaces. Sin embargo, los candidatos farmacológicos de nueva generación no solo deben acoplar eficazmente a 4-1BB sobre la superficie de células hematopoyéticas y endoteliales, sino también ser capaces de lograrlo mediante mecanismos distintos de la unión a receptores de Fc con el fin de evitar efectos secundarios incontrolables. Esto último puede lograrse mediante la unión preferencial a y la oligomerización sobre restos específicos de tumor o asociados a tumores.

Se han producido proteínas de fusión compuestas de un dominio extracelular de un ligando 4-1BB y un fragmento de anticuerpo monocatenario (Mueller et al., 2008; Hornig et al., 2012) o un solo ligando de 4-1BB fusionado al extremo C terminal de una cadena pesada (Zhang et al, 2007). El documento WO 2010/010051 divulga la generación de proteínas de fusión que consisten en tres ectodominios de ligando de TNF unidos entre sí y fusionados a una parte de anticuerpo.

La proteína de muerte programada 1 (PD1 o CD279) es un miembro inhibidor de la familia de receptores de CD28, que también incluye a CD28, CTLA-4, ICOS y BTLA. PD1 es un receptor de la superficie celular y se expresa en células B activadas, en células T y en células mieloides (Okazaki et al (2002) Curr. Opin. Immunol. 14: 391779-82; Bennett et al. (2003) J Immunol 170:711-8). La estructura de PD1 es una proteína transmembrana monomérica de tipo 1, que consiste en un dominio extracelular similar a variable de inmunoglobulina y un dominio citoplásmico que contiene un motivo inhibidor de inmunorreceptor a base de tirosina (ITIM) y un motivo interruptor de inmunorreceptor a base de tirosina (ITSM). Las células T activadas expresan PD1 de manera transitoria, pero la hiperexpresión sostenida de PD1 y su ligando, PDL1 promueven el agotamiento inmunitario, lo que da lugar a la persistencia de las infecciones víricas, la evasión tumoral, el aumento de las infecciones y la mortalidad. La expresión de PD1 está inducida por el reconocimiento del antígeno a través del receptor de células T y su expresión se mantiene principalmente a través de la señalización continua del receptor de células T. Después de una exposición prolongada al antígeno, el locus de PD1 no logra volver a metilarse, lo que promueve una hiperexpresión continua. El bloqueo de la ruta de PD1 puede restaurar la funcionalidad agotada de las células T en el cáncer y las infecciones víricas crónicas (Sheridan, Nature Biotechnology 30 (2012), 729-730). Se han descrito anticuerpos monoclonales para PD1, por ejemplo, en los documentos WO 2003/042402, WO 2004/004771, WO 2004/056875, WO 2004/072286, WO 2004/087196, WO 2006/121168, WO 2006/133396, WO 2007/005874, WO 2008/083174, WO 2008/156712, WO 2009/024531, WO 2009/014708, WO 2009/101611, WO 2009/114335,

WO 2009/154335, WO 2010/027828, WO 2010/027423, WO 2010/029434, WO 2010/029435, WO 2010/036959, WO 2010/063011, WO 2010/089411, WO 2011/066342, WO 2011/110604, WO 2011/110621, WO 2012/145493, WO 2013/014668, WO 2014/179664 y WO 2015/112900. Dos anticuerpos monoclonales para PD1, Opdivo (nivolumab) y Keytruda (pembrolizumab), se comercializan actualmente para el tratamiento de determinados cánceres. Sin embargo, a pesar de convincente actividad antitumoral, se ha observado cada vez con más frecuencia la recidiva del crecimiento tumoral después del bloqueo terapéutico de PD1 (Koyama et al., Nature Communications 2016, DOI: 10.1038/ncomms10501).

- 10 Se ha demostrado que el direccionamiento dual de CD137/PD1 en el microambiente tumoral elimina la supresión local y da lugar al rescate funcional y a la expansión de células T efectoras que posteriormente eliminan células cancerosas (Wei et al., 2014). Se ha demostrado en un modelo de ratón para tumores subcutáneos, que los ratones tratados con una combinación de un anticuerpo anti-4-1BB y un anticuerpo anti-PD1 tuvo la mejor respuesta antitumoral en comparación con ratones tratados solo con uno de los anticuerpos (Shindo et al., 2015). La administración de la combinación de un anticuerpo anti-PD1 y un anticuerpo agonista de 4-1BB en un modelo de tumor de ratón dio lugar a una eficaz respuesta antitumoral sistémica de larga duración, aunque aumentó ligeramente la toxicidad conocida del agonista de 4-1BB administrado individualmente (Chen et al., 2014). Por lo tanto, existe la necesidad de nuevas moléculas que combinen los efectos positivos tanto del anticuerpo anti-PD1 como del anticuerpo para 4-1BB con un perfil de seguridad mejorado.

- Las nuevas moléculas de unión a antígeno de la presente invención combinan un resto de PD1 con un resto que es capaz de formar un trímero de ligando coestimulador de TNF y que sea lo suficientemente estable como para ser farmacéuticamente útil. Sorprendentemente, las moléculas de unión a antígeno de la invención proporcionan un ligando de TNF trimérico y por lo tanto biológicamente activo, aunque uno de los ectodominios de trimerización del ligando de TNF esté ubicado en otro polipéptido distinto de los otros dos ectodominios de ligando de TNF de la molécula. Dirigidas por el resto anti-PD1, las moléculas de unión a antígeno de la presente invención tienen una actividad aumentada en el microambiente tumoral y por lo tanto deben provocar menos problemas de seguridad en comparación con los anticuerpos agonistas de 4-1BB convencionales de manera individual.

SUMARIO DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende

- (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1 y
- 5 (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro, en donde la molécula se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo que está conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende únicamente un ectodominio de dicho
- 10 miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo.

En un aspecto particular, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende

- (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1,
- 15 (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,
- en donde la molécula se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo que está conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende únicamente un ectodominio de dicho miembro de
- 20 la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo, y
- (c) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad capaz de asociarse de manera estable.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, que comprende

- 25 (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1 y
- (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro, en donde la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que
- 30

- (i) el primer polipéptido contiene un dominio CH1 o CL y el segundo polipéptido contiene un dominio CL o CH1, respectivamente, en donde el segundo polipéptido está unido al primer polipéptido mediante un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL y en donde el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al dominio CH1 o CL mediante un enlazador peptídico y en donde el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al dominio CL o CH1 de dicho polipéptido, o
- (ii) el primer polipéptido contiene un dominio CH3 y el segundo polipéptido contiene un dominio CH3, respectivamente, y en donde el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al extremo C-terminal del dominio CH3 mediante un enlazador peptídico y en donde el segundo polipéptido comprende únicamente un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al extremo C-terminal del dominio CH3 de dicho polipéptido, o
- (iii) el primer polipéptido contiene un dominio VH-CL o VL-CH1 y el segundo polipéptido contiene un dominio VL-CH1 o un dominio VH-CL, respectivamente, en donde el segundo polipéptido está unido al primer polipéptido mediante un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL y en donde el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y a VH o VL mediante un enlazador peptídico y en donde el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al VH o VL de dicho polipéptido.

En un aspecto particular, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, que comprende

- (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1 y
- (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,

5 en donde la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que

(i) el primer polipéptido contiene un dominio CH1 o CL y el segundo polipéptido contiene un dominio CL o CH1, respectivamente, en donde el segundo polipéptido está unido al primer polipéptido mediante un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL y en donde el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al dominio CH1 o CL mediante un enlazador peptídico y en donde el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al dominio CL o CH1 de dicho polipéptido, o

10

15

(ii) el primer polipéptido contiene un dominio CH3 y el segundo polipéptido contiene un dominio CH3, respectivamente, y en donde el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al extremo C-terminal del dominio CH3 mediante un enlazador peptídico y en donde el segundo polipéptido comprende únicamente un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al extremo C-terminal del dominio CH3 de dicho polipéptido.

20

25

En un aspecto, el miembro de la familia de ligandos de TNF es uno que coestimula la activación de células T humanas. Por lo tanto, la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF comprende (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana y

30

(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro, en donde la molécula se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y por que el segundo

polipéptido comprende únicamente un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo, en donde el miembro de la familia de ligandos de TNF coestimula la activación de células T humanas. Más en particular, el miembro de la familia de ligandos de TNF se selecciona entre 4-1BBL y OX40L.

- 5 En un aspecto particular, el miembro de la familia de ligandos de TNF es 4-1BBL.

En un aspecto adicional, el ectodominio de un miembro de la familia de ligandos de TNF comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, en particular, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o
 10 SEQ ID NO: 5. Más en particular, el ectodominio de un miembro de la familia de ligandos de TNF comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

En un aspecto adicional, la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención comprende

- 15 (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1 y
 (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro, en donde la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 10
 20 y por que el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

En un aspecto, la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención comprende

- 25 (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1 y
 (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,
 en donde la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y por que
 30 el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

En otro aspecto, la moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF de la invención comprende

- (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1,
- (b) un primer polipéptido que comprende un dominio CH1 o CL y un segundo polipéptido que contiene un dominio CL o CH1, respectivamente, en donde el segundo polipéptido está unido al primer polipéptido mediante un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL, y en donde la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al dominio CH1 o CL mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende únicamente un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al dominio CL o CH1 de dicho polipéptido.

En un aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende

- (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1,
- (b) un primer polipéptido que comprende un dominio CH1 y un segundo polipéptido que contiene un dominio CL, en donde el segundo polipéptido está unido al primer polipéptido mediante un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL, y en donde la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al dominio CH1 mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al dominio CL de dicho polipéptido.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende

- (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1,

- (b) un primer polipéptido que comprende un dominio CL y un segundo polipéptido que contiene un dominio CH1, en donde el segundo polipéptido está unido al primer polipéptido mediante un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL, y en donde la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al dominio CL mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al dominio CH1 de dicho polipéptido.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha definido anteriormente en el presente documento, en donde el resto capaz de unirse específicamente a PD1 se selecciona entre el grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo y una proteína de unión a antígeno de armazón. En particular, el resto capaz de unirse específicamente a PD1 se selecciona entre el grupo que consiste en un fragmento de anticuerpo, una molécula Fab, una molécula Fab sobrecruzada, una molécula Fab monocatenaria, una molécula Fv, una molécula scFv, un anticuerpo de un solo dominio, una VH y una proteína de unión a antígeno de armazón.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha definido anteriormente en el presente documento, en donde el resto capaz de unirse específicamente a PD1 es un fragmento de anticuerpo. En particular, el resto capaz de unirse específicamente a PD1 se selecciona entre el grupo que consiste en una molécula Fab, una molécula Fab sobrecruzada, una molécula Fab monocatenaria, una molécula Fv, una molécula scFv, un anticuerpo de un solo dominio y un VH.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha definido anteriormente en el presente documento, en donde el resto capaz de unirse específicamente a PD1 es una proteína de unión a antígeno de armazón.

En un aspecto particular, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF como se ha definido anteriormente, en

donde el resto capaz de unirse específicamente PD1 es una molécula Fab o una molécula scFv capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana. Más en particular, el resto capaz de unirse específicamente a PD1 es una molécula Fab.

La invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1. En un aspecto particular, la moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF comprende un resto capaz de unirse específicamente a PD1, lo que significa que la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF es monovalente. En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende dos restos capaces de unirse específicamente a PD1, lo que significa que la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF es bivalente.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en donde el resto capaz de unirse específicamente a PD1 comprende

(a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y un dominio VL que comprende (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18,

(b) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 y un dominio VL que comprende (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31,

(c) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de

- aminoácidos de SEQ ID NO: 34, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y un dominio VL que comprende (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39,
- (d) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44 y un dominio VL que comprende (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46 y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47,
- (e) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52 y un dominio VL que comprende (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54 y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55,
- (f) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60 y un dominio VL que comprende (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61 (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63 o
- (g) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68 y un dominio VL que comprende (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69 (v) HVR-L2 que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en donde el resto capaz de unirse

5 específicamente a PD1 comprende

- (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20,
- (b) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22,
- 10 (c) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23,
- (d) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24,
- (e) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25,
- 15 (f) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33,
- (g) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41,
- 20 (h) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49,
- (i) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57,
- (k) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 o
- 25 (l) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en donde el resto capaz de unirse específicamente a PD1 comprende

- 5 (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y un dominio VL que comprende (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y (vi) HVR-L3 que
10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18.

En un aspecto particular, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en donde el resto capaz de unirse específicamente a PD1 comprende

- 15 (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20,
- (b) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22,
20
- (c) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23,
- (d) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 o
25
- (e) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

- 30 En un aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha definido anteriormente en el presente documento, en donde el resto capaz de unirse específicamente a PD1 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una cadena ligera

variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 o en donde el resto capaz de unirse específicamente a PD1 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.

- 5 En un aspecto particular, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF como se ha definido anteriormente, en donde el enlazador peptídico es (G4S)₂, es decir, un enlazador peptídico de SEQ ID NO: 117. En un aspecto, el enlazador peptídico es en todos los casos (G4S)₂.

- 10 La invención se refiere además a una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF como se ha definido anteriormente en el presente documento, que comprende un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad capaces de asociarse de manera estable.

- 15 En un aspecto, la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención que comprende (c) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad capaz de asociarse de manera estable comprende además (a) una molécula Fab capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana, en donde la cadena pesada de Fab está fusionada en el extremo C-terminal al extremo N-terminal de un dominio CH2 en el dominio Fc.

- 20 En un aspecto adicional, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG, en particular de IgG1 o un dominio Fc de IgG4.

- Más en particular, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1. En un aspecto particular, el dominio Fc comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y segunda subunidad del dominio Fc. En un aspecto específico, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en donde la 25 primera subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos S354C y T366W (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y la segunda subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos Y349C, T366S, L368A y Y407V (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

- 30 En otro aspecto, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF como se ha definido anteriormente en el presente documento, que comprende

(c) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad capaces de asociarse de manera estable, en donde el dominio Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos que reduce la unión a un receptor de Fc, en particular hacia un receptor Fcγ.

En particular, el dominio Fc comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones 234 y
 5 235 (numeración EU) y/o 329 (numeración EU) de las cadenas pesadas de IgG. Más en particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene ligando trimérico de la familia de TNF de acuerdo con la invención que comprende un dominio Fc de IgG1 que comprende las sustituciones de aminoácidos en las posiciones 234 y 235 (numeración EU) y/o 329 (numeración EU), en particular, las sustituciones de aminoácidos L234A, L235A y
 10 P329G (numeración EU).

En un aspecto adicional, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en donde la molécula de unión a antígeno comprende una primera cadena pesada y una primera cadena ligera, comprendiendo ambas una molécula
 15 Fab capaz de unirse específicamente a PD1, un primer péptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos de los mismos conectados entre sí mediante un primer enlazador peptídico fusionado en su extremo C-terminal mediante un segundo enlazador peptídico a una segunda cadena pesada o ligera, y un segundo péptido que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de
 20 ligandos de TNF fusionado en su extremo C-terminal mediante un tercer enlazador peptídico a una segunda cadena ligera o pesada, respectivamente.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en donde el primer péptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo conectados entre sí
 25 mediante un primer enlazador peptídico está fusionado en su extremo C-terminal mediante un segundo enlazador peptídico a un dominio CH1 que forma parte de una cadena pesada, y el segundo péptido que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo está fusionado en su extremo C-terminal mediante un tercer enlazador peptídico a un dominio CL que forma parte de una cadena ligera.

30 En otro aspecto más, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en donde el primer péptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo conectados entre sí

mediante un primer enlazador peptídico está fusionado en su extremo C-terminal mediante un segundo enlazador peptídico a un dominio CL que forma parte de una cadena pesada, y el segundo péptido que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo está fusionado en su extremo C-terminal
 5 mediante un tercer enlazador peptídico a un dominio CH1 que forma parte de una cadena ligera.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en donde el primer péptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo
 10 conectados entre sí mediante un primer enlazador peptídico está fusionado en su extremo C-terminal mediante un segundo enlazador peptídico a un dominio VH que forma parte de una cadena pesada,
 y el segundo péptido que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo está fusionado en su extremo C-terminal
 15 mediante un tercer enlazador peptídico a un dominio VL que forma parte de una cadena ligera.

En un aspecto particular, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF como se ha definido anteriormente, en donde el enlazador peptídico es (G4S)₂, es decir, un enlazador peptídico de SEQ ID NO: 117. En un aspecto, el primero, el segundo y el tercer enlazador peptídico son (G4S)₂.

20 Además, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en donde en el dominio CL adyacente al miembro de la familia de ligandos de TNF el aminoácido en la posición 123 (numeración EU) se ha reemplazado por arginina (R) y el aminoácido en la posición 124 (numeración EU) se ha sustituido por lisina (K) y en donde en el dominio CH1 adyacente al miembro de la familia de ligandos de TNF, los
 25 aminoácidos en la posición 147 (numeración EU) y en la posición 213 (numeración EU) se han sustituido por ácido glutámico (E).

En un aspecto adicional, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, en donde la molécula de unión a antígeno comprende

30 (a) una primera cadena pesada y una primera cadena ligera, comprendiendo ambas una molécula Fab capaz de unirse específicamente a PD1,

- (b) una segunda cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 10 y una segunda cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en donde la molécula de unión a antígeno comprende

- (a) una molécula Fab capaz de unirse específicamente a PD1, y
- (b) una segunda cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 10 y una segunda cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

En un aspecto particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en donde la molécula de unión a antígeno comprende

- (i) una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 o una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25,
- (ii) una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78 y SEQ ID NO: 80 y

- (iii) una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79 y SEQ ID NO: 81.

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene
5 trímero de ligando de la familia de TNF, en la que la molécula de unión a antígeno comprende

- (a) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83 o SEQ ID NO: 171, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74 y una segunda cadena ligera que
10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75,
- (b) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83 o SEQ ID NO: 171, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76 y una segunda cadena ligera que
15 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77,
- (c) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83 o SEQ ID NO: 171, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78 y una segunda cadena ligera que
20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, o
- (d) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83 o SEQ ID NO: 171, una segunda cadena pesada que comprende
25 la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 81.

En otro aspecto más, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, que comprende

- (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1 y
30
- (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace

disulfuro, en donde la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido contiene un dominio CH3 y el segundo polipéptido contiene un dominio CH3, respectivamente, y en donde el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al extremo C-terminal del dominio CH3 mediante un enlazador peptídico y en donde el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al extremo C-terminal del dominio CH3 de dicho polipéptido.

10 En particular, dicha molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF comprende dos dominios Fab capaces de unirse específicamente a PD1.

En particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF como se ha descrito anteriormente en el presente documento que comprende

15 (a) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85, y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83 o SEQ ID NO: 171 o

20 (b) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87 y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83 o SEQ ID NO: 171.

En otro aspecto particular, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que
25 contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, en donde la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF comprende un dominio Fab capaz de unirse específicamente a PD1.

En dicho aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de
30 ligando de la familia de TNF, en donde la molécula de unión a antígeno comprende

- 5 (i) un polipéptido de fusión que comprende una primera subunidad de un dominio Fc y dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al extremo C-terminal del dominio CH3 mediante un enlazador peptídico, (ii) una cadena pesada que comprende el dominio VH del dominio Fab capaz de unirse específicamente a PD1, una segunda subunidad del dominio Fc y un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado mediante un enlazador peptídico al extremo C-terminal del dominio CH3 y (iii) una cadena ligera que comprende el dominio VL del dominio Fab
- 10 capaz de unirse específicamente a PD1, o
- 15 (i) un polipéptido de fusión que comprende una primera subunidad de un dominio Fc y un ectodominio de un miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo que está conectado al extremo C-terminal del dominio CH3 mediante un enlazador peptídico, (ii) una cadena pesada que comprende el dominio VH del dominio Fab capaz de unirse específicamente a PD1, una segunda subunidad del dominio Fc y dos ectodominios de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al extremo C-terminal del dominio CH3 mediante un enlazador peptídico,
- 20 y (iii) una cadena ligera que comprende el dominio VL del dominio Fab capaz de unirse específicamente a PD1.

En un aspecto particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en donde la molécula de unión a antígeno comprende

- 25 (a) un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 88, una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83 o SEQ ID NO: 171,
- 30 (b) un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89, una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83 o SEQ ID NO: 171,

- (c) un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91, una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83 o SEQ ID NO: 171,
- 5 (b) un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93, una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 92 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83 o SEQ ID NO: 171.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un polinucleótido aislado que
10 codifica una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento. La invención proporciona además un vector, particularmente un vector de expresión, que comprende el polinucleótido aislado de la invención y una célula hospedadora que comprende al polinucleótido aislado o el vector de la invención. En algunas realizaciones, la célula
15 hospedadora es una célula eucariota, en particular, una célula de mamífero.

En otro aspecto, se proporciona un método para producir una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención, que comprende cultivar la célula hospedadora de la invención en condiciones adecuadas para la expresión de la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF y aislar la
20 molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF. La invención también abarca una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF producida mediante el método de la invención.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención y al
25 menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

También se encuentra abarcada por la invención la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención o la composición farmacéutica de la invención, para su uso como medicamento. En un aspecto, se proporciona la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención o la
30 composición farmacéutica de la invención, para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite. En una realización específica, se proporciona la molécula de

unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención o la composición farmacéutica de la invención, para su uso en el tratamiento del cáncer. En otro aspecto, se proporciona la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención o la composición farmacéutica de la invención, para su uso en la regulación positiva o la prolongación de la actividad de células T citotóxicas.

También se proporciona el uso de la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite, en particular para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, así como un método para tratar una enfermedad en un individuo, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención en una forma farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, la enfermedad es cáncer. También se proporciona un método para regular positivamente o prolongar la actividad de células T citotóxicas en un individuo que tenga cáncer, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención o la composición farmacéutica de la invención. En cualquiera de las realizaciones anteriores, el individuo es preferentemente un mamífero, en particular, un ser humano.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra que el bloqueo de PD1 con el clon de anticuerpo quimérico PD1-0103 potencia fuertemente la secreción de IFN por células T humanas primarias alogénicas estimuladas. La secreción de IFN gamma es mayor en comparación con los anticuerpos de referencia MDX5C4 o MK-3475.

25 En **la figura 2** se muestra que el bloqueo de los clones humanizados de PD1, PD1-0103-0312 y PD1-103-314 aumenta incluso con más fuerza la secreción de interferón gamma (IFN-g) por células T humanas primarias alogénicas estimuladas en comparación con el clon quimérico, PD1-0103.

30 **La figura 3** demuestra que el bloqueo de PD1 con el clon de anticuerpo quimérico PD1-0103 y los clones humanizados, PD1-0103-0312 y PD1-103-314, aumenta fuertemente la secreción del factor de necrosis tumoral (TNF) alfa por células T humanas primarias alogénicas

estimuladas. La secreción de TNF-alfa es mayor en comparación con los anticuerpos de referencia MDX5C4 o MK-3475.

La **figura 4A** muestra la frecuencia de células T CD4⁺ productoras de Granzima B en presencia de concentraciones crecientes de diferentes anticuerpos anti-PD1 (clon de anticuerpo quimérico PD1-0103 y los clones humanizados, PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314, PD1-0103-0315) y la **figura 4B** muestra la cantidad de IFN-γ detectado por absorbancia (Densidad Óptica, D.O.) en el sobrenadante del MLR en presencia de concentraciones crecientes de diferentes anticuerpos anti-PD1.

En la **figura 5A** se muestra el impacto del bloqueo de PD1/PD-L1 en la reactivación de la señalización del receptor de células T suprimido en presencia del clon de anticuerpo quimérico anti-PD1, PD1-0103 en comparación con solo PDL1 y en la **figura 5B** se presenta el impacto del bloqueo de PD1/PD-L1 en la reactivación de la señalización del receptor de células T suprimido en presencia de diferentes anticuerpos anti-PD1 (clon de anticuerpo quimérico PD1-0103 y los clones humanizados, PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314, PD1-0103-0315).

La **figura 6** muestra los componentes para el conjunto trimérico separado de ligando 4-1BB humano. La **figura 6A** muestra el ligando dimérico 4-1BB(71-254) que está fusionado en el extremo C-terminal a un dominio CL humano con las mutaciones E123R y Q124K (variante cargada) y la **figura 6B** muestra el ligando monomérico 4-1BB(71-254) fusionado en su extremo C-terminal al dominio CH1 humano con las mutaciones K147E y K213E (variante cargada). La **figura 6C** muestra el ligando dimérico 4-1BB(71-254) que está fusionado en el extremo C-terminal a un dominio CL humano sin las mutaciones y la **figura 6D** muestra el ligando monomérico 4-1BB(71-254) fusionado en su extremo C-terminal al dominio CH1 humano sin las mutaciones. La **figura 6E** muestra el ligando dimérico 4-1BB(71-254) que está fusionado en el extremo N-terminal a un dominio Fc agujero de IgG1 humano y la **figura 6F** muestra el ligando monomérico 4-1BB(71-254) fusionado en el extremo N-terminal a un dominio Fc pomo de IgG1.

La **figura 7** ilustra esquemáticamente las estructuras de las construcciones de moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de 4-1BBL 7.1 a 7.6 de la invención. La preparación y producción de estas construcciones se describe en el ejemplo 2. Los dominios VH y VL son aquellos del anticuerpo anti-PD1 (en particular, 0103-0314), el punto negro grueso representa la modificación de pomo en agujero. * simboliza modificaciones de aminoácidos en el

dominio CH1 y CL (la denominada variante cargada). **La figura 7A** muestra la construcción 7.1 con variantes cargadas y 4-1BBL hu (71-254), en la **figura 7B** se muestra una construcción correspondiente sin variantes cargadas. La construcción 7.4, tal como se muestra en la **figura 7D**, comprende tres 4-1BBL hu (71-248) y variantes cargadas, en la **figura 7E** se ilustra la construcción correspondiente sin variantes cargadas. **La figura 7C** muestra una construcción bivalente con 4-1BBL hu (71-254) en los extremos C-terminales de las cadenas Fc y en la **figura 7F** se muestra una construcción correspondiente con 4-1BBL hu (71-248).

La figura 8 muestra los componentes para el conjunto trimérico separado de ligando 4-1BB humano. **La figura 8A** muestra el ligando dimérico 4-1BB(71-248) que está fusionado en el extremo C-terminal a un dominio CL humano con las mutaciones E123R y Q124K (variante cargada) y **la figura 8B** muestra el ligando monomérico 4-1BB(71-248) fusionado en su extremo C-terminal al dominio CH1 humano con las mutaciones K147E y K213E (variante cargada). **La figura 8C** muestra el ligando dimérico 4-1BB(71-248) que está fusionado en el extremo C-terminal a un dominio CL humano sin las mutaciones y **la figura 8D** muestra el ligando monomérico 4-1BB(71-248) fusionado en su extremo C-terminal al dominio CH1 humano sin las mutaciones. **La figura 8E** muestra el ligando dimérico 4-1BB(71-248) que está fusionado en el extremo N-terminal a un dominio Fc agujero de IgG1 humano y la **figura 8F** muestra el ligando monomérico 4-1BB(71-248) fusionado en el extremo N-terminal a un dominio Fc pomo de IgG1.

La figura 9 muestra los componentes para el conjunto trimérico separado de ligando 4-1BB humano, en donde cada uno del ligando 4-1BB dimérico y el ligando 4-1BB monomérico está fusionado en su extremo N-terminal a otra cadena de polipéptido, en particular una de las subunidades de un dominio Fc. **La figura 9A** muestra el ligando dimérico que está fusionado en el extremo N-terminal y **la figura 9B** muestra el ligando monomérico fusionado en el extremo N-terminal. En **la figura 9C** y **la figura 9D** se muestran dibujos esquemáticos de las construcciones de moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de 4-1BBL, 7.11 y 7.12, respectivamente. En la figura 9C se muestra una molécula de unión a antígeno, en donde el dominio Fab capaz de unirse específicamente a PD1 está unido a la cadena Fc pomo, el 4-1BBL dimérico está fusionado al extremo C-terminal de la cadena Fc agujero y el 4-1BBL monomérico está fusionado al extremo C-terminal de la cadena Fc pomo. La figura 9D muestra una molécula de unión a antígeno, en donde el dominio Fab capaz de unirse específicamente a PD1 está unido a la cadena Fc pomo, el 4-1BBL dimérico también está fusionado al extremo C-terminal de la cadena Fc pomo y el 4-1BBL monomérico está

fusionado al extremo C-terminal de la cadena Fc agujero.

En la **figura 10A** y la **figura 10B** se muestran dibujos esquemáticos de las construcciones 7.13 y 7.14, respectivamente. En la figura 10A se muestra una molécula de unión a antígeno, en donde el dominio Fab capaz de unirse específicamente a PD1 está unido a la cadena Fc agujero, el 4-1BBL dimérico está fusionado al extremo C-terminal de la cadena Fc agujero y el 4-1BBL monomérico está fusionado al extremo C-terminal de la cadena Fc pomo. En la figura 10B se muestra una molécula de unión a antígeno, en donde el dominio Fab capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana está unido a la cadena Fc agujero, el 4-1BBL dimérico también está fusionado al extremo C-terminal de la cadena Fc pomo y el 4-1BBL monomérico está fusionado al extremo C-terminal de la cadena Fc agujero.

En las **figuras 11A a 11D** se muestran dibujos esquemáticos de las moléculas de control. La **figura 11A** y la **figura 11B** muestran las variantes “no dirigidas” de las construcciones 7.1 y 7.3, respectivamente, en donde los dominios Fab de anti-PD1 están reemplazados por un dominio Fab de DP47 (línea germinal). Las moléculas se denominan control B y control C, respectivamente. La **figura 11C** muestra la variante no dirigida de la construcción 7.4, denominada control D. La preparación de las moléculas de control se describe en el ejemplo 2.9. La **figura 11D** es un dibujo de moléculas IgG1 monoespecíficas con las mutaciones PGLALA, en donde los dominios Fab son dominios Fab de DP47 (control F) o dominios Fab de PD1 0103-0314 (control M). Estas moléculas se describen en el ejemplo 2.10.

La **figura 12A** muestra la configuración de los experimentos de SPR para la unión simultánea de las moléculas de unión a antígeno que contienen ligando 4-1BB C-terminal trimérico separadas dirigidas a PD1 de la invención. La unión simultánea a 4-1BB humano y a PD1 humano de la construcción 7.1 de molécula de unión a antígeno de Fc kih de 4-1BBL (71-254) dividido dirigida a PD1(0314) se muestra en la **figura 12B**. La unión simultánea a 4-1BB humano y a PD1 humano de la molécula de unión a antígeno bivalente de Fc kih de 4-1BBL (71-254) dividido dirigida a PD1(0314) (construcción 7.3) se muestra en la **figura 12C**. La unión simultánea a 4-1BB humano y a PD1 humano de la molécula de unión a antígeno bivalente de Fc kih de 4-1BBL (71-248) dividido dirigida a PD1(0314) (construcción 7.5) se muestra en la **figura 12D** y la unión simultánea a 4-1BB humano y a PD1 humano de la molécula de unión a antígeno bivalente de Fc kih de 4-1BBL (71-248) dividido dirigida a PD1(0314) (construcción 7.6) se muestra en la **figura 12E**.

Las **figuras 13A a 13H** muestran la unión de las moléculas de unión a antígeno de fusión de

Fc de ligando trimérico dividido de 4-1BB dirigidas a PD1 a PBMC aisladas recientes, tal como se describe en el ejemplo 5.1. Se muestra la media geométrica de la intensidad de fluorescencia de un anticuerpo de detección secundario conjugado a PE (eje y) frente a la concentración de las construcciones probadas (eje x). Para una mejor visión general, las gráficas se dividieron en dos, figura (13A), (13B), (13C) y (13D) y figura (13E), (13F), (13G) y (13H), respectivamente, mostrándose las curvas para el control F y el control M en todas las gráficas como referencias. La unión se monitorizó en células T CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺ humanas recientes (figuras (13A) y (13E)), células T CD45⁺ CD3⁺ CD8⁺ humanas recientes (figuras (13B) y (13F)), células T CD45⁺ CD3⁺ CD4^{neg} CD8^{neg} $\gamma\delta$ humanas recientes (figuras (13C) y (13G)) y células B CD45⁺ CD3^{neg} CD19⁺ (figuras (13D) y (13H)).

Las figuras 14A a 14H ilustran la unión de las moléculas de unión a antígeno de fusión Fc de ligando 4-1BB trimérico dividido dirigidas a PD1 a PBMC humanas activadas, que se probó como se describe en el ejemplo 5.1. Se muestra la media geométrica de la intensidad de fluorescencia de anticuerpo de detección secundario conjugado a PE (eje y) frente a la concentración de las construcciones probadas (eje x). Como control negativo, se usó el control F. Para una mejor visión general, las gráficas se dividieron en dos, es decir, en las figuras (14A), (14B), (14C) y (14D) y en las figuras (14E), (14F), (14G) y (14H) mostrándose las curvas del control F y el control M en todas las gráficas como referencias. Después de la activación con anticuerpo agonista anti-CD28 humano y anti-CD3 humano, se regula positivamente la expresión de 4-1BB en la mayoría de las células T CD45⁺ CD3⁺ CD8⁺ (véanse las figuras (14A) o (14E)) o las células T CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺ (véanse las figuras (14B) y (14F)) y en menor medida con la mayoría de las células T CD45⁺ CD3⁺ CD4^{neg} CD8^{neg} $\gamma\delta$ (figuras (14C) o (14G)) o las células B CD45⁺ CD3^{neg} CD19⁺ (figuras (14D) o (14H)).

Las figuras 15A y 15B muestran la unión de las moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando 4-1BB humano trimérico dividido dirigidas o no dirigidas a PD1 a células del clon 5 de CHO-k1-huPD1 que expresan PD1 humano. El método se describe en el ejemplo 5.2. La unión se detectó con fragmento F(ab')₂ de IgG de cabra específico para Fc γ anti-IgG humana conjugado a R-ficoeritrina-fluorocromo y la media geométrica medida mediante citometría de flujo se muestra en el eje y. En el eje x se muestran la concentración de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc de ligando trimérico dividido de 4-1BB dirigidas a PD1 y sus controles. Para una mejor visión general, las gráficas se dividieron en dos (figura (15A) y figura (15B)), mostrándose las curvas para el control F y el control M en ambas como referencia.

Las figuras 16A y 16B muestran la unión de las moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando 4-1BB humano trimérico dividido dirigidas o no dirigidas a 4-1BB a células del clon 26 de HeLa-hu4-1BBL-NFκB-luc que expresan 4-1BB humano, probada del modo descrito en el ejemplo 5.2. La unión se detectó con fragmento F(ab')₂ de IgG de cabra específico para Fcγ anti-IgG humana conjugado a R-ficoeritrina-fluorocromo y la media geométrica medida mediante citometría de flujo se muestra en el eje y. En el eje x se muestran la concentración de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc de ligando trimérico dividido de 4-1BB dirigidas a PD1 y sus controles. Para una mejor visión general, las gráficas se dividieron en dos, denominadas figuras (16A) y (16B), mostrándose las curvas del control F y el control M en ambas gráficas como referencias.

La figura 17 muestra un esquema que ilustra los principios generales del ensayo de actividad de NFκB descrito en el ejemplo 6 usando una línea celular indicadora. Se muestra la configuración del ensayo de activación con la línea celular indicadora HeLa que expresa 4-1BB. Un sobrecruzamiento de 4-1BB expresado sobre las células indicadoras induce la activación de NFκB y la expresión de luciferasa mediada por NFκB. Después de la lisis de las células, la luciferasa puede catalizar la oxidación de la luciferina a oxiluciferina. Esta reacción química se correlaciona positivamente con la fuerza de la expresión de luciferasa mediada por NFκB y puede medirse mediante la fuerza de la emisión de luz (unidades de luz liberada).

Las figuras 18A a 18D muestran la expresión y actividad de luciferasa inducida por la activación de NFκB medida con el ensayo descrito en el ejemplo 6. Las unidades de luz liberada (ULL) se miden durante 0,5 s/pocillo y se representan frente a la concentración usada de construcciones de ligando Fc (kih) de 4-1BB humano trimérico dividido dirigidas y no dirigidas a PD1. Se incubaron células indicadoras HeLa que expresan 4-1BB durante 6 h en ausencia (figuras (18A) y (18D)) o en presencia de células del clon 5 de CHO-k1-huPD1 que expresan PD-1 sobrecruzantes (figura (18C) y (18D)). En cada gráfico se indica la proporción celular de las células HeLa que expresan 4-1BB humano a células del clon 5 de CHO-k1-huPD1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

A menos que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado al que se usa generalmente en la técnica a la que

pertenece la presente invención. Con el fin de interpretar la presente memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones y siempre que sea adecuado, los términos usados en singular también incluirán el plural y *vice versa*.

5 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "**molécula de unión a antígeno**" se refiere en su sentido más amplio a una molécula que se une específicamente a un determinante antigénico. Los ejemplos de moléculas de unión a antígeno anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y proteínas de unión a antígeno de armazón.

10 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "**resto capaz de unirse específicamente a PD1**" o "dominio de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a PD1" se refiere a una molécula de polipéptido que se une específicamente a PD1. En un aspecto, el resto de unión a antígeno es capaz de activar la señalización a través de PD1. En un aspecto particular, el resto de unión a antígeno es capaz de dirigir la entidad a la que está unido (por ejemplo, el trímero de ligando de la familia de TNF) a un sitio diana, por ejemplo, a un tipo específico de célula tumoral que porta PD1 o a células T que portan PD1. Los restos
15 capaces de unirse específicamente a PD1 incluyen anticuerpos y fragmentos de los mismos, tal como se define adicionalmente en el presente documento. Además, los restos capaces de unirse específicamente a un antígeno de célula diana incluyen proteínas de unión a antígeno de armazón tal como se definen adicionalmente en el presente documento, por ejemplo, dominios de unión que se basan en las proteínas de repetición diseñadas en los dominios de
20 repetición diseñados (véase, por ejemplo, el documento WO 2002/020565).

En relación a un anticuerpo o a un fragmento del mismo, la expresión "resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana" se refiere a la parte de la molécula que comprende el área a la que se une específicamente y es complementario a la totalidad o a parte de un antígeno. Puede proporcionarse un resto capaz de unirse específicamente a un
25 antígeno, por ejemplo, mediante uno o más dominios variables de anticuerpo (también denominados regiones variables de anticuerpo). En particular, un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno comprende una región variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) y una región variable de cadena pesada de anticuerpo (VH).

El término "**anticuerpo**" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y abarca
30 diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoespecíficos y multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, en tanto que muestren la actividad de

unión a antígeno deseada.

La expresión "**anticuerpo monoclonal**", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son
5 idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto para posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones de origen natural o que aparecen durante la producción de una preparación de anticuerpo monoclonal, estando dichas variantes presentes generalmente en cantidades menores. A diferencia de preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes
10 (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un solo determinante o antígeno.

La expresión anticuerpo "**monoespecífico**", tal como se usa en el presente documento indica un anticuerpo que tiene uno o más sitios cada uno que se unen al mismo epítipo del mismo antígeno. El término "**biespecífico**" significa que la molécula de unión a antígeno es capaz de
15 unirse específicamente a al menos dos determinantes antigénicos distintos. Típicamente, una molécula de unión a antígeno biespecífica comprende dos sitios de unión a antígeno, cada uno de los cuales es específico para un determinante antigénico diferente. En determinadas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica es capaz de unirse simultáneamente a dos determinantes antigénicos, particularmente a dos determinantes
20 antigénicos expresados en dos células distintas.

El término "**valente**", tal como se usa dentro de la presente solicitud indica la presencia de un número especificado de sitios de unión en una molécula de unión a antígeno. Como tales, los términos "bivalente", "tetraivalente" y "hexivalente" indican la presencia de dos sitios de
unión, cuatro sitios de unión y seis sitios de unión, respectivamente, en una molécula de unión
25 a antígeno.

Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo nativa. Los "**anticuerpos nativos**" se refieren a moléculas de inmunoglobulina de origen
30 natural con estructuras variantes. Por ejemplo, los anticuerpos de clase IgG nativos son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Dalton, compuestas de dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que están unidas por enlaces disulfuro. De extremo N a

C-terminal, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también denominada dominio pesado variable o dominio variable de cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3), también denominada región constante de cadena pesada. De manera similar, de N- a C-terminal, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también denominado dominio variable ligero o dominio variable de cadena ligera, seguido de un dominio constante de cadena ligera (CL), también llamado región constante de cadena ligera. La cadena pesada de un anticuerpo puede asignarse a uno de cinco tipos, denominados α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) o μ (IgM), algunos de los cuales pueden dividirse además en subtipos, por ejemplo, $\gamma 1$ (IgG1), $\gamma 2$ (IgG2), $\gamma 3$ (IgG3), $\gamma 4$ (IgG4), $\alpha 1$ (IgA1) y $\alpha 2$ (IgA2). La cadena ligera de un anticuerpo puede asignarse a uno de dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

Un "**fragmento de anticuerpo**" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación a Fv, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, fragmentos cross-Fab; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias (por ejemplo, scFv); y anticuerpos de un solo dominio. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003). Para una revisión de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Plückthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994); véase también el documento WO 93/16185; y las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.571.894 y 5.587.458. Para la discusión de fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden restos de epítipo de unión a receptor salvajes y que tienen semivida *in vivo* aumentada, véase la Patente de los Estados Unidos n.º 5.869.046. Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos, véase, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003); y Hollinger et al., Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003). Los anticuerpos de un solo dominio son fragmentos de anticuerpos que comprenden todo o una porción del dominio variable de cadena pesada o todo o una porción del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo. En determinadas realizaciones, un anticuerpo de un solo dominio es un anticuerpo de un solo dominio humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 6.248.516 B1). Pueden producirse fragmentos de anticuerpo mediante varias técnicas, incluyendo, pero sin limitación, digestión

proteolítica de un anticuerpo intacto así como la producción por células hospedadoras recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), tal como se describe en el presente documento.

La digestión con papaína de anticuerpos intactos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", que contienen cada uno los dominios variables de cadena pesada y ligera y también el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Tal como se usa en el presente documento, Por lo tanto, la expresión "**fragmento Fab**" se refiere a un fragmento de anticuerpo que comprende un fragmento de cadena ligera que comprende un dominio VL y un dominio constante de una cadena ligera (CL) y un dominio VH y un primer dominio constante de una cadena pesada (CH1). Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Los Fab'-SH son fragmentos Fab' en los que los restos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. El tratamiento con pepsina proporciona un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación con antígeno (dos fragmentos Fab) y una parte de la región Fc.

La expresión "fragmento cross-Fab" o "fragmento xFab" o "fragmento Fab sobrecruzado" se refiere a un fragmento Fab, en donde las regiones variables o las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera están intercambiadas. Son posibles dos composiciones de cadena diferentes de una molécula Fab sobrecruzada y están comprendidas en los anticuerpos biespecíficos de la invención: Por una parte, las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del Fab están intercambiadas, es decir, la molécula Fab sobrecruzada comprende una cadena peptídica compuesta de la región variable de cadena ligera (VL) y la región constante de cadena pesada (CH1) y una cadena peptídica compuesta de la región variable de cadena pesada (VH) y la región constante de cadena ligera (CL). Esta molécula Fab sobrecruzada se cita también como CrossFab_(VLVH). Por otra parte, cuando están intercambiadas las regiones constantes de las cadenas ligera y pesada del Fab, la molécula Fab sobrecruzada comprende una cadena peptídica compuesta de la región variable de cadena pesada (VH) y la región constante de cadena ligera (CL) y una cadena peptídica compuesta de la región variable de cadena ligera (VL) y la región constante de cadena pesada (CH1). Esta molécula Fab sobrecruzada se cita también como CrossFab_(CLCH1).

Un "fragmento Fab monocatenario" o "**scFab**" es un polipéptido que consiste en un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (VH), un dominio constante 1 de anticuerpo (CH1), un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo (VL), un dominio constante de cadena

ligera de anticuerpo (CL) y un enlazador, en donde dichos dominios de anticuerpo y dicho enlazador tienen uno de los siguientes órdenes en dirección de N-terminal a C-terminal: a) VH-CH1-enlazador-VL-CL, b) VL-CL-enlazador-VH-CH1, c) VH-CL-enlazador-VL-CH1 o d) VL-CH1-enlazador-VH-CL; y en donde dicho enlazador es un polipéptido de al menos 30 aminoácidos, preferentemente de entre 32 y 50 aminoácidos. Dichos fragmentos Fab monocatenarios se estabilizan a través del enlace disulfuro natural entre el dominio CL y el dominio CH1. Además, estas moléculas Fab monocatenarias pueden estabilizarse adicionalmente mediante la generación de enlaces disulfuro intercadena insertando restos de cisteína (por ejemplo, en la posición 44 en la cadena pesada variable y en la posición 100 en la cadena ligera variable de acuerdo con la numeración de Kabat).

Un "fragmento Fab monocatenario sobrecruzado" o "**x-scFab**" es como tal un polipéptido que consiste en un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (VH), un dominio constante 1 de anticuerpo (CH1), un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo (VL), un dominio constante de cadena ligera de anticuerpo (CL) y un enlazador, en donde dichos dominios de anticuerpo y dicho enlazador tienen uno de los siguientes órdenes en dirección de N-terminal a C-terminal: a) VH-CL-enlazador-VL-CH1 y b) VL-CH1-enlazador-VH-CL; en donde el VH y el VL forman juntos un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno y en donde dicho enlazador es un polipéptido de al menos 30 aminoácidos. Además, estas moléculas x-scFab pueden estabilizarse adicionalmente mediante la generación de enlaces disulfuro intercadena insertando restos de cisteína (por ejemplo, en la posición 44 en la cadena pesada variable y en la posición 100 en la cadena ligera variable de acuerdo con la numeración de Kabat).

Un "**fragmento variable monocatenario (scFv)**" es una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesada (V_H) y ligera (V_L) de un anticuerpo, conectadas con un péptido enlazador corto de diez a aproximadamente 25 aminoácidos. El enlazador es normalmente rico en glicina para su flexibilidad, así como en serina o treonina para su solubilidad y pueden conectar bien el extremo N-terminal de la V_H con el extremo C-terminal de la V_L o *vice versa*. Esta proteína retiene la especificidad del anticuerpo original, a pesar de la eliminación de las regiones constantes y de la introducción del enlazador. Los anticuerpos scFv, por ejemplo, se describen en Houston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-96). Además, los fragmentos de anticuerpo comprenden polipéptidos monocatenarios que tienen las características de un dominio VH, es decir, son capaces de ensamblarse junto con un dominio VL o las de un dominio VL, es decir, son capaces de ensamblarse junto con un

dominio VH a un sitio de unión a antígeno funcional y de este modo proporcionar la propiedad de unión a antígeno de los anticuerpos de longitud completa.

- Las "**proteínas de unión a antígeno de armazón**" se conocen en la técnica, por ejemplo, se han usado fibronectina y proteínas de repetición de anquirina diseñadas (DARPin) como
- 5 estructuras alternativas para dominios de unión a antígeno, véase, por ejemplo, Gebauer y Skerra, Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. Curr Opin Chem Biol 13:245-255 (2009) y Stumpp et al., Darpins: A new generation of protein therapeutics. Drug Discovery Today 13: 695-701 (2008). En un aspecto de la invención, una proteína de unión a antígeno de armazón se selecciona entre el grupo que consiste en CTLA-4
- 10 (Evibody), lipocalinas (anticalina), una molécula derivada de proteína A, tal como el dominio Z de la proteína A (Affibody), un dominio A (Avimer/Maxibody), una transferrina sérica (*trans*-body); una proteína de repetición de anquirina diseñada (DARPin), un dominio variable de cadena ligera o de cadena pesada de anticuerpo (anticuerpo de un solo dominio, sdAb), un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (nanocuerpo, aVH), fragmentos
- 15 V_{NAR} , una fibronectina (AdNectin), un dominio de lectina de tipo C (Tetranectina); un dominio variable de beta lactamasa receptora de nuevo antígeno (fragmentos V_{NAR}), una gamma-cristalina o ubiquitina humana (moléculas Affilin); un dominio de tipo kunitz de inhibidores de proteasa humana, microcuerpos, tales como las proteínas de la familia de knotina, aptámeros peptídicos y fibronectina (adnectina).
- 20 CTLA-4 (antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos) es un receptor de la familia de CD28 expresado principalmente en células T CD4+. Su dominio extracelular tiene un plegamiento Ig similar a un dominio variable. Los bucles correspondientes a las CDR de anticuerpos pueden sustituirse con una secuencia heteróloga para conferir propiedades de unión. Las moléculas CTLA-4 diseñadas por ingeniería genética para que tengan diferentes
- 25 especificidades de unión se conocen también como Evibodies (por ejemplo, el documento US7166697B1). Los Evibodies tienen aproximadamente el mismo tamaño que la región variable aislada de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de dominio). Para detalles adicionales, véase Journal of Immunological Methods 248 (1-2), 31-45 (2001).

- Las lipocalinas son una familia de proteínas extracelulares que transportan pequeñas
- 30 moléculas hidrófobas, tales como esteroides, bilinas, retinoides y lípidos. Tienen una rígida estructura secundaria en beta-lámina con una serie de bucles en el extremo abierto de la estructura cónica que puede modificarse para que se una a diferentes antígenos diana. Las anticalinas tienen un tamaño de entre 160-180 aminoácidos y proceden de las lipocalinas.

Para más detalles, véase Biochim Biophys Acta 1482: 337-350 (2000), documentos US7250297B1 y US20070224633.

Un affibody es un armazón derivado de la proteína A de *Staphylococcus aureus* que puede modificarse para que se una a un antígeno. El dominio consiste en un ovillo de tres hélices de
 5 aproximadamente 58 aminoácidos. Se han generado bibliotecas mediante la aleatorización de restos de superficie. Para más detalles, véase Protein Eng. Des. Sel. 17, 455-462 (2004) y el documento EP 1641818A1.

Los avimeros son proteínas multidominio procedentes de la familia de armazón de dominio A. Los dominios nativos, de aproximadamente 35 aminoácidos, adoptan una estructura definida
 10 unida por enlaces disulfuro. La diversidad se genera reordenando la variación natural mostrada por la familia de dominios A. Para más detalles, véase Nature Biotechnology 23(12), 1556 - 1561 (2005) y Expert Opinion on Investigational Drugs 16(6), 909-917 (Junio de 2007).

Una transferrina es una glucoproteína monomérica de transporte en suero. Las transferrinas
 15 pueden diseñarse para unirse a diferentes antígenos diana mediante inserción de secuencias peptídicas en un bucle superficial permisivo. Los ejemplos de estructuras de transferrina diseñadas incluyen el Trans-body. Para detalles adicionales véase J. Biol. Chem 274, 24066-24073 (1999).

Las proteínas de repetición de anquirina diseñadas (DARPin) se derivan de anquirina, que es
 20 una familia de proteínas que median la unión de proteínas integrales de membrana al citoesqueleto. Una sola repetición de anquirina es un motivo de 33 restos que consiste en dos hélices alfa y un giro beta. Pueden diseñarse para unirse a diferentes antígenos diana aleatorizando restos en la primera hélice alfa y un giro beta de cada repetición. Su interfaz de unión puede aumentarse aumentando el número de módulos (un método de maduración de
 25 afinidad). Para detalles adicionales véase J. Mol. Biol. 332, 489-503 (2003), PNAS 100(4), 1700-1705 (2003) y J. Mol. Biol. 369, 1015-1028 (2007) y el documento US20040132028A1.

Un anticuerpo de un solo dominio es un fragmento de anticuerpo que consiste en un solo dominio variable monomérico de anticuerpo. El primer dominio individual procedió del dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo de camélidos (nanobodies o fragmentos
 30 $V_{\text{H}}\text{H}$). Además, la expresión anticuerpo de un solo dominio incluye un dominio variable de cadena pesada humana ($a\text{VH}$) o fragmentos V_{NAR} procedentes de tiburón.

La fibronectina es un armazón que puede modificarse para que se una a antígenos. Las adnectinas consisten en un armazón de la secuencia de aminoácidos natural del 10º dominio de las 15 unidades repetidas de fibronectina humana de tipo III (FN3). Pueden diseñarse tres bucles en un extremo del beta-sándwich para permitir que una adnectina reconozca específicamente una diana terapéutica de interés. Para más detalles, véase Protein Eng. Des. Sel. 18, 435- 444 (2005), US20080139791, documentos WO2005056764 y US6818418B1.

Los aptámeros de péptidos son moléculas de reconocimiento combinatorias que consisten en una proteína de armazón constante, típicamente tiorredoxina (TrxA) que contiene un bucle peptídico variable constreñido insertado en el sitio activo. Para más detalles, véase Expert Opin. Biol. Ther. 5, 783-797 (2005).

Los microbodies proceden de microproteínas de origen natural de 25-50 aminoácidos de longitud que contienen 3-4 puentes de cisteína; los ejemplos de microproteínas incluyen KalataBI, conotoxina y knottinas. Las microproteínas tienen un bucle que puede diseñarse para que incluya hasta 25 aminoácidos sin verse afectado el plegamiento general de la microproteína. Para más detalles acerca de dominios de knottina diseñados, véase el documento WO2008098796.

Una "**molécula de unión a antígeno que se une al mismo epítipo**" que una molécula de referencia se refiere a una molécula de unión a antígeno que bloquea la unión de la molécula de referencia a su antígeno en un ensayo de competición en un 50% o más y al contrario, la molécula de referencia bloquea la unión de la molécula de unión a antígeno a su antígeno en un ensayo de competición en un 50% o más.

La expresión "**dominio de unión a antígeno**" se refiere a la parte de una molécula de unión a antígeno que comprende el área que se une específicamente a y es complementaria con parte o la totalidad de un antígeno. En caso de que el antígeno sea voluminoso, una molécula de unión a antígeno puede unirse únicamente a una parte particular del antígeno, denominándose esta parte epítipo. Un dominio de unión a antígeno puede estar proporcionado, por ejemplo, mediante uno o más dominios de anticuerpo (también denominados regiones variables). Preferentemente, un dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) y una región variable de cadena pesada de anticuerpo (VH).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "**determinante antigénico**" es sinónima de "antígeno" y "epítipo" y se refiere a un sitio (por ejemplo, una serie contigua de

aminoácidos o una configuración conformacional compuesta de diferentes regiones de aminoácidos no contiguos) de una macromolécula de polipéptido a la que se une un resto de unión a antígeno, formando un complejo de resto de unión a antígeno-antígeno. Los determinantes antigénicos útiles pueden encontrarse, por ejemplo, sobre las superficies de células tumorales, sobre las superficies de células infectadas por virus, sobre las superficies de células enfermas, sobre las superficies de células inmunitarias, libres en el suero sanguíneo y/o en la matriz extracelular (ECM). Las proteínas útiles como antígenos en el presente documento pueden ser cualquier forma nativa de proteínas de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. En una realización particular, el antígeno es una proteína humana. En los casos donde se hace referencia en el presente documento a una proteína específica, el término abarca la proteína de "longitud completa", no procesada así como cualquier forma de la proteína que sea el resultado de su procesamiento en la célula. El término también abarca variantes de origen natural de la proteína, por ejemplo, variantes de corte y empalme alternativo o variantes alélicas.

La expresión "**capaz de unirse específicamente a PD1**" se refiere a una molécula de unión a antígeno que es capaz de unirse a PD1 con la suficiente afinidad, de tal forma que la molécula de unión a antígeno es útil como agente diagnóstico y/o terapéutico para dirigirse a PD1. La molécula de unión a antígeno incluye, pero sin limitación, anticuerpos, moléculas Fab, moléculas Fab sobrecruzadas, moléculas Fab monocatenarias, moléculas Fv, moléculas scFv, anticuerpos de un solo dominio y proteína de unión a antígeno de VH y de armazón. En un aspecto, el alcance de la unión de una molécula de unión a antígeno anti-PD1 a una proteína no PD1 no relacionada es menor de aproximadamente el 10% de la unión de la molécula de unión a antígeno a PD1, tal como se mide, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA). En particular, una molécula de unión a antígeno que es capaz de unirse específicamente a PD1 tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). En determinadas realizaciones, una molécula de unión a antígeno anti-PD1 se une a PD1 de diferentes especies. En particular, la molécula de unión a antígeno anti-PD1 se une a PD1 de ser humano y de macaco.

Por "**unión específica**" se pretende indicar que la unión es selectiva para el antígeno y puede discriminarse de interacciones no deseadas o no específicas. La capacidad de una molécula de unión a antígeno para unirse a un antígeno específico puede medirse bien a través de un

ensayo inmunoabsorbente acoplado a enzimas (ELISA) u otras técnicas familiares para un experto en la materia, por ejemplo, la técnica de resonancia de plasmón superficial (SPR) (analizada en un instrumento BIAcore) (Liljeblad et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)) y ensayos de unión tradicionales (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). En una realización, el alcance de la unión de una molécula de unión a antígeno a una proteína no relacionado es menos de aproximadamente el 10 % de la unión de una molécula de unión a antígeno al antígeno medida, por ejemplo, mediante SPR. En determinadas realizaciones, una molécula que se une al antígeno tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menor, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

"**Afinidad**" o "afinidad de unión" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se usa en el presente documento, la "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de una pareja de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su ligando Y se puede representar en general por su constante de disociación (K_d), que es la relación de las constantes de velocidad de disociación y asociación (k_{off} y k_{on} , respectivamente). Por lo tanto, las afinidades equivalentes pueden comprender diferentes constantes de velocidad, siempre que la relación de las constantes de velocidad siga siendo la misma. La afinidad puede medirse mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo aquellos descritos en el presente documento. Un método particular para medir la afinidad es resonancia de plasmón superficial (SPR).

Un "**antígeno de célula diana**", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un determinante antigénico presentado sobre la superficie de una célula diana, por ejemplo, una célula T o una célula B, una célula en un tumor, tal como una célula cancerosa o una célula del estroma tumoral. En determinadas realizaciones, el antígeno de célula diana es un antígeno sobre la superficie de células T. En una realización, el antígeno de célula diana es PD1.

El término "**PD1**", también conocido como proteína de muerte celular programada 1, es una proteína de membrana de tipo I que tiene 288 aminoácidos y fue descrita por primera vez en 1992 (Ishida et al., EMBO J., 11 (1992), 3887-3895). PD1 es miembro de la amplia familia CD28/CTLA-4 de reguladores de linfocitos T y tiene dos ligandos, PD-L1 (B7-H1, CD274) y

PD-L2 (B7-DC, CD273). La estructura de la proteína incluye un dominio extracelular IgV seguido por una región transmembrana y una cola intracelular. La cola intracelular incluye dos sitios de fosforilación situados en un motivo inhibidor basado en tirosina de inmunorreceptor y un motivo interruptor basado en tirosina de inmunorreceptor, lo que sugiere que PD1 regula negativamente las señales de TCR. Esto es coherente con la unión de las SHP-1 y SHP-2 fosfatasas a la cola citoplasmática de PD1 tras la unión del ligando. Aunque PD1 no se expresa en linfocitos T no expuestos a tratamiento, está regulado en exceso después de la activación del receptor de linfocitos T mediada por TCR y se observa en linfocitos T tanto activados como agotados (Agata et al., *Int. Immunology* 8 (1996), 765-772). Estos linfocitos T agotados tienen un fenotipo disfuncional y son incapaces de responder adecuadamente. Aunque PD1 tiene un modelo de expresión relativamente amplio, su papel más importante es probablemente un receptor coinhibidor en los linfocitos T (Chinai et al., *Trends in Pharmacological Sciences* 36 (2015), 587-595). Los enfoques terapéuticos actuales se centran, por tanto, en bloquear la interacción de PD1 con sus ligandos para potenciar la respuesta de linfocitos T. Las expresiones "muerte programada 1", "muerte celular programada 1", "proteína PD-1", "PD-1", "PD1", "PDCD1", "hPD-1" y "hPD-I" pueden usarse de manera intercambiable e incluyen variantes, isoformas, homólogos de especie de PD1 humano y análogos que tienen al menos un epítipo común con PD1. La secuencia de aminoácidos de PD1 humano se muestra en UniProt (www.uniprot.org) con el n.º de referencia Q15116 (SEQ ID NO:94).

La expresión "**región variable**" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena ligera o pesada de anticuerpo que está implicada en la unión de la molécula de unión a antígeno a su antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo tienen generalmente estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones marco conservadas (FR) y tres regiones hipervariables (HVR). Véase, por ejemplo, Kindt et al., *Kuby Immunology*, 6ª ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007). Puede ser suficiente un solo dominio VH o VL para conferir especificidad de unión a antígeno.

La expresión "**región hipervariable**" o "HVR", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables"). En general, los anticuerpos de cuatro cadenas nativos comprenden seis HVR; tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). Las HVR comprenden generalmente restos de

aminoácidos de los bucles hipervariables y/o forman las "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR), siendo estas últimas las de mayor variabilidad de secuencia y/o están implicadas en el reconocimiento de antígenos. Los bucles hipervariables ejemplares suceden en los restos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3). (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las CDR ejemplares (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, y CDR-H3) aparecen en los restos de aminoácidos 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, 31-35B de H1, 50-65 de H2 y 95-102 de H3. (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Las regiones hipervariables (HVR) también se citan como regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y estos términos se usan de manera intercambiable en el presente documento en referencia a porciones de la región variable que forman las regiones de unión a antígeno. Esta región particular se ha descrito por Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) y por Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), donde las definiciones incluyen solapamiento o subconjuntos de restos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. Sin embargo, la aplicación de cualquier definición para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes del mismo pretende encontrarse dentro del alcance del término tal como se define y usa en el presente documento. Los restos de aminoácidos adecuados que abarcan las CDR tal como se definen en cada una de las referencias citadas anteriormente se exponen en la Tabla A a modo de comparación. El número exacto de restos que abarca una CDR particular variará dependiendo de la secuencia y tamaño de la CDR. Los expertos en la materia pueden determinar de manera rutinaria qué restos comprenden una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

25

TABLA A. Definiciones de CDR¹

CDR	Kabat	Chothia	AbM²
CDR1 de V _H	31-35	26-32	26-35
CDR2 de V _H	50-65	52-58	50-58
CDR3 de V _H	95-102	95-102	95-102
CDR1 de V _L	24-34	26-32	24-34
CDR2 de V _L	50-56	50-52	50-56
CDR3 de V _L	89-97	91-96	89-97

¹ La numeración de todas las definiciones de CDR en la Tabla A es de acuerdo con las

convenciones de numeración expuestas por Kabat et al. (véase más adelante).

² "AbM" con una "b" minúscula, tal como se usa en la Tabla A se refiere a las CDR tal como se definen por el programa de modelado de anticuerpos de Oxford Molecular's, "AbM".

5 Kabat *et al.* también definieron un sistema de numeración para las secuencias de la región variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto habitual en la materia puede asignar de manera unívoca este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia de región variable, sin basarse en cualquier dato experimental más allá de la secuencia en sí misma. Tal como se usa en el presente documento, la "numeración de Kabat" se refiere al
10 sistema de numeración expuesto por Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). A menos que se especifique lo contrario, las referencias a la numeración de posiciones de restos de aminoácidos específicas en una región variable de anticuerpo son de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

Con la excepción de CDR1 en VH, las CDR generalmente comprenden los restos de
15 aminoácidos que forman los bucles hipervariables. las CDR también comprenden "restos determinantes de la especificidad", o "SDR", que son restos que entran en contacto con el antígeno. Los SDR están contenidos dentro de las regiones de las CDR llamadas CDR-abreviadas o a-CDR. Las a-CDR ejemplares (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 y a-CDR-H3) aparecen en los restos de aminoácido 31-34 de L1, 50-55 de L2, 89-
20 96 de L3, 31-35B de H1, 50-58 de H2 y 95-102 de H3. (Véase Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)). A menos que se indique lo contrario, los restos de HVR y otros restos en el dominio variable (por ejemplo, restos FR) se numeran en el presente documento según Kabat et al., *anteriormente citado*.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "**madurado por afinidad**" en el
25 contexto de las moléculas de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos) se refiere a una molécula de unión a antígeno que procede de una molécula de unión a antígeno de referencia, por ejemplo, mediante mutación, que se une al mismo antígeno, preferentemente se une al mismo epítipo, que el anticuerpo de referencia; y tiene una mayor afinidad por el antígeno que la de la molécula de unión a antígeno de referencia. La maduración por afinidad
30 generalmente implica la modificación de uno o más restos de aminoácidos en una o más CDR de la molécula de unión a antígeno. Típicamente, la molécula de unión a antígeno madurada por afinidad se une al mismo epítipo que la molécula de unión a antígeno de referencia inicial.

"**Marco conservada**" o "FR" se refiere a restos de dominio variable distintos de restos de la región hipervariable (HVR). La región FR de un dominio variable consiste de cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. Por consiguiente, las secuencias de HVR y FR aparecen generalmente en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-
 5 H3(L3)-FR4.

Un "**armazón humano aceptor**", para los fines del presente documento es un armazón que comprende la secuencia de aminoácidos del armazón del dominio variable de cadena ligera (VL) o armazón de un dominio variable de cadena pesada (VH) derivados de armazón de inmunoglobulina humana o un armazón consenso humano, tal como se define a continuación.

10 Un armazón humano aceptor "derivado de" un armazón de inmunoglobulina humana o de un armazón consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, el número de cambios de aminoácidos es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos. En algunas realizaciones, El armazón
 15 aceptor humano de VL es idéntico en secuencia al armazón de inmunoglobulina humana de VL o al armazón consenso humano.

La expresión anticuerpo "**quimérico**" se refiere a un anticuerpo en el que una porción de la cadena ligera y/o pesada procede de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera procede de una fuente o especie diferente.

20 La "**clase**" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante poseída por su cadena pesada. Hay cuatro clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ ,
 25 respectivamente.

Un anticuerpo "**humanizado**" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende restos de aminoácidos de HVR no humanas y restos de aminoácidos de FR humanas. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno y típicamente dos dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (por
 30 ejemplo, CDR) corresponden a aquellas de un anticuerpo no humano y todas o sustancialmente todas las FR se corresponden a aquellas de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente al menos una porción de una región

constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "**forma humanizada**" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que ha sido sometido a humanización. Otras formas de "anticuerpos humanos" abarcadas por la presente invención son aquellas en las que la región constante se ha modificado o cambiado
 5 adicionalmente a partir de aquella del anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente en lo referente a la unión a C1q y/o la unión a receptor Fc (FcR).

Un anticuerpo "**humano**" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con aquella de un anticuerpo producir por un ser humano o una célula humana o que se deriva
 10 de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpo humanos u otras secuencias codificantes de anticuerpo humanas. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente a un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígeno no humanos.

La expresión "dominio Fc" o "**región Fc**" se usa en el presente documento para definir una
 15 región C-terminal de una cadena pesada de anticuerpo que contiene al menos una porción de la región constante. La expresión incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Una región Fc de IgG comprende un dominio CH2 de IgG y un dominio CH3 de IgG. El "dominio CH2" de una región Fc de IgG humana se extiende normalmente desde un resto de aminoácido aproximadamente en la posición 231 hasta un resto de aminoácido
 20 aproximadamente en la posición 340. En una realización, se une una cadena de carbohidrato al dominio CH2. El dominio CH2 en el presente documento puede ser un dominio CH2 de secuencia nativa un dominio CH2 variante. El "dominio CH3" comprende el grupo de restos de C-terminal a un dominio CH2 en una región Fc (es decir, desde un resto de aminoácido aproximadamente en la posición 341 hasta un aminoácido aproximadamente en la posición
 25 447 de una IgG). La región CH3 en el presente documento puede ser un dominio CH3 de secuencia nativa o un dominio CH3 variante (por ejemplo, un dominio CH3 con una "protuberancia" introducida ("pomo") en una cadena del mismo y una "cavidad" correspondiente introducida ("agujero") en la otra cadena del mismo; véase la Patente de los Estados Unidos n.º 5.821.333, incorporada al presente documento expresamente por
 30 referencia). Dichos dominios CH3 variantes pueden usarse para promover la heterodimerización de dos cadenas pesadas de anticuerpo no idénticas tal como se describe en el presente documento. En una realización, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226 o de Pro230, hasta el extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin

embargo, la lisina C-terminal (Lys447) de la región Fc puede estar o no presente. A menos que se especifique lo contrario en el presente documento, la numeración de los restos de aminoácidos en la región Fc o en la región constante es de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, tal como se describe en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

La tecnología de "**pomo en agujero**" se describe, por ejemplo, en los documentos US 5.731.168; US 7.695.936; Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996) y Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). En general, el método implica introducir una protuberancia ("pomo") en la interfaz de un primer polipéptido y una correspondiente cavidad ("agujero") en la interfaz de un segundo polipéptido, de tal forma que la protuberancia puede posicionarse en la cavidad para promover la formación de heterodímero e impedir la formación de homodímero. Las protuberancias se construyen reemplazando cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz del primer polipéptido con cadenas más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean cavidades compensadoras de tamaño idéntico o similar a las protuberancias en la interfaz del segundo polipéptido sustituyendo cadenas laterales de aminoácidos grandes con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). La protuberancia y la cavidad pueden efectuarse alterando el ácido nucleico que codifica los polipéptidos, por ejemplo, mediante mutagénesis de sitio específico o mediante síntesis peptídica. En una realización específica, una modificación de pomo comprende la sustitución de aminoácidos T366W en una de las dos subunidades del dominio Fc y la modificación de agujero comprende las sustituciones de aminoácidos T366S, L368A y Y407V en la otra de las dos subunidades del dominio Fc. En una realización específica adicional, la subunidad del dominio Fc que comprende la modificación de pomo comprende además la sustitución de aminoácidos S354C y la subunidad del dominio Fc que comprende la modificación de agujero comprende además la sustitución de aminoácidos Y349C. La introducción de estos dos restos de cisteína da como resultado la formación de un puente disulfuro entre las dos subunidades de la región Fc, de este modo estabilizando adicionalmente al dímero (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)). La numeración es de acuerdo con el índice EU de Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Una "región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina" pretende incluir variantes alélicas de origen natural de la región Fc de una inmunoglobulina así como variantes que

tienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones o eliminaciones pero que no disminuyen sustancialmente la capacidad de la inmunoglobulina para mediar funciones efectoras (tales como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo). Por ejemplo, pueden eliminarse uno o más aminoácidos del extremo N-terminal o C-terminal de la región Fc de una inmunoglobulina sin una pérdida sustancial de la función biológica. Dichas variantes pueden seleccionarse de acuerdo con varias reglas generales conocidas en la técnica para que tengan un efecto mínimo en la actividad (véase, por ejemplo, Bowie, J. U. et al., Science 247:1306-10 (1990)).

La expresión "**funciones efectoras**" se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), unión a receptor Fc, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP), secreción de citocinas, captación de antígeno mediada por complejo inmune por células presentadoras de antígenos, regulación negativa de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B) y la activación de células B.

Un "**receptor Fc activador**" es un receptor Fc que después de la ocupación por una región Fc de un anticuerpo provoca eventos de señalización que estimulan a células portadoras de receptores para llevar a cabo las funciones efectoras. Los receptores Fc activadores incluyen FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) y FcαRI (CD89). Un receptor Fc activador particular es FcγRIIIa humano (véase el número de referencia de UniProt P08637, versión 141).

La expresión "**miembro de la familia de ligandos de TNF**" o "ligando de la familia de TNF" se refiere a una citocina proinflamatoria. Las citocinas en general y en particular los miembros de la familia de ligandos de TNF, desempeñan un papel crucial en la estimulación y coordinación del sistema inmunitario. Actualmente, se han identificado diecinueve citocinas como miembros de la superfamilia de ligandos de TNF (factor de necrosis tumoral) basándose en similitudes de secuencia, funcionales y estructurales. Todos estos ligandos son proteínas transmembrana de tipo II con un dominio extracelular C-terminal (ectodominio), dominio intracelular N-terminal y un solo dominio transmembrana. El dominio extracelular C-terminal, conocido como dominio de homología de TNF (THD), tiene un 20-30 % de identidad de aminoácidos entre los miembros de la superfamilia y es responsable de la unión al receptor. El ectodominio de TNF también es responsable de que los ligandos de TNF formen complejos

triméricos que son reconocidos por sus receptores específicos.

Los miembros de la familia de ligandos de TNF se seleccionan entre el grupo que consiste en linfotoxina α (también conocida como LTA o TNFSF1), TNF (también conocido como TNFSF2), LT β (también conocido como TNFSF3), OX40L (también conocido como TNFSF4), CD40L (también conocido como CD154 o TNFSF5), FasL (también conocido como CD95L, CD178 o TNFSF6), CD27L (también conocido como CD70 o TNFSF7), CD30L (también conocido como CD153 o TNFSF8), 4-1BBL (también conocido como TNFSF9), TRAIL (también conocido como APO2L, CD253 o TNFSF10), RANKL (también conocido como CD254 o TNFSF11), TWEAK (también conocido como TNFSF12), APRIL (también conocido como CD256 o TNFSF13), BAFF (también conocido como CD257 o TNFSF13B), LIGHT (también conocido como CD258 o TNFSF14), TL1A (también conocido como VEGI o TNFSF15), GITRL (también conocido como TNFSF18), EDA-A1 (también conocido como ectodisplasina A1) y EDA-A2 (también conocido como ectodisplasina A2). La expresión se refiere a cualquier ligando nativo de la familia de TNF de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos), primates no humanos (por ejemplo, macacos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. En realizaciones específicas de la invención, el miembro de la familia de ligandos de TNF se selecciona entre el grupo que consiste en OX40L, FasL, CD27L, TRAIL, 4-1BBL, CD40L y GITRL. En una realización particular, el miembro de la familia de ligandos de TNF se selecciona entre 4-1BBL y OX40L.

Puede encontrarse información adicional, en particular de secuencias, de miembros de la familia de ligandos de TNF a través de bases de datos de acceso público, tales como Uniprot (www.uniprot.org). Por ejemplo, los ligandos de TNF tienen las siguientes secuencias de aminoácidos: linfotoxina α humana (n.º de referencia de UniProt P01374, SEQ ID NO: 95), TNF humano (n.º de referencia de UniProt P01375, SEQ ID NO: 96), linfotoxina β humana (n.º de referencia de UniProt Q06643, SEQ ID NO: 97), OX40L humano (n.º de referencia de UniProt P23510, SEQ ID NO: 98), CD40L humano (n.º de referencia de UniProt P29965, SEQ ID NO: 99), FasL humano (n.º de referencia de UniProt P48023, SEQ ID NO: 100), CD27L humano (n.º de referencia de UniProt P32970, SEQ ID NO: 101), CD30L humano (n.º de referencia de UniProt P32971, SEQ ID NO: 102), 4-1BBL (n.º de referencia de UniProt P41273, SEQ ID NO: 103), TRAIL (n.º de referencia de UniProt P50591, SEQ ID NO: 104), RANKL (n.º de referencia de UniProt O14788, SEQ ID NO: 105), TWEAK (n.º de referencia de UniProt O43508, SEQ ID NO: 106), APRIL (n.º de referencia de UniProt

O75888, SEQ ID NO: 107), BAFF (n.º de referencia de UniProt Q9Y275, SEQ ID NO: 108), LIGHT (n.º de referencia de UniProt O43557, SEQ ID NO: 109), TL1A (n.º de referencia de UniProt O95150, SEQ ID NO: 110), GITRL (n.º de referencia de UniProt Q9UNG2, SEQ ID NO: 111) y ectodisplasina A (n.º de referencia de UniProt Q92838, SEQ ID NO: 112).

- 5 Un "**ectodominio**" es el dominio de una proteína de membrana que se extiende en el espacio extracelular (es decir, el espacio fuera de la célula diana). Los ectodominios son normalmente las partes de las proteínas que inician el contacto con las superficies, lo que da lugar a la transducción de señales. El ectodominio del miembro de la familia de ligandos de TNF, tal como se define en el presente documento, se refiere por lo tanto a la parte de la proteína de
- 10 ligando de TNF que se extiende en el espacio extracelular (el dominio extracelular), pero también incluye partes o fragmentos más cortos del mismo que son responsables de la trimerización y la unión al correspondiente receptor de TNF. La expresión "ectodominio de un miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo", por lo tanto, se refiere al dominio extracelular del miembro de la familia de ligandos de TNF que forma el
- 15 dominio extracelular o a partes del mismo que siguen siendo capaces de unirse al receptor (dominio de unión a receptor).

La expresión "**miembro de la familia de ligandos de TNF coestimulador**" o "ligando de la familia de TNF coestimulador" se refiere a un subgrupo de miembros de la familia de ligandos de TNF, que son capaces de estimular conjuntamente la proliferación y la

20 producción de citocinas de las células T. Estos ligandos de la familia de TNF pueden estimular conjuntamente las señales de TCR tras la interacción con sus correspondientes receptores de TNF y la interacción con sus receptores da lugar al reclutamiento de factores asociados con TNFR (TRAF), que inician cascadas de señalización que dan como resultado la activación de células T. Los ligandos coestimuladores de la familia de TNF se seleccionan

25 entre el grupo que consiste en 4-1BBL, OX40L, GITRL, CD70, CD30L y LIGHT, más en particular, el miembro de la familia de ligando de TNF coestimulador se selecciona entre 4-1BBL y OX40L.

Tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, 4-1BBL es una proteína transmembrana de tipo II y un miembro de la familia de ligandos de TNF. Se ha descrito que

30 4-1BBL completo o de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103 forma trímeros en la superficie de las células. La formación de trímeros se habilita mediante motivos específicos del ectodominio de 4-1BBL. Dichos motivos se denominan en el presente documento como "región de trimerización". Los aminoácidos 50-254 de la

secuencia de 4-1BBL humano (SEQ ID NO: 113) forman el dominio extracelular de 4-1BBL, pero los fragmentos pares del mismo son capaces de formar trímeros. En realizaciones específicas de la invención, la expresión "ectodominio de 4-1BBL o un fragmento del mismo" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 4 (aminoácidos 52-254 de 4-1BBL humano), SEQ ID NO: 1 (aminoácidos 71-254 de 4-1BBL humano), SEQ ID NO: 3 (aminoácidos 80-254 de 4-1BBL humano) y SEQ ID NO: 2 (aminoácidos 85-254 de 4-1BBL humano) o un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 5 (aminoácidos 71-248 de 4-1BBL humano), SEQ ID NO: 8 (aminoácidos 52-248 de 4-1BBL humano), SEQ ID NO: 7 (aminoácidos 80-248 de 4-1BBL humano) y SEQ ID NO: 6 (aminoácidos 85-248 de 4-1BBL humano), sino también otros fragmentos del ectodominio capaz de trimerización se encuentran incluidos en el presente documento.

Tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, OX40L es otra proteína transmembrana de tipo II y un miembro adicional de la familia de ligandos de TNF. OX40L humano completo o de longitud completa tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98. Los aminoácidos 51-183 de la secuencia de OX40L humano (SEQ ID NO: 114) forman el dominio extracelular de OX40L, pero los fragmentos pares del mismo son capaces de formar trímeros. En realizaciones específicas de la invención, la expresión "ectodominio de OX40L o un fragmento del mismo" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 114 (aminoácidos 51-183 de OX40L humano) o SEQ ID NO: 115 (aminoácidos 52-183 de OX40L humano), sino también otros fragmentos del ectodominio capaz de trimerización se encuentran incluidos en el presente documento.

La expresión "**enlazador peptídico**" se refiere a un péptido que comprende uno o más aminoácidos, típicamente aproximadamente 2 a 20 aminoácidos. Los enlazadores peptídicos se conocen en la técnica o se describen en el presente documento. Los enlazadores peptídicos adecuados no inmunogénicos son, por ejemplo, los enlazadores peptídicos $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$ o $G_4(SG_4)_n$, en los que "n" es generalmente un número entre 1 y 10, típicamente entre 1 y 4, en particular 2, es decir, los péptidos seleccionados entre el grupo que consiste en GGGGS (SEQ ID NO: 116), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 117), SGGGSGGGG (SEQ ID NO: 118), $(G_4S)_3$ o GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 119), GGGGSGGGGSGGGG o $G_4(SG_4)_2$ (SEQ ID NO: 120), y $(G_4S)_4$ o GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 121), pero también incluyen las secuencias GSPGSSSSGS (SEQ ID NO: 122), GSGSGSGS (SEQ ID NO: 123), GSGSGNGS (SEQ ID NO: 124), GSGSGSG (SEQ ID NO: 125), GGSGSG

(SEQ ID NO: 126), GGSG (SEQ ID NO: 127), GGSGNGSG (SEQ ID NO: 128), GGNGSGSG (SEQ ID NO: 129) y GGNGSG (SEQ ID NO: 130). Los enlazadores peptídicos de interés particular son (G₄S)₁ o GGGGS (SEQ ID NO: 86), (G₄S)₂ o GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 117) y GSPGSSSSGS (SEQ ID NO: 122), más particularmente, (G₄S)₂ o
 5 GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 117).

El término "**aminoácido**", tal como se usa en esta solicitud indica el grupo de carboxi α -aminoácidos de origen natural que comprenden alanina (código de tres letras: ala, código de una letra: A), arginina (arg, R), asparagina (asn, N), ácido aspártico (asp, D), cisteína (cys, C), glutamina (gln, Q), ácido glutámico (glu, E), glicina (gly, G), histidina (his, H), isoleucina (ile,
 10 I), leucina (leu, L), lisina (lys, K), metionina (met, M), fenilalanina (phe, F), prolina (pro, P), serina (ser, S), treonina (thr, T), triptófano (trp, W), tirosina (tyr, Y) y valina (val, V).

Un "**polipéptido de fusión**" o "polipéptido de fusión individual", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido monocatenario compuesto de uno o dos ectodominios de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF fusionado a una parte de
 15 resto de unión a antígeno o parte Fc. La fusión puede suceder enlazando directamente el aminoácido C-terminal del resto de unión a antígeno a través de un enlazador peptídico al aminoácido C o N-terminal del ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF.

Por "fusionado" o "conectado" se entiende que los componentes (por ejemplo, un polipéptido
 20 y un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF) están enlazados mediante enlaces peptídicos, ya sea directamente o a través de uno o más enlazadores peptídicos.

El "**porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos**" respecto de la secuencia de un polipéptido (o proteína) de referencia se define como el porcentaje de restos de
 25 aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia de polipéptido de referencia, después de alinear las secuencias e introducir los espacios en blanco, en caso necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia y sin tener en cuenta las posibles sustituciones conservativas como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad de
 30 secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras que se encuentran dentro de las capacidades de la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles de manera pública, tales como los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN, SAWI o Megalign

(DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros necesarios para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr un alineamiento máximo a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se estén comparando. Para los fines del presente documento, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue programado por Genentech, Inc. y el código fuente, junto con las instrucciones para su uso, se han depositado en la Oficina de Derechos de Autor de los Estados Unidos (U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559, donde está registrada con el n.º de Registro de Derechos de Autor de los Estados Unidos TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California o puede compilarse a partir de su código fuente. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V 4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se ajustan por el programa ALIGN-2 y no varían. En las situaciones en las que se usa ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A para, con o contra una secuencia de aminoácidos dada B (que puede, como alternativa, citarse como una secuencia de aminoácidos A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia para, con o contra una secuencia de aminoácidos B) se calcula del modo siguiente:

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de restos de aminoácidos marcados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento del programa de A y B y donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que en los casos donde la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de A para B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B para A. A menos que se afirme específicamente lo contrario, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

En determinadas realizaciones, se contemplan "**variantes de secuencia de aminoácidos**" de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de TNF proporcionadas en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de

ligando de TNF. Las variantes de secuencias de aminoácidos de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de TNF pueden prepararse introduciendo modificaciones adecuadas en la secuencia de nucleótidos que codifica las moléculas o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución se efectúa para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno. Los sitios de interés para mutagénesis sustitucional incluyen las HVR y las regiones marco conservadas (FR). En la tabla B se proporcionan sustituciones conservativas bajo el encabezado "sustituciones preferidas" y se describen adicionalmente a continuación en referencia a las clases (1) a (6) de cadena de aminoácidos. Pueden introducirse sustituciones de aminoácidos en la molécula de interés y explorarse los productos respecto de una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno mantenida/mejorada, inmunogenicidad reducida o ADCC o CDC mejoradas.

15

TABLA B

Resto Original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr

Resto Original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferidas
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo a propiedades de cadena lateral común:

- (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 5 (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) restos que influyen la orientación de cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

La expresión "**variantes de secuencia de aminoácidos**" incluye variantes sustanciales en las que las sustituciones de aminoácidos se encuentran en uno o más restos de región hipervariable de una molécula de unión a antígeno progenitora (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la variante (o variantes) resultante seleccionada para estudio posterior tendrán modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad aumentada, inmunogenicidad reducida) en relación a la molécula de unión a antígeno progenitora y/o tendrán determinadas propiedades biológicas sustancialmente mantenidas de la molécula de unión a antígeno progenitora. Una variante sustitucional ejemplar es un anticuerpo madurado por afinidad, que puede generarse de manera conveniente, por ejemplo, usando técnicas de maduración por afinidad basadas en presentación de fagos, tales como aquellas descritas en el presente documento. En resumen, se mutan uno o más restos de HVR y las moléculas de unión a antígeno mutadas y variantes presentadas en fagos se exploran respecto de una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión). En determinadas realizaciones, las sustituciones, inserciones o eliminaciones pueden suceder dentro de una o más HVR siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad de la molécula de unión a antígeno para unirse al antígeno. Por ejemplo, pueden hacerse alteraciones conservativas (por ejemplo, sustituciones

- conservativas tal como se proporciona en el presente documento) que no reducen sustancialmente la afinidad de unión en las HVR. Un método útil para la identificación de restos o regiones de un anticuerpo que pueden usarse como diana para mutagénesis se denomina "mutagénesis por barrido de alanina" tal como se describe por Cunningham y Wells
- 5 (1989) *Science*, 244:1081-1085. En este método, un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados, tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) se identifican y sustituyen por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Pueden introducirse sustituciones adicionales en las localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad
- 10 funcional a las sustituciones iniciales. Como alternativa o además, puede usarse una estructura cristalina de una molécula de unión a antígeno para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos vecinos pueden usarse como diana o eliminarse como candidatos para sustitución. Las variantes pueden explorarse para determinar si contienen las propiedades deseadas.
- 15 Las inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminal en el intervalo de longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen a la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF con un resto metionilo N-terminal. Otras variantes
- 20 insercionales de la molécula incluyen la fusión al extremo N o C-terminal de un polipéptido que aumenta la semivida en suero de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de TNF.

- En determinadas realizaciones, las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de TNF se alteran para aumentar o disminuir el alcance hasta el que el anticuerpo se
- 25 glucosila. Pueden obtenerse de manera conveniente variantes de glucosilación de las moléculas alterando la secuencia de aminoácidos de tal forma que se crean o eliminan uno o más sitios de glucosilación. En los casos donde la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de TNF comprende una región Fc, puede alterarse el carbohidrato unido a esta. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero comprenden típicamente
- 30 un oligosacárido ramificado biantenarico que está unido generalmente mediante un enlace N al Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir varios carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como fucosa unida a un GlcNAc en el

"brote" de la estructura de oligosacárido biantenaria. En algunas realizaciones, pueden efectuarse modificaciones del oligosacárido en la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF para crear variantes con determinadas propiedades mejoradas. En un aspecto, se proporcionan variantes de moléculas de unión a antígeno que
5 contienen trímero de ligando de TNF que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Dichas variantes de fucosilación pueden tener función ADCC mejorada, véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos n.º US 2003/0157108 (Presta, L.) o US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Las variantes adicionales de las moléculas de unión a antígeno que
10 contienen trímero de ligando de TNF incluyen aquellas con oligosacáridos biseccionados, por ejemplo, en las que se bisecciona un oligosacárido biantenario unido a la región Fc mediante GlcNAc. Dichas variantes pueden tener fucosilación reducida y/o función de ADCC mejorada, véase, por ejemplo, el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); la patente de Estados Unidos n.º 6.602.684 (Umana et al.); y en el documento US 2005/0123546 (Umana *et al.*).
15 También se proporcionan variantes con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener función CDC mejorada y se describen, por ejemplo, en el documento WO 1997/30087 (Patel et al.); en el documento WO 1998/58964 (Raju, S.); y en el documento WO 1999/22764 (Raju, S.).

En determinadas realizaciones, puede ser deseable crear **variantes diseñadas de cisteína** de
20 la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención, por ejemplo, "tioMab", donde uno o más restos de la molécula se han sustituido por restos de cisteína. En realizaciones particulares, los restos sustituidos se encuentran en sitios accesibles de la molécula. Mediante la sustitución de esos restos con cisteína, los grupos tiol reactivos se colocan por tanto en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden utilizar para
25 conjugar el anticuerpo con otros restos, tales como restos de fármacos o restos enlazantes de fármacos, para crear un inmunoconjugado. En determinadas realizaciones, puede sustituirse uno cualquiera o más de los siguientes restos por cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Las moléculas de unión a antígeno diseñadas de cisteína
30 pueden generarse tal como se describe, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos n.º 7.521.541.

En determinados aspectos, las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de TNF proporcionadas en el presente documento pueden modificarse adicionalmente

para que contengan restos no proteicos adicionales que se conocen en la técnica y que están fácilmente disponibles. Los restos adecuados para derivatización del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros al azar) y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede estar ramificado o sin ramificar. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y en caso de que se acople más de un polímero, pueden tener las mismas o diferentes moléculas. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización pueden determinarse basándose en consideraciones que incluyen, pero sin limitación, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a mejorar, de si el derivado de anticuerpo biespecífico se usará en una terapia en condiciones definidas, etc. En otro aspecto, se proporcionan conjugados de anticuerpo y restos no proteínicos que se pueden haber calentado selectivamente por exposición a radiación. En una realización, el resto no proteico es un nanotubo de carbono (Kam, N.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda e incluye, pero sin limitación, longitudes de onda que no dañen a células normales, pero que calienten el resto no proteínico a una temperatura a la cual las células cercanas al resto no proteínico del anticuerpo se eliminan.

En otro aspecto, pueden obtenerse inmunoconjugados de las moléculas de unión a antígeno que contienen trómero de ligando de TNF proporcionadas en el presente documento. Un **"inmunoconjugado"** es un anticuerpo conjugado a una o más moléculas heterólogas, incluyendo pero sin limitación un agente citotóxico.

El término **"polinucleótido"** se refiere a una molécula o construcción de ácido nucleico aislada, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm), ARN de origen vírico o ADN plasmídico (ADNp). Un polinucleótido puede comprender un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace de amida, tal como se encuentra en los ácidos peptidonucleicos (APN). La expresión "molécula de ácido nucleico" se refiere a uno

cualquiera o más segmentos de ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido.

Por molécula de ácido nucleico o polinucleótido "**aislado**" se entiende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha extraído de su ambiente natural. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante contenido en un vector que codifica un polipéptido se considera
5 aislado para los fines de la presente invención. Los ejemplos adicionales de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células hospedadoras heterólogas o polinucleótidos (parcial o sustancialmente) purificados en solución. Un polinucleótido aislado incluye una molécula de polinucleótido contenida en células que
10 normalmente contienen a la molécula de polinucleótido, pero la molécula de polinucleótido está presente extracromosómicamente o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de la presente invención, así como formas de hebra positiva y negativa y formas bicatenarias. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados de acuerdo con la
15 presente invención comprenden además dichas moléculas producidas de manera sintética. Además, un polinucleótido o ácido nucleico puede ser o puede incluir un elemento regulador, tal como un promotor, sitio de unión a ribosomas o un terminador de la transcripción.

Por un ácido nucleico o polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo, "idéntica" en un 95 % a una secuencia de nucleótidos de referencia de la presente
20 invención, se entiende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido es idéntica a la secuencia de referencia excepto en que la secuencia de polinucleótidos puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia del nucleótido de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos al menos un 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta un
25 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia pueden eliminarse o sustituirse por otro nucleótido o puede insertarse en la secuencia de referencia un número de nucleótidos de hasta el 5% de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden suceder en las posiciones terminales 5' y 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier sitio entre estas posiciones terminales, intercaladas
30 bien individualmente entre los restos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Como asunto práctico, si una secuencia de polinucleótidos particular es al menos un 80 %, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98 % o 99 % idéntica con una secuencia de nucleótidos de la presente invención puede determinarse de

manera convencional usando programas informáticos conocidos, tales como los discutidos anteriormente para polipéptidos (por ejemplo, ALIGN-2).

La expresión "**casete de expresión**" se refiere a un polinucleótido generado recombinante o sintéticamente, con una serie de elementos de ácidos nucleicos especificados que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula diana. El casete de expresión recombinante puede incorporarse en un plásmido, cromosoma, ADN mitocondrial, ADN de plástido, virus o fragmento de ácido nucleico. Típicamente, la porción de casete de expresión recombinante de un vector de expresión incluye, entre otras secuencias, una secuencia de ácido nucleico que se va a transcribir y un promotor. En determinadas realizaciones, el casete de expresión de la invención comprende secuencias polinucleotídicas que codifican moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención o fragmentos de las mismas.

El término "**vector**" o la expresión "vector de expresión" son sinónimos de la expresión "construcción de expresión" y se refieren a una molécula de ADN que se usa para introducir y dirigir la expresión de un gen específico al que se asocia de manera operativa en una célula diana. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante así como el vector incorporado en el genoma de una célula hospedadora en la que se ha introducido. El vector de expresión de la presente invención comprende un casete de expresión. El vector de expresión permite la transcripción de grandes cantidades de ARNm estable. Una vez que el vector de expresión está dentro de la célula diana, la molécula de ácido ribonucleico o proteína que se codifica por el gen se produce por la maquinaria de transcripción y/o traducción celular. En una realización, el vector de la expresión comprende un casete de expresión que comprende secuencias polinucleotídicas que codifican moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención o fragmentos de las mismas.

Las expresiones "**célula hospedadora**", "línea celular hospedadora", y "cultivo de células hospedadoras" se usan de manera intercambiable y se refiere a células en las cuales se han introducido ácidos nucleicos exógenos, incluyendo la progenie de dichas células. Las células hospedadoras incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen a la célula primaria transformada y a la progenie derivada de esta independientemente del número de pases. La progenie puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula parental, pero puede contener mutaciones. Se incluye en el presente documento la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica explorada o seleccionada en la célula transformada originalmente. Una célula hospedadora es cualquier tipo de sistema celular que pueda usarse para generar las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la

presente invención. Las células hospedadoras incluyen células cultivadas, por ejemplo, células de mamífero cultivadas, tales como células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células YO de mieloma, células P3X63 de mieloma de ratón, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, células de levadura, células de insecto y células vegetales, por nombrar solo algunas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, planta transgénica o planta cultivada o tejido animal.

Una "**cantidad eficaz**" de un agente se refiere a la cantidad que es necesaria para dar como resultado un cambio fisiológico en la célula o tejido al cual se administra.

Una "**cantidad terapéuticamente eficaz**" de un agente, por ejemplo, una composición farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, por ejemplo elimina, disminuye, retrasa, minimiza o previene los efectos adversos de una enfermedad.

Un "**individuo**" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En particular, el individuo o sujeto es un ser humano.

La expresión "**composición farmacéutica**" se refiere a una preparación que se encuentra en una forma tal que permite que sea eficaz la actividad de un principio activo contenido en la misma y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administre la formulación.

Un "**excipiente farmacéuticamente aceptable**" se refiere a un ingrediente en una composición farmacéutica, distinto del principio activo, que no es tóxico para un sujeto. Un excipiente farmacéuticamente aceptable incluye, pero sin limitación, un tampón, un estabilizante o un conservante.

El término "**prospecto**" se utiliza para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, terapia combinada, contraindicaciones y/o advertencias relativas al uso de dichos productos terapéuticos.

Tal como se usa en el presente documento, "**tratamiento**" (y variaciones gramaticales del

mismo, tales como "tratar" o "tratando") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo que se esté tratando y puede efectuarse para profilaxis o durante el transcurso de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero sin limitación, prevenir la aparición o recidiva de la enfermedad, el alivio de síntomas, la

5 disminución de cualesquiera consecuencias patológicas directas o indirectas de la enfermedad, prevenir la metástasis, disminuir la velocidad de evolución de la enfermedad, mejora o alivio de la patología o trastorno y remisión o pronóstico mejorado. En algunas realizaciones, las moléculas de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para frenar la progresión de una enfermedad.

10 El término "**cáncer**", tal como se usa en el presente documento se refiere a enfermedades proliferativas, tales como linfomas, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, leucemia, leucemias linfocíticas, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico (NSCL), cáncer de pulmón de células broncoalveolares, cáncer óseo, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer

15 rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer colorrectal (CCR), cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma de endometrio, carcinoma de cuello de útero, carcinoma de vagina, carcinoma de vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la

20 glándula paratiroidea, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o de uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), tumores del eje espinal, glioma del tronco encefálico, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwannomas, ependimomas,

25 meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenoma pituitario y sarcoma de Ewing, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de células B (linfoma), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfocítica aguda (ALL), tricoleucemia, leucemia mieloblástica crónica, incluyendo versiones refractarias de cualquiera de los cánceres anteriores o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores.

30 **Moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de TNF de la invención**

La invención proporciona nuevas moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de TNF con propiedades particularmente ventajosas, tales como capacidad de

producción, estabilidad, afinidad de unión, actividad biológica, eficacia de direccionamiento y toxicidad reducida.

En un primer aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende

- 5 (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1 y
- (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,
- en donde la molécula se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del
- 10 mismo que está conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende únicamente un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo.

En un aspecto particular, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende

- 15 (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1,
- (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,
- en donde la molécula se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del
- 20 mismo que está conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende únicamente un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo, y
- (c) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad capaz de asociarse de manera estable.

- 25 En un aspecto particular, la molécula de unión a antígeno que comprende trímero de ligando de la familia de TNF comprende (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1 y (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro, en donde la molécula se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo
- 30 que están conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y por que el segundo

polipéptido comprende únicamente un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo, en donde el miembro de la familia de ligandos de TNF coestimula la activación de células T.

En otro aspecto particular, la molécula de unión a antígeno que comprende trímero de ligando de la familia de TNF comprende (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1 y (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro, en donde la molécula se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende únicamente un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo, en donde los ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF son idénticos en todos los casos.

En un aspecto adicional, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha definido anteriormente en el presente documento, que comprende

- (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un PD1 y
- (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,
 - en donde la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que
 - (i) el primer polipéptido contiene un dominio CH1 o CL y el segundo polipéptido contiene un dominio CL o CH1, respectivamente, en donde el segundo polipéptido está unido al primer polipéptido mediante un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL y en donde el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al dominio CH1 o CL mediante un enlazador peptídico y en donde el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al dominio CL o CH1 de dicho polipéptido, o
 - (ii) el primer polipéptido contiene un dominio CH3 y el segundo polipéptido

- 5 contiene un dominio CH3, respectivamente, y en donde el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al extremo C-terminal del dominio CH3 mediante un enlazador peptídico y en donde el segundo polipéptido comprende únicamente un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al extremo C-terminal del dominio CH3 de dicho polipéptido, o
- 10 (iii) el primer polipéptido contiene un dominio VH-CL o VL-CH1 y el segundo polipéptido contiene un dominio VL-CH1 o un dominio VH-CL, respectivamente, en donde el segundo polipéptido está unido al primer polipéptido mediante un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL y en donde el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre
- 15 sí y a VH o VL mediante un enlazador peptídico y en donde el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al VH o VL de dicho polipéptido.
- 20 En otro aspecto, se proporciona una molécula que contiene trímero de ligando de la familia de TNF como se ha definido anteriormente en el presente documento, que comprende
- (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un PD1 y
- (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,
- 25 en donde la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que
- (i) el primer polipéptido contiene un dominio CH1 o CL y el segundo polipéptido contiene un dominio CL o CH1, respectivamente, en donde el segundo polipéptido está unido al primer polipéptido mediante un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL y en donde el primer polipéptido comprende dos
- 30 ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al dominio CH1 o CL mediante un enlazador peptídico y en donde el segundo polipéptido comprende

un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al dominio CL o CH1 de dicho polipéptido, o

- 5 (ii) el primer polipéptido contiene un dominio CH3 y el segundo polipéptido contiene un dominio CH3, respectivamente, y en donde el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al extremo C-terminal del dominio CH3 mediante un enlazador peptídico y en donde el
- 10 segundo polipéptido comprende únicamente un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al extremo C-terminal del dominio CH3 de dicho polipéptido.

En un aspecto, la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de la familia de ligandos

15 de TNF comprende un miembro de la familia de ligandos de TNF que coestimula la activación de células T humanas que se selecciona entre 4-1BBL y OX40L. Más en particular, el miembro de la familia de ligandos de TNF es 4-1BBL.

En otro aspecto, en la que el ectodominio de un miembro de la familia de ligandos de TNF comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID

20 NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, en particular, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 5. Más en particular, el ectodominio de un miembro de la familia de ligandos de TNF comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

En un aspecto adicional, la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de

25 la familia de TNF de la invención comprende

- (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1 y
- (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,
- en donde la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer
- 30 polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 10

y por que el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

En un aspecto, la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención comprende

- (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1 y
- (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,
 en donde la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y por que el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

En un aspecto adicional, la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención comprende

- (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1 y
- (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro, en donde la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y por que el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

En otro aspecto, el miembro de la familia de ligandos de TNF es OX40L. En un aspecto particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que el ectodominio de un miembro de la familia de ligandos de TNF comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 114 o SEQ ID NO: 115, en particular la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 114.

En otro aspecto, la moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF de la invención comprende

- (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1,
- (b) un primer polipéptido que comprende un dominio CH1 o CL y un segundo polipéptido que contiene un dominio CL o CH1, respectivamente, en donde el segundo polipéptido está unido al primer polipéptido mediante un enlace disulfuro

entre el dominio CH1 y CL,
 y en donde la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer
 polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos
 de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al dominio
 5 CH1 o CL mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido
 comprende únicamente un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos
 de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al
 dominio CL o CH1 de dicho polipéptido.

En un aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de
 10 ligando de la familia de TNF que comprende

- (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1,
- (b) un primer polipéptido que comprende un dominio CH1 y un segundo polipéptido
 que contiene un dominio CL, en donde el segundo polipéptido está unido al primer
 polipéptido mediante un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL,
 15 y en donde la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer
 polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos
 de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al dominio CH1
 mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende un
 ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento
 20 del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al dominio CL de dicho
 polipéptido.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de
 ligando de la familia de TNF que comprende

- (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1,
- (b) un primer polipéptido que comprende un dominio CL y un segundo polipéptido que
 contiene un dominio CH1, en donde el segundo polipéptido está unido al primer
 polipéptido mediante un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL,
 25 y en donde la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer
 polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos
 de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al dominio CL
 mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende un
 30

ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al dominio CH1 de dicho polipéptido.

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene
5 trímero de ligando de la familia de TNF que comprende (a) un resto capaz de unirse específicamente a PD1 y (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro, en donde la molécula se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y
10 por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo.

En otro aspecto más, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende (a) más de un resto capaz de unirse específicamente a PD1 y (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí
15 mediante un enlace disulfuro, en donde la molécula se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador
20 peptídico a dicho polipéptido.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende (a) dos restos capaces de unirse específicamente a PD1 y (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro, en donde la molécula se caracteriza por que el primer
25 polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo.

En un aspecto particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene
30 trímero de ligando de la familia de TNF, que comprende

(a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1 y

- (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro, en donde la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido contiene un dominio CH3 y el segundo polipéptido contiene un dominio CH3, respectivamente, y en donde el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al extremo C-terminal del dominio CH3 mediante un enlazador peptídico y en donde el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al extremo C-terminal del dominio CH3 de dicho polipéptido. En particular, dicha molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF comprende dos restos capaces de unirse específicamente a un antígeno de célula diana.
- 15 En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende (a) dos restos capaces de unirse específicamente a PD1 y (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro, en donde la molécula se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo, en donde los dos restos capaces de unirse específicamente a un antígeno de célula diana se unen a dos antígenos de célula diana diferentes.
- 25 En un aspecto adicional, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha definido anteriormente en el presente documento, en donde el resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo y una proteína de unión a antígeno de armazón.
- 30 En un aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, en donde el resto capaz de unirse específicamente a PD1 se selecciona entre el grupo que consiste en un fragmento de anticuerpo, una molécula Fab, una molécula Fab sobrecruzada,

una molécula Fab monocatenaria, una molécula Fv, una molécula scFv, un anticuerpo de un solo dominio, una VH y una proteína de unión a antígeno de armazón. En un aspecto, el resto capaz de unirse específicamente a PD1 es una VH o una proteína de unión a antígeno de armazón. En un aspecto, el resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula
5 diana es una proteína de unión a antígeno de armazón capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana.

En particular, la moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF comprende uno o dos restos capaces de unirse específicamente a PD1.

En un aspecto particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene
10 trímero de ligando de la familia de TNF, en donde el resto capaz de unirse específicamente a PD1 es una molécula Fab o una molécula Fab sobrecruzada capaz de unirse específicamente a PD1. En particular, el resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana es un Fab capaz de unirse específicamente a PD1.

En un aspecto adicional, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene
15 trímero de ligando de la familia de TNF de acuerdo con la invención, en donde un péptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo conectados entre sí por un primer enlazador peptídico se fusiona en su extremo C-terminal al dominio CH1 de una cadena pesada mediante un segundo enlazador peptídico y en la que un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del
20 mismo se fusiona en su extremo C-terminal al dominio CL en una cadena ligera mediante un tercer enlazador peptídico.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de acuerdo con la invención, en donde un péptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos
25 del mismo conectados entre sí por un primer enlazador peptídico se fusiona en su extremo C-terminal al dominio CL de una cadena pesada mediante un segundo enlazador peptídico y en la que un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo se fusiona en su extremo C-terminal al dominio CH1 en una cadena ligera mediante un tercer enlazador peptídico.

30 En un aspecto adicional, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de la familia de ligandos de TNF de acuerdo con la invención, en donde un

péptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo conectados entre sí por un primer enlazador peptídico se fusiona en su extremo C-terminal al dominio CL de una cadena ligera mediante un segundo enlazador peptídico y en la que un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un
 5 fragmento del mismo se fusiona en su extremo C-terminal al dominio CH1 de la cadena pesada mediante un tercer enlazador peptídico.

En un aspecto particular, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF como se ha definido anteriormente, en la que el enlazador peptídico es (G4S)₂. En un aspecto, el primer enlazador peptídico es (G4S)₂
 10 (SEQ ID NO: 117), el segundo enlazador peptídico es GSPGSSSSGS (SEQ ID NO: 122) y el tercer enlazador peptídico es (G4S)₂ (SEQ ID NO: 117). En particular, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de TNF tal como se ha descrito anteriormente, en la que el primer enlazador peptídico es (G4S)₂ (SEQ ID NO: 117), el segundo enlazador peptídico es (G4S)₂ (SEQ ID NO: 117) y el tercer enlazador peptídico es
 15 (G4S)₂ (SEQ ID NO: 117).

En otro aspecto, la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de la familia de ligandos de TNF tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento comprende un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad capaces de asociación estable.

20 En particular, la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de la invención comprende (a) una molécula Fab capaz de unirse específicamente a PD1, en donde la cadena pesada de Fab se fusiona en el extremo C-terminal al extremo N-terminal de un dominio CH2 en el dominio Fc y (c) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad capaces de asociación estable.

25 En un aspecto adicional, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG, en particular de IgG1 o un dominio Fc de IgG4. Más en particular, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1. En un aspecto particular, el dominio Fc comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y segunda subunidad del dominio Fc.

Modificaciones de dominio Fc que reducen la unión a receptor Fc y/o la función 30 efectora

El dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de la familia de

ligandos de TNF de la invención consisten en un par de cadenas polipeptídicas que comprenden dominios de cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina. Por ejemplo, el dominio Fc de una molécula de inmunoglobulina G (IgG) es un dímero, comprendiendo cada subunidad de este los dominios constantes CH2 y CH3 de la cadena pesada de la IgG. Las dos subunidades del dominio Fc son capaces de asociarse de manera estable entre sí.

El dominio Fc confiere propiedades farmacocinéticas favorables a las moléculas de unión a antígeno de la invención, incluyendo una larga semivida en suero que contribuye a una buena acumulación en el tejido diana y una relación de distribución tejido-sangre favorable. A la vez puede, sin embargo, dar lugar a un direccionamiento no deseado de los anticuerpos de la invención a células que expresan receptores de Fc en vez de a las células portadoras de antígeno preferidas. Por consiguiente, en aspectos particulares, el dominio de Fc la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de la familia de ligandos de TNF de la invención muestra una afinidad reducida por un receptor de Fc y/o función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ nativo. En un aspecto, el Fc no se une sustancialmente a un receptor de Fc y/o no induce función efectora. En un aspecto particular el receptor Fc es un receptor Fcγ. En un aspecto, el receptor Fc es un receptor Fc humano. En un aspecto específico, el receptor Fc es un receptor Fcγ activador humano, más específicamente FcγRIIIa humano, FcγRI o FcγRIIa, más específicamente FcγRIIIa humano. En un aspecto, el dominio Fc no induce función efectora. La función efectora reducida puede incluir, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) reducida, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) reducida, fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP) reducida, secreción de citocinas reducida, captación de antígeno mediada por complejo inmune por células presentadoras de antígenos reducida, unión a células NK reducida, unión a macrófagos reducida, unión a monocitos reducida, unión a células polimorfonucleares reducida, señalización directa que induce apoptosis reducida, maduración reducida de células dendríticas o cebado de células T reducido.

En determinados aspectos, pueden introducirse una o más modificaciones en la región Fc de una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de la familia de ligandos de TNF proporcionada en el presente documento, generando de este modo una variante de región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de

aminoácidos.

En un aspecto particular, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende

- (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1,
 - 5 (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro, en donde la molécula se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que está conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende únicamente un ectodominio
 - 10 de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo, y
 - (c) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad capaz de asociarse de manera estable, en donde el dominio Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos que reduce la unión a un receptor de Fc, en particular hacia un receptor Fcγ.
- 15 En un aspecto, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de la familia de ligandos de TNF comprende una o más mutaciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión del dominio Fc a un receptor de Fc y/o la función efectora. Típicamente, están presentes las mismas una o más mutaciones de aminoácidos en cada una de las dos subunidades del dominio Fc. En particular, el dominio Fc comprende una sustitución de
- 20 aminoácidos en una posición de E233, L234, L235, N297, P331 y P329 (numeración EU). En particular, el dominio Fc comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones 234 y 235 (numeración EU) y/o 329 (numeración EU) de las cadenas pesadas de IgG. Más en particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de acuerdo con la invención que comprende un dominio Fc con las
- 25 sustituciones de aminoácidos L234A, L235A y P329G ("P329G LALA", numeración EU) en las cadenas pesadas de IgG. Las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A se refieren a la mutación denominada LALA. La combinación de sustituciones de aminoácidos "P329G LALA" suprime prácticamente por completo la unión a receptor de Fcγ de un dominio Fc de
- 30 IgG1 humana y se describen en la Publicación de la Solicitud de Patente Internacional n.º WO 2012/130831 que también describe métodos para preparar dichos dominios Fc mutantes y métodos para determinar sus propiedades, tales como unión a receptor Fc o funciones

efectoras. La "numeración EU" se refiere a la numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Los dominios Fc con unión a receptor Fc reducida y/o funciones efectoras también incluyen aquellos con sustituciones de uno o más de los restos del dominio Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (Patente de los Estados Unidos n.º 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el mutante de Fc llamado "DANA" con sustitución de los restos 265 y 297 a alanina (Patente de los Estados Unidos n.º 7.332.581).

En otro aspecto, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG4. Los anticuerpos de IgG4 muestran afinidad de unión reducida a los receptores Fc y funciones efectoras reducidas en comparación con anticuerpos de IgG1. En un aspecto más específico, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG4 que comprende una sustitución de aminoácidos en la posición S228 (numeración de Kabat), en particular, la sustitución de aminoácidos S228P. En un aspecto más específico, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG4 que comprende las sustituciones de aminoácidos L235E y S228P y P329G (numeración EU). Dichos mutantes de dominio Fc de IgG4 y sus propiedades de unión a receptor de Fc γ se describen también en el documento WO 2012/130831.

Los dominios Fc mutantes pueden prepararse mediante eliminación, sustitución, inserción o modificación de aminoácidos usando métodos genéticos o químicos bien conocidos en la técnica. Los métodos genéticos pueden incluir mutagénesis de sitio específico de la secuencia de ADN codificante, PCR, síntesis génica y similares. Los cambios de nucleótidos correctos pueden verificarse, por ejemplo, mediante secuenciación.

La unión a receptores Fc puede determinarse fácilmente, por ejemplo, mediante ELISA o mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) usando instrumentación estándar, tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare) y receptores Fc, tales como los que pueden obtenerse mediante expresión recombinante. Un ensayo de unión similar adecuado se describe en el presente documento. Como alternativa, la afinidad de dominios Fc o de moléculas de unión a antígeno biespecíficas que comprenden un dominio Fc para receptores de Fc puede evaluarse usando líneas celulares que se sabe que expresan receptores de Fc particulares, tales como células NK humanas que expresan receptor Fc γ IIIa.

La función efectora de un dominio Fc o de anticuerpos biespecíficos de la invención que comprenden un dominio Fc, puede medirse mediante métodos conocidos en la técnica. En el presente documento se describe un ensayo adecuado para medir la ADCC. Los ejemplos de ensayos *in vitro* para determinar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describen en la Patente de los Estados Unidos n.º 5.500.362; Hellstrom et al. Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) y Hellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); Patente de los Estados Unidos n.º 5.821.337; Bruggemann et al., J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). Como alternativa, pueden emplearse métodos de ensayos no radioactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTITM para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa o además, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal, tal como el divulgado en Clynes et al., Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998).

En algunas realizaciones, la unión del dominio Fc a un componente de complemento, específicamente a C1q, se reduce. Por consiguiente, en algunas realizaciones en las que el dominio Fc está diseñado para tener función efectora reducida, dicha función efectora reducida incluye CDC reducida. Pueden llevarse a cabo ensayos de unión a C1q para determinar si los anticuerpos biespecíficos de la invención son capaces de unirse a C1q y por lo tanto tener actividad de CDC. Véanse, por ejemplo, el ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para determinar la activación de complemento, puede efectuarse un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro et al., J Immunol Methods 202, 163 (1996); Cragg et al., Blood 101, 1045-1052 (2003); y Cragg y Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)).

En un aspecto particular, el dominio Fc comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y segunda subunidad del dominio Fc.

Modificaciones de dominio Fc que promueven la heterodimerización

En un aspecto, la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de la invención comprende (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1,

(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro, en donde la molécula se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo que está conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido
5 comprende únicamente un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo, y (c) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad capaz de asociarse de manera estable, en donde el dominio Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos que reduce la unión a un receptor de Fc, en particular hacia un receptor Fcγ. Por lo tanto, comprenden distintos restos, fusionados a una o a la otra de las
10 dos subunidades del dominio Fc que están típicamente comprendidas en dos cadenas polipeptídicas no idénticas ("cadenas pesadas"). La coexpresión recombinante de estos polipéptidos y la posterior dimerización da lugar a varias combinaciones posibles de los dos polipéptidos. Para mejorar el rendimiento y la pureza de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF en producción recombinante, será
15 ventajoso por lo tanto introducir en el dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de TNF de la invención una modificación que promueva la asociación de los polipéptidos deseados.

Por consiguiente, el dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de la familia de ligandos de TNF de la invención comprende una modificación que promueve
20 la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc. El sitio de interacción proteína-proteína más extensiva entre las dos subunidades de un dominio Fc de IgG humana se encuentra en el dominio CH3 del dominio Fc. Por lo tanto, dicha modificación se encuentra particularmente en el dominio CH3 del dominio Fc.

En un aspecto específico, dicha modificación es una modificación denominada de "pomo en
25 agujero", que comprende una modificación de "pomo" en una de las dos subunidades del dominio Fc y una modificación de "agujero" en la otra de las dos subunidades del dominio Fc. Por lo tanto, en un aspecto particular, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de la familia de ligandos de TNF tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento que comprende una molécula de IgG, en la que la
30 parte Fc de la primera cadena pesada comprende un primer módulo de dimerización y la parte Fc de la segunda cadena pesada comprende un segundo módulo de dimerización que permite una heterodimerización de las dos cadenas pesadas de la molécula de IgG y el segundo módulo de dimerización comprende agujeros de acuerdo con la tecnología de pomos en

agujeros.

La tecnología de pomo en agujero se describe, por ejemplo, en los documentos US 5.731.168; US 7.695.936; Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996) y Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). En general, el método implica introducir una protuberancia ("pomo") en la interfaz de un primer polipéptido y una correspondiente cavidad ("agujero") en la interfaz de un segundo polipéptido, de tal forma que la protuberancia puede posicionarse en la cavidad para promover la formación de heterodímero e impedir la formación de homodímero. Las protuberancias se construyen reemplazando cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz del primer polipéptido con cadenas más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean cavidades compensadoras de tamaño idéntico o similar a las protuberancias en la interfaz del segundo polipéptido sustituyendo cadenas laterales de aminoácidos grandes con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina).

Por consiguiente, en un aspecto particular, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF de la invención se reemplaza un resto de aminoácido con un resto de aminoácido que tenga un mayor volumen de cadena lateral, generando de este modo una protuberancia en el dominio CH3 de la primera subunidad que puede posicionarse en una cavidad en el dominio CH3 de la segunda subunidad y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc se reemplaza un resto de aminoácido con un resto de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de este modo una cavidad en el dominio CH3 de la segunda subunidad en la que puede posicionarse la protuberancia en el dominio CH3 de la primera subunidad.

La protuberancia y la cavidad pueden efectuarse alterando el ácido nucleico que codifica los polipéptidos, por ejemplo, mediante mutagénesis de sitio específico o mediante síntesis peptídica.

En un aspecto específico, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc el resto de treonina en la posición 366 se reemplaza por un resto de triptófano (T366W) y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc el resto de tirosina en la posición 407 se reemplaza por un resto de valina (Y407V). Más en particular, en la segunda subunidad del dominio Fc el resto de treonina en la posición 366 se reemplaza adicionalmente con un resto de serina (T366S) y el resto de leucina en la posición 368 se reemplaza con un resto de alanina (L368A). Más en particular, en la primera subunidad del dominio Fc el resto de serina

en la posición 354 se reemplaza adicionalmente por un resto de cisteína (S354C) y en la segunda subunidad del dominio Fc el resto de tirosina en la posición 349 se reemplaza adicionalmente por un resto de cisteína (Y349C). La introducción de estos dos restos de cisteína da como resultado la formación de un puente disulfuro entre las dos subunidades del dominio Fc. El puente disulfuro estabiliza adicionalmente al dímero (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

En un aspecto alternativo, una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc comprende una modificación que media efectos de direccionamiento electrostático, por ejemplo, tal como se describe en la publicación PCT WO 2009/089004. En general, este método implica el reemplazo de uno o más restos de aminoácidos en la interfaz de las dos subunidades del dominio Fc por medio de restos de aminoácidos cargados de tal forma que la formación de homodímeros es electrostáticamente desfavorable pero la heterodimerización es electrostáticamente favorable.

Modificaciones en los dominios CH1/CL

Para mejorar adicionalmente el emparejamiento correcto, las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de la familia de ligandos de TNF pueden contener diferentes sustituciones de aminoácidos cargados (denominados "restos cargados"). Estas modificaciones se introducen en los dominios CH1 y CL cruzados o no cruzados. En un aspecto particular, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de la familia de ligandos de TNF, en donde en uno de los dominios CL, el aminoácido en la posición 123 (numeración EU) se ha reemplazado por arginina (R) y el aminoácido en la posición 124 (numeración EU) se ha sustituido por lisina (K) y en donde en uno de los dominios CH1 los aminoácidos en la posición 147 (numeración EU) y en la posición 213 (numeración EU) se han sustituido por ácido glutámico (E).

Más en particular, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de la familia de ligandos de TNF, en donde en el dominio CL adyacente al miembro de la familia de ligandos de TNF el aminoácido en la posición 123 (numeración EU) se ha reemplazado por arginina (R) y el aminoácido en la posición 124 (numeración EU) se ha sustituido por lisina (K) y en donde en el dominio CH1 adyacente al miembro de la familia de ligandos de TNF, los aminoácidos en la posición 147 (numeración EU) y en la posición 213 (numeración EU) se han sustituido por ácido glutámico (E).

Por lo tanto, en un aspecto particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende

- (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1,
- (b) un primer polipéptido que contiene un dominio CL que comprende las mutaciones de aminoácidos E123R y Q124K y un segundo polipéptido que contiene un dominio CH1 que comprende las mutaciones de aminoácidos K147E y K213E, en donde el segundo polipéptido está unido al primer polipéptido mediante un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL, y en donde la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al dominio CL mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al dominio CH1 de dicho polipéptido.

15 **Moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de la familia de ligandos de TNF particulares**

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en donde la molécula de unión a antígeno comprende una primera cadena pesada y una primera cadena ligera, comprendiendo ambas una molécula Fab capaz de unirse específicamente a PD1, un primer péptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos de los mismos conectados entre sí mediante un primer enlazador peptídico fusionado en su extremo C-terminal mediante un segundo enlazador peptídico a una segunda cadena pesada o ligera, y un segundo péptido que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF fusionado en su extremo C-terminal mediante un tercer enlazador peptídico a una segunda cadena ligera o pesada, respectivamente.

En un aspecto adicional, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en donde el primer péptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo conectados entre sí mediante un primer enlazador peptídico está fusionado en su extremo C-terminal mediante un segundo enlazador peptídico a un dominio CH1 que forma parte de una

cadena pesada y el segundo péptido que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo está fusionado en su extremo C-terminal mediante un tercer enlazador peptídico a un dominio CL que forma parte de una cadena ligera.

- 5 En otro aspecto más, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en donde el primer péptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo conectados entre sí mediante un primer enlazador peptídico está fusionado en su extremo C-terminal mediante un segundo enlazador peptídico a un dominio CL que forma parte de una cadena pesada,
- 10 y el segundo péptido que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo que está fusionado en su extremo C-terminal mediante un tercer enlazador peptídico a un dominio CH1 que forma parte de una cadena ligera.

- En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene
- 15 trímero de ligando de la familia de TNF, en donde en el dominio CL adyacente al miembro de la familia de ligandos de TNF el aminoácido en la posición 123 (numeración EU) se ha reemplazado por arginina (R) y el aminoácido en la posición 124 (numeración EU) se ha sustituido por lisina (K) y en donde en el dominio CH1 adyacente al miembro de la familia de ligandos de TNF, los aminoácidos en la posición 147 (numeración EU) y en la posición 213
 - 20 (numeración EU) se han sustituido por ácido glutámico (E). Estas modificaciones dan lugar a los denominados restos cargados con propiedades ventajosas que evitan efectos no deseados, tales como, por ejemplo, mal emparejamiento.

En particular, el dominio CL comprende las mutaciones de aminoácidos E123R y Q124K y el dominio CH1 comprende las mutaciones de aminoácidos K147E y K213E.

- 25 En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha definido anteriormente en el presente documento, en donde el resto capaz de unirse específicamente a PD1 es una proteína de unión a antígeno de armazón.

- En un aspecto particular, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que
- 30 contiene trímero de ligando de la familia de TNF como se ha definido anteriormente, en donde el resto capaz de unirse específicamente a PD1 es una molécula Fab capaz de unirse

específicamente a un antígeno de célula diana.

La invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1. En un aspecto particular, la moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de
 5 ligando de la familia de TNF comprende un resto capaz de unirse específicamente a PD1, lo que significa que la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF es monovalente. En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende dos restos capaces de unirse específicamente a PD1, lo que significa que la molécula de unión a
 10 antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF es bivalente.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en donde el resto capaz de unirse específicamente a PD1 comprende

- (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y un dominio VL que comprende (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18,
- 20 (b) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 y un dominio VL que comprende (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31,
- 25 (c) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y un dominio VL que comprende (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39,
- 30 (d) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:

43 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44 y un dominio VL que comprende (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46 y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47,

5 (e) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52 y un dominio VL que comprende (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54

10 y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55, (f) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60 y un dominio VL que comprende (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de

15 SEQ ID NO: 61 (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63 o (g) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68 y un

20 dominio VL que comprende (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69 (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF, en donde el resto capaz de unirse

25 específicamente a PD1 comprende

- (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20,
- (b) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22,
- 30 (c) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23,

- (d) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24,
- (e) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25,
- 5 (f) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33,
- (g) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41,
- (h) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48 y
10 un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49,
- (i) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57,
- (k) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 o
- 15 (l) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en donde el resto capaz de unirse específicamente a PD1 comprende

20

- (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y un dominio VL que comprende (iv) HVR-L1 que
25 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18.

En un aspecto particular, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en donde el resto capaz de unirse

específicamente a PD1 comprende

- (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20,
- 5 (b) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22,
- (c) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23,
- (d) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 o
- 10 (e) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

En un aspecto adicional, el resto capaz de unirse específicamente a PD1 comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96%, 97%, 98%, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una región variable de cadena ligera que comprende una

15 secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96%, 97%, 98%, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22.

En otro aspecto, el resto capaz de unirse específicamente a PD1 comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos

20 aproximadamente un 95 %, 96%, 97%, 98%, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96%, 97%, 98%, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.

En un aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de

25 ligando de la familia de TNF tal como se ha definido anteriormente en el presente documento, en donde el resto capaz de unirse específicamente a PD1 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 o en donde el resto capaz de unirse específicamente a PD1 comprende una cadena pesada variable que

30 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una cadena ligera variable que

comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.

En un aspecto particular, el resto capaz de unirse específicamente a PD1 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22. En otro aspecto particular, el resto capaz de unirse específicamente a PD1 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24. En un aspecto específico, el resto capaz de unirse específicamente a PD1 comprende un dominio VH que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y un dominio VL que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 o un dominio VH que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y un dominio VL que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.

En un aspecto adicional, la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de la invención comprende (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1 que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y (b) una segunda cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO:10 y

una segunda cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

En un aspecto particular, la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de la invención comprende (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1 que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y

(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro, en donde la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

5 En un aspecto adicional, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, en donde la molécula de unión a antígeno comprende

(a) una primera cadena pesada y una primera cadena ligera, comprendiendo ambas una molécula Fab capaz de unirse específicamente a PD1,

10 (b) una segunda cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO:10 y

una segunda cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID
15 NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en donde la molécula de unión a antígeno comprende

(a) una molécula Fab capaz de unirse específicamente a PD1 que comprende una
20 región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y

25 (b) una segunda cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO:10 y

una segunda cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID
30 NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trómero de ligando de la familia de TNF, en donde la molécula de unión a antígeno comprende

5 (a) una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 o

10 una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25 y

(b) una segunda cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 10 y

15 una segunda cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

En un aspecto particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trómero de ligando de la familia de TNF, en donde la molécula de unión a antígeno comprende

20 (i) una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 o

25 una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25,

30 (ii) una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76,

SEQ ID NO: 78 y SEQ ID NO: 80 y
 (iii) una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos
 seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77,
 SEQ ID NO: 79 y SEQ ID NO: 81.

5 En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene
 trímero de ligando de la familia de TNF, en la que la molécula de unión a antígeno comprende

- 10 (a) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID
 NO: 82, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de
 la SEQ ID NO: 83, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de
 aminoácidos de SEQ ID NO: 74 y una segunda cadena ligera que comprende la
 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75,
- 15 (b) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID
 NO: 82, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de
 la SEQ ID NO: 83, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de
 aminoácidos de SEQ ID NO: 76 y una segunda cadena ligera que comprende la
 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77,
- 20 (c) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID
 NO: 82, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de
 la SEQ ID NO: 83, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de
 aminoácidos de SEQ ID NO: 78 y una segunda cadena ligera que comprende la
 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, o
- 25 (d) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID
 NO: 82, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de
 la SEQ ID NO: 83, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de
 aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una segunda cadena ligera que comprende la
 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 81.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que
 contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que la molécula de unión a antígeno
 comprende

- 30 (a) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID

NO: 82, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 171, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75,

- 5 (b) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 171, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77,
- 10 (c) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 171, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, o
- 15 (d) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 171, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 81.
- 20 En particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que la molécula de unión a antígeno comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 83, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78 y una
- 25 segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79.

En un aspecto particular adicional, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que la molécula de unión a antígeno comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 171, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ

ID NO: 79.

En otro aspecto más, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, que comprende

- (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1 y
- 5 (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,
 en donde la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido contiene un dominio CH3 y el segundo polipéptido contiene un dominio CH3, respectivamente, y en donde el primer polipéptido comprende dos
 10 ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al extremo C-terminal del dominio CH3 mediante un enlazador peptídico y en donde el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al extremo C-terminal del
 15 dominio CH3 de dicho polipéptido.

En particular, dicha molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF comprende dos dominios Fab capaces de unirse específicamente a PD1.

- En particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF como se ha descrito anteriormente en el presente documento que
 20 comprende

- (a) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85 y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83 o
- 25 (b) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87 y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83.

- En un aspecto adicional, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene
 30 trímero de ligando de la familia de TNF como se ha descrito anteriormente en el presente

documento que comprende

- (a) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85 y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 171 o
 - (b) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87 y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 171.
- 10 En otro aspecto particular, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, en donde la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF comprende un dominio Fab capaz de unirse específicamente a PD1.
- 15 En dicho aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en donde la molécula de unión a antígeno comprende
 - (i) un polipéptido de fusión que comprende una primera subunidad de un dominio Fc y dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al extremo C-terminal del dominio CH3 mediante un enlazador
 - 20 peptídico, (ii) una cadena pesada que comprende el dominio VH del dominio Fab capaz de unirse específicamente a PD1, una segunda subunidad del dominio Fc y un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado mediante un enlazador peptídico al extremo C-terminal del dominio CH3 y (iii) una cadena
 - 25 ligera que comprende el dominio VL del dominio Fab capaz de unirse específicamente a PD1, o
 - (i) un polipéptido de fusión que comprende una primera subunidad de un dominio Fc y un ectodominio de un miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo que está conectado al extremo C-terminal del dominio CH3 mediante un enlazador peptídico, (ii) una cadena pesada que comprende el dominio VH del dominio Fab capaz de unirse
 - 30 específicamente a PD1, una segunda subunidad del dominio Fc y dos ectodominios de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al extremo C-terminal del dominio CH3 mediante un enlazador peptídico, y (iii) una

cadena ligera que comprende el dominio VL del dominio Fab capaz de unirse específicamente a PD1.

En un aspecto particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en donde la molécula de unión a antígeno comprende

- 5 (a) un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 88, una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83,
- 10 (b) un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89, una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83,
- 15 (c) un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91, una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83 o
- 20 (d) un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93, una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 92 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83.

En otro aspecto particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en donde la molécula de unión a antígeno comprende

- 25 (a) un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 88, una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 171,
- 30 (b) un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89, una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 171,

- (c) un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91, una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 171 o
- 5 (d) un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93, una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 92 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 171.

Polinucleótidos

- 10 La invención proporciona además polinucleótidos aislados que codifican una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha descrito en el presente documento o un fragmento de la misma.

- Los polinucleótidos aislados que codifican moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de TNF de la invención pueden expresarse como un solo nucleótido que
- 15 codifica la molécula de unión a antígeno completa o como múltiples (por ejemplo, dos o más) polinucleótidos que se expresan de manera conjunta. Los polipéptidos codificados por polinucleótidos que se expresan de manera conjunta pueden asociarse a través, por ejemplo, de enlaces disulfuro u otros medios para formar una molécula de unión a antígeno funcional. Por ejemplo, la porción de cadena ligera de una inmunoglobulina puede codificarse por un
- 20 polinucleótido separado a partir de la porción de cadena pesada de la inmunoglobulina. Cuando se expresan de manera conjunta, los polipéptidos de cadena pesada se asociarán con los polipéptidos de cadena ligera para formar la inmunoglobulina.

- En algunos aspectos, el polinucleótido aislado codifica la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF completa de acuerdo con la invención, tal
- 25 como se ha descrito en el presente documento. En particular, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido comprendido en la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de acuerdo con la invención, tal como se ha descrito en el presente documento.

- En un aspecto, la presente invención se refiere a polinucleótidos aislados que codifican una
- 30 molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF, en donde el polinucleótido comprende (a) una secuencia que codifica un resto capaz de unirse

específicamente a PD1, (b) una secuencia que codifica un polipéptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí a través de un enlazador peptídico y (c) una secuencia que codifica un polipéptido que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo.

En otro aspecto, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de 4-1BB, en donde el polinucleótido comprende (a) una secuencia que codifica un resto capaz de unirse específicamente a PD1, (b) una secuencia que codifica un polipéptido que comprende dos ectodominios de 4-1BBL o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y (c) una secuencia que codifica un polipéptido que comprende un ectodominio de 4-1BBL o un fragmento del mismo.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que comprende dos fragmentos de 4-1BBL que comprenden una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 %, 95%, 98 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8 y a un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que comprende un fragmento de 4-1BBL que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90%, 95%, 98 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8.

Además, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de OX40, en donde el polinucleótido comprende (a) una secuencia que codifica un resto capaz de unirse específicamente a PD1, (b) una secuencia que codifica un polipéptido que comprende dos ectodominios de OX40L o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y (c) una secuencia que codifica un polipéptido que comprende un ectodominio de OX40L o un fragmento del mismo.

En aspectos adicionales, la invención se refiere a polinucleótidos que comprenden una secuencia que es al menos aproximadamente un 90 %, 95%, 98 % o 100 % idéntica a las secuencias de ADNc específicas divulgadas en el presente documento. En un aspecto particular, la invención se refiere a un polinucleótido que comprende una secuencia que es

idéntica a una de las secuencias de ADNc específicas divulgadas en el presente documento.

En otros aspectos, la molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos tal como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 32, 33, 40, 41, 48, 49, 56, 57, 64, 65, 72 o 73.

- 5 En un aspecto adicional, la molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos, tal como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 9, 10, 11 o 12.

- En otros aspectos más, la molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 131, 132, 133,
10 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 o 150.

En determinados aspectos, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En otras realizaciones, un polinucleótido de la presente invención es ARN, por ejemplo, en forma de ARN mensajero (ARNm). El ARN de la presente invención puede ser monocatenario o bicatenario.

Métodos recombinantes

- 15 Pueden obtenerse moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de TNF de la invención, por ejemplo, mediante síntesis peptídica en estado sólido (por ejemplo, síntesis en fase sólida de Merrifield) o producción recombinante. Para la producción recombinante, uno o más polinucleótidos que codifican la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de la familia de ligandos de TNF o fragmentos polipeptídicos de la misma, por ejemplo, como
20 se ha descrito anteriormente, se aíslan e insertan en uno o más vectores para clonación adicional y/o expresión en una célula hospedadora. Dicho polinucleótido puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales. En un aspecto de la invención, se proporciona un vector, preferentemente un vector de expresión, que comprende uno o más de los polinucleótidos de la invención. Pueden usarse métodos conocidos para un
25 experto en la materia para construir vectores de expresión que contienen la secuencia codificante de la molécula (o fragmento) de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF junto con señales de control transcripcional/traduccionales adecuadas. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación/recombinación genética *in vivo*. Véase, por ejemplo, las técnicas descritas en
30 Maniatis et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); y Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN

MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y. (1989).

El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus o puede ser un fragmento de ácido nucleico. El vector de expresión incluye un casete de expresión en el que se clona el polinucleótido que codifica la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF o fragmentos polipeptídicos de la misma (es decir, la región codificante) en asociación operativa con un promotor y/u otros elementos de control de la transcripción o la traducción. Tal como se usa en el presente documento, una "región codificante" es una porción de ácido nucleico que consiste en codones traducidos en aminoácidos. Aunque un "codón de terminación" (TAG, TGA o TAA) no se traduce en un aminoácido, puede considerarse parte de una región codificante, si está presente, pero cualquier secuencia flanqueante, por ejemplo, promotores, sitios de unión a ribosomas, terminadores transcripcionales, intrones, regiones 5' y 3' no traducidas y similares, no son parte de una región codificante. Pueden estar presentes dos o más regiones codificantes en una sola construcción de polinucleótido, por ejemplo, en un solo vector o en construcciones de polinucleótido separadas, por ejemplo, en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede contener una sola región codificante o puede comprender dos o más regiones codificantes, por ejemplo, un vector de la presente invención puede codificar uno o más polipéptidos, que se separan post- o co-traduccionalmente en las proteínas finales mediante escisión proteolítica. Además, un vector, polinucleótido o ácido nucleico de la invención puede codificar regiones codificantes heterólogas, bien fusionadas o no fusionadas a un polinucleótido que codifica la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención o fragmentos polipeptídicos de la misma o variantes o derivados de la misma. Las regiones codificantes heterólogas incluyen, sin limitación, elementos o motivos especializados, tales como un péptido de señal secretoria o un dominio funcional heterólogo. Una asociación operativa sucede cuando una región codificante para un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, se asocia con una o más secuencias reguladoras de tal modo que sitúan la expresión del producto génico bajo la influencia o el control de la secuencia reguladora (o las secuencias reguladoras). Dos fragmentos de ADN (tal como una región codificante de polipéptido y un promotor asociado a esta) se "asocian operativamente" si la inducción de la función de promotor da como resultado la transcripción de ARNm que codifica el producto génico deseado y si la naturaleza de la unión entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la capacidad de la expresión de las secuencias reguladoras para dirigir la expresión del producto génico o interferir con la capacidad del molde de ADN para transcribirse. Por lo tanto, una región promotora estará asociada operativamente con un ácido

nucleico que codifica un polipéptido si el promotor es capaz de efectuar la transcripción de ese ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de célula que dirige la transcripción sustancial del ADN solo en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción, aparte de un promotor, por ejemplo, potenciadores, operadores, represores y señales de terminación de la transcripción, pueden asociarse operativamente con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de célula.

Los promotores adecuados y otras regiones de control de la transcripción se divulgan en el presente documento. Los expertos en la técnica conocen una variedad de regiones de control de la transcripción. Estos incluyen, sin limitación, regiones de control de la transcripción, que funcionan en células de vertebrado, tales como, pero sin limitación, segmentos promotores y potenciadores de citomegalovirus (por ejemplo, el promotor temprano intermedio, en conjunción con el intrón A), virus de simio 40 (por ejemplo, el promotor temprano) y retrovirus (tales como, por ejemplo, virus del sarcoma de Rous). Otras regiones de control de la transcripción incluyen aquellas derivadas de genes de vertebrado, tales como actina, proteína de choque térmico, hormona de crecimiento bovino y globina- α de conejo, así como otras secuencias capaces de controlar la expresión génica en células eucariotas. Las regiones de control de la transcripción adecuadas adicionales incluyen promotores específicos de tejido y potenciadores, así como promotores inducibles (por ejemplo, tetraciclinas inducibles por promotores). De manera similar, los expertos habituales en la materia conocen una variedad de elementos de control de la traducción. Estos incluyen, pero sin limitación, sitios de unión a ribosomas, codones de inicio y terminación de la traducción y elementos derivados de sistemas virales (particularmente un sitio de entrada a ribosoma interno, también citado como una secuencia CITE). El casete de expresión también puede incluir otras características, tales como un origen de replicación y/o elementos de integración cromosómica, tales como repeticiones terminales largas retrovíricas (LTR) o repeticiones terminales invertidas (ITR) de virus adenoasociados (AAV).

Las regiones codificantes del polinucleótido y ácido nucleico de la presente invención pueden asociarse con regiones codificantes adicionales que codifican péptidos secretorios o de señal, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido de la presente invención. Por ejemplo, si se desea la secreción de la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF o de fragmentos de la misma, puede situarse el ADN que codifica una secuencia de señal cadena arriba del ácido nucleico que codifica una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF o

- fragmentos polipeptídicos de la misma. De acuerdo con la hipótesis de la señal, las proteínas secretadas por células de mamífero tienen un péptido de señal o secuencia líder secretoria que se escinde de la proteína madura una vez que se ha iniciado la exportación de la cadena de proteína en crecimiento a través del retículo endoplasmático rugoso. Los expertos en la
- 5 materia son conscientes de que los polipéptidos secretados por células de vertebrado generalmente tienen un péptido de señal fusionado al extremo N-terminal del polipéptido, que se escinde del polipéptido traducido para producir una forma secretada o "madura" del polipéptido. En determinadas realizaciones, se usa el péptido de señal nativo, por ejemplo, un
- 10 péptido de señal de cadena pesada o de cadena ligera de inmunoglobulina o un derivado funcional de esa secuencia que conserve la capacidad para dirigir la secreción del polipéptido que está asociado operablemente con esta. Como alternativa, puede usarse un péptido de señal heterólogo de mamífero o un derivado funcional del mismo. Por ejemplo, la secuencia líder de tipo silvestre puede sustituirse con la secuencia líder del activador de plasminógeno de tejido humano (TPA) o de β -glucuronidasa de ratón.
- 15 Puede incluirse ADN que codifica una secuencia corta de proteína que puede usarse para facilitar la purificación posterior (por ejemplo, un marcador de histidina) o asistir en el marcado de la proteína de fusión dentro o en los extremos del polinucleótido que codifica una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF o fragmentos polipeptídicos de la misma.
- 20 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una célula hospedadora que comprende uno o más polinucleótidos de la invención. En determinadas realizaciones, se proporciona una célula hospedadora que comprende uno o más vectores de la invención. Los polinucleótidos y vectores pueden incorporar cualquiera de las características, por separado o en combinación, descritas en el presente documento en relación a polinucleótidos y vectores,
- 25 respectivamente. En un aspecto, una célula hospedadora comprende (por ejemplo, se ha transformado o transfectado con) un vector que comprende un polinucleótido que codifica (parte de) una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "célula hospedadora" se refiere a cualquier tipo de sistema celular que pueda modificarse por
- 30 ingeniería genética para generar las proteínas de fusión de la invención o fragmentos de las mismas. Las células hospedadoras adecuadas para replicar y para soportar la expresión de moléculas de unión a antígeno se conocen bien en la técnica. Dichas células pueden transfectarse o transducirse según sea necesario con el vector de expresión particular y pueden

cultivarse grandes cantidades de células que contienen vector para sembrar fermentadores a gran escala para obtener cantidades suficientes de la molécula de unión a antígeno para aplicaciones clínicas. Las células hospedadoras adecuadas incluyen microorganismos procariotas, tales como *E coli* o diversas células eucariotas, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células de insecto o similares. Por ejemplo, los polipéptidos pueden producirse en bacterias, en particular cuando no se necesita la glucosilación. Después de la expresión, el polipéptido puede aislarse a partir de la pasta celular bacteriana en una fracción soluble y puede purificarse adicionalmente. Además de procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras son adecuados para clonación u hospedadores de expresión para vectores que codifican polipéptidos, incluyendo cepas de hongos y levaduras cuyas vías de glucosilación se han "humanizado", lo que da como resultado la producción de un polipéptido con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véase Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004) y Li et al., Nat Biotech 24, 210-215 (2006).

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de polipéptidos (glucosilados) también se derivan de organismos multicelulares (vertebrados e invertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas baculovirales que pueden usarse en conjunción con células de insecto, especialmente para transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También pueden utilizarse cultivos de células vegetales como hospedadores. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas). Las células de vertebrados también pueden usarse como hospedadores. Por ejemplo, pueden ser útiles células de mamífero que están adaptadas para crecer en suspensión. Otros ejemplos de células de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono trasformada mediante SV40 (COS-7); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293T tal como se describen, por ejemplo, en Graham et al., J Gen Virol 36, 59 (1977)), células de riñón de cría de hámster (BHK), células de sertoli de ratón (células TM4 tal como se describen, por ejemplo, en Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980)), células de riñón de mono (CV1), células de riñón de mono verde africano (VERO-76), células de carcinoma de cuello de útero humano (HELA), células de riñón canino (MDCK), células de hígado de rata búfalo (BRL 3A), células de pulmón humano (W138), células de hígado humano (Hep G2), células de tumor mamario de ratón (MMT 060562), células TRI (tal como se describen, por ejemplo, en Mather et al., Annals N.Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982)), células MRC 5 y células FS4. Otras líneas celulares de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO),

incluyendo células CHO dhfr- (Urlaub, Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma, tales como YO, NS0, P3X63 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas celulares de mamífero hospedadoras adecuadas para la producción de proteínas, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), págs. 255-268 (2003). Las células hospedadoras incluyen células cultivadas, por ejemplo, células de mamífero cultivadas, células de levadura, células de insecto, células bacterianas y células vegetales, por nombrar solo algunas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, planta transgénica o planta cultivada o tejido animal. En una realización, la célula hospedadora es una célula eucariota, preferentemente una célula de mamífero, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO), una célula de riñón embrionario humano (HEK) o una célula linfoide (por ejemplo, YO, NS0, Sp20). Se conocen tecnologías estándar en la técnica para expresar genes exógenos en estos sistemas. Las células que expresan un polipéptido que comprende bien la cadena pesada o la cadena ligera de una inmunoglobulina, pueden modificarse por ingeniería genética para también expresar la otra de las cadenas de inmunoglobulina de tal forma que el producto expresado es una inmunoglobulina que tiene tanto una cadena ligera como una cadena pesada.

En un aspecto, se proporciona un método para producir una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF o fragmentos polipeptídicos de la misma, comprendiendo el método cultivar una célula hospedadora que comprende polinucleótidos que codifican la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención o fragmentos polipeptídicos de la misma, tal como se proporciona en el presente documento, en condiciones adecuadas para la expresión de la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención o fragmentos polipeptídicos de la misma y recuperar la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención o fragmentos polipeptídicos de la misma de la célula hospedadora (o medio de cultivo de la célula hospedadora).

En la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención, los componentes (al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana, un polipéptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo y un polipéptido que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo) no están fusionados genéticamente entre sí. Los polipéptidos se diseñan de tal forma que sus componentes (dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o

fragmentos del mismo y otros componentes, tales como CH o CL) se fusionan entre sí directamente o a través de una secuencia enlazadora. La composición y longitud del enlazador puede determinarse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica y puede ensayarse respecto de su eficacia. Los ejemplos de secuencias enlazadoras entre diferentes componentes

5 de las moléculas de unión a antígeno de la invención se encuentran en las secuencias proporcionadas en el presente documento. También pueden incluirse secuencias adicionales para incorporar un sitio de escisión para separar los componentes individuales de la proteína de fusión si se desea, por ejemplo, un sitio de reconocimiento de endopeptidasa.

En determinadas realizaciones, los restos capaces de unirse específicamente a un antígeno de

10 célula diana (por ejemplo, fragmentos Fab) que forman parte de la molécula de unión a antígeno comprenden al menos una región variable de inmunoglobulina capaz de unirse a un antígeno. Las regiones variables pueden formar parte y proceder de anticuerpos de origen natural o no natural y fragmentos de los mismos. Los métodos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y

15 Lane, "Antibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Los anticuerpos de origen no natural pueden construirse usando síntesis peptídica en fase sólida, pueden producirse de manera recombinante (por ejemplo, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos n.º 4.186.567, por ejemplo, explorando bibliotecas combinatorias que comprenden cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables (véase la Patente de los

20 Estados Unidos n.º 5.969.108 de McCafferty).

Pueden usarse inmunoglobulinas de cualquier especie animal en la invención. Las inmunoglobulinas no limitantes útiles en la presente invención pueden ser de origen murino, de primate, o de ser humano. Si la proteína de fusión está prevista para su uso en seres humanos, puede usarse una forma quimérica de la inmunoglobulina en la que las regiones

25 constantes de la inmunoglobulina son de un humano. Una forma humanizada o completamente humana de la inmunoglobulina también puede prepararse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 5.565.332 de Winter). La humanización puede lograrse mediante varios métodos incluyendo, pero sin limitación (a) injerto de las CDR no humanas (por ejemplo, anticuerpo

30 donante) en regiones marco conservadas y constantes humanas (por ejemplo, anticuerpo receptor) con o sin retención de restos marco conservados críticos (por ejemplo, aquellos que son importantes para mantener una buena afinidad de unión a antígeno o funciones de anticuerpo), (b) injerto solo de las regiones determinantes de la especificidad no humanas

(SDR o a-CDR; los restos críticos para la interacción antígeno-anticuerpo) en regiones marco conservadas y constantes humanas o (c) trasplantar los dominios variables no humanos completos, pero "revistiéndolos" con una sección similar a humana mediante sustitución de restos superficiales. Los anticuerpos humanizados y métodos para prepararlos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, *Front Biosci* 13, 1619-1633 (2008) y se describen adicionalmente, por ejemplo, en Riechmann et al., *Nature* 332, 323-329 (1988); Queen et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 10029-10033 (1989); Patentes de los Estados Unidos n.º 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Jones et al., *Nature* 321, 522-525 (1986); Morrison et al., *Proc Natl Acad Sci* 81, 6851-6855 (1984); Morrison y Oi, *Adv Immunol* 44, 65-92 (1988); Verhoeven et al., *Science* 239, 1534-1536 (1988); Padlan, *Molec Immun* 31(3), 169-217 (1994); Kashmiri et al., *Methods* 36, 25-34 (2005) (que describe el injerto de SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol Immunol* 28, 489-498 (1991) (que describe la "reformación de superficies"); Dall'Acqua et al., *Methods* 36, 43-60 (2005) (que describe el "reordenamiento de FR"); y Osbourn et al., *Methods* 36, 61-68 (2005) y Klimka et al., *Br J Cancer* 83, 252-260 (2000) (que describe el enfoque de "selección guiada" para el reordenamiento de FR). Las inmunoglobulinas particulares de acuerdo con la invención son inmunoglobulinas humanas. Los anticuerpos humanos y las regiones variables humanas pueden producirse usando varias técnicas conocidas en la materia. Los anticuerpos humanos se describen de manera general en van Dijk y van de Winkel, *Curr Opin Pharmacol* 5, 368-74 (2001) y Lonberg, *Curr Opin Immunol* 20, 450-459 (2008). Las regiones variables humanas pueden formar parte y derivarse de anticuerpos monoclonales humanos producidos por el método de hibridoma (véase, por ejemplo, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)). Los anticuerpos humanos y regiones variables humanas pueden prepararse también administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a provocación antigénica (véase, por ejemplo, Lonberg, *Nat Biotech* 23, 1117-1125 (2005)). Los anticuerpos humanos y las regiones variables humanas también pueden generarse aislando secuencias de región variable de clon de Fv seleccionadas de bibliotecas de presentación de fagos derivadas de seres humanos (véase, por ejemplo, Hoogenboom et al. en *Methods in Molecular Biology* 178, 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001); y McCafferty et al., *Nature* 348, 552-554; Clackson et al., *Nature* 352, 624-628 (1991)). El fago presenta típicamente fragmentos de anticuerpo, ya sea como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o como fragmentos Fab.

En determinados aspectos, los restos capaces de unirse específicamente a un antígeno de

célula diana (por ejemplo, fragmentos Fab) comprendidos en las moléculas de unión a antígeno de la presente invención están modificadas por ingeniería genética para que tengan afinidad de unión potenciada de acuerdo con, por ejemplo, los métodos descritos en la publicación PCT WO 2012/020006 (véanse los Ejemplos relacionados con la maduración de afinidad) o la Solicitud Publicada de Patente de los Estados Unidos n.º 2004/0132066. La capacidad de las moléculas de unión a antígeno de la invención para unirse a un determinante antigénico específico puede medirse bien a través de un ensayo inmunoabsorbente acoplado a enzimas (ELISA) u otras técnicas familiares para un experto en la materia, por ejemplo, la técnica de resonancia de plasmón superficial (Liljeblad, et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)) y ensayos de unión tradicionales (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). Pueden usarse ensayos de competición para identificar una molécula de unión a antígeno que compite con un anticuerpo de referencia por la unión a un antígeno particular. En determinadas realizaciones, dicha molécula de unión a antígeno competidora se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o conformacional) que está unido por la molécula de unión a antígeno de referencia. Los métodos ejemplares detallados para mapear un epítipo al que se une una molécula de unión a antígeno se proporcionan en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). En un ensayo de competición ejemplar, se incuba antígeno inmovilizado en una solución que comprende una primera molécula de unión a antígeno marcada que se une al antígeno a una segunda molécula de unión a antígeno no marcada que se está ensayando respecto de su capacidad para competir con la primera molécula de unión a antígeno por la unión al antígeno. La segunda molécula de unión a antígeno puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incuba antígeno inmovilizado en una solución que comprende la primera molécula de unión a antígeno marcada pero no la segunda molécula de unión a antígeno no marcada. Después de la incubación en condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo al antígeno, se retira el exceso de anticuerpo no unido y se mide la cantidad de etiqueta asociada con el antígeno inmovilizado. Si la cantidad del marcador asociado con el antígeno inmovilizado se reduce sustancialmente en la muestra de ensayo en relación a la muestra de control, entonces esto indica que la segunda molécula de unión a antígeno está compitiendo con la primera molécula de unión a antígeno por la unión al antígeno. Véase Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* cap. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de TNF de la invención preparadas tal como se describe en el presente documento pueden purificarse mediante

técnicas conocidas en la materia, tales como cromatografía líquida de alto rendimiento, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaños y similares. Las condiciones reales usadas para purificar una proteína dependerán, en parte, de factores tales como la carga neta, hidrofobia, hidrofilia, etc. y serán evidentes para los expertos en la materia. Para la purificación por cromatografía de afinidad, puede usarse un anticuerpo, ligando, receptor o antígeno al que se une la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF. Por ejemplo, para la purificación por cromatografía de afinidad de las proteínas de fusión de la invención, puede usarse una matriz con proteína A o proteína G. Pueden usarse cromatografía de afinidad a proteína A o G secuencial y cromatografía de exclusión por tamaño para aislar una molécula de unión a antígeno esencialmente como se describe en los ejemplos. Puede determinarse la pureza de la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF o fragmentos de la misma mediante cualquiera de una diversidad de métodos analíticos bien conocidos, incluyendo electroforesis en gel, cromatografía líquida de alta presión y similares. Por ejemplo, las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de TNF expresadas tal como se describe en los ejemplos demostraron estar intactas y ensambladas correctamente, tal como se demostró mediante SDS-PAGE reductora y no reductora.

Ensayos

Las moléculas de unión a antígeno proporcionadas en el presente documento pueden identificarse, explorarse o caracterizarse según sus propiedades físicas y químicas y/o actividades biológicas mediante varios ensayos conocidos en la técnica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, la capacidad para potenciar la activación y/o proliferación de diferentes células inmunitarias, especialmente células T. Por ejemplo, potencian la secreción de citocinas inmunomoduladoras (por ejemplo, interferón gamma (IFN-gamma) y/o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa)). Otras citocinas inmunomoduladoras que se potencian o pueden potenciarse son, por ejemplo, IL-12, granzima B, etc. La actividad biológica también puede incluir reactividad cruzada de unión con cinomolgo, así como unión a diferentes tipos celulares. También se proporcionan moléculas de unión a antígeno que tienen dicha actividad *in vivo* y/o *in vitro*.

1. Ensayos de afinidad

La afinidad de la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia

de TNF proporcionada en el presente documento por el correspondiente receptor de TNF puede determinarse de acuerdo con los métodos expuestos en los ejemplos, mediante resonancia de plasmón superficial (SPR), usando instrumentación estándar, tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare) y receptores o proteínas diana, tales como los que pueden obtenerse mediante expresión recombinante. La afinidad de la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF por PD1 también puede determinarse mediante resonancia de plasmón superficial (SPR), usando instrumentación estándar, tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare) y receptores o proteínas diana, tales como los que pueden obtenerse mediante expresión recombinante. Una realización ilustrativa específica y ejemplar para medir la afinidad de unión se describe en el ejemplo 4. De acuerdo con un aspecto, la K_D se mide mediante resonancia de plasmón superficial usando una máquina BIACORE® T100 (GE Healthcare) a 25 °C.

2. Ensayos de unión y otros ensayos

La unión de la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF proporcionada en el presente documento a las correspondientes células que expresan receptor puede evaluarse usando líneas celulares que expresan el receptor particular o antígeno diana, por ejemplo, mediante citometría de flujo (FACS). En un aspecto, se usan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que expresan el receptor de TNF en el ensayo de unión. Estas células se usan directamente después de su aislamiento (PBMC no expuestos previamente) o después de su activación (PBMC activados). En otro aspecto, se usaron esplenocitos activados de ratón (que expresan la molécula receptora de TNF) para demostrar la unión de la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención a las correspondientes células que expresan receptor de TNF.

En un aspecto adicional, se usaron líneas celulares que expresan PD1 para demostrar la unión de las moléculas de unión a antígeno a este antígeno de célula diana.

En otro aspecto, pueden usarse ensayos de competición para identificar una molécula de unión a antígeno que compite con un anticuerpo específico o molécula de unión a antígeno por la unión a la diana o receptor de TNF, respectivamente. En determinadas realizaciones, dicha molécula de unión a antígeno competidora se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o conformacional) que se une mediante un anticuerpo específico anti-diana o un anticuerpo específico anti-receptor de TNF. Los métodos ejemplares detallados para mapear un epítipo al que se une un anticuerpo se proporcionan en Morris (1996) "Epitope Mapping

Protocols", en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

3. Ensayos de actividad

En un aspecto, se proporcionan ensayos para identificar moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF que se unen a una diana específica y a un receptor de TNF específico que tienen actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, señalización agonista a través del receptor de TNF en células que expresan el antígeno de célula diana. También se proporcionan moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF en las que se identifica mediante los ensayos que tienen dicha actividad *in vitro*.

- En determinados aspectos, se ensaya una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención respecto de dicha actividad biológica. Los ensayos para detectar la actividad biológica de las moléculas de la invención son aquellos descritos en los ejemplos 5 y 6. Además, se conocen bien en la técnica ensayos para detectar la lisis celular (por ejemplo, mediante la medición de la liberación de LDH), la cinética de la apoptosis inducida (por ejemplo, mediante la medición de la actividad de caspasa 3/7) o la apoptosis (por ejemplo, usando el ensayo TUNEL). Además, la actividad biológica de dichos complejos puede determinarse evaluando sus efectos en la supervivencia, proliferación y secreción de linfocinas de diversos subconjuntos de linfocitos, tales como células NK, células NKT o células T $\gamma\delta$ o evaluando su capacidad para modular el fenotipo y función las células presentadoras de antígenos, tales como las células dendríticas, los monocitos/macrófagos o las células B.

Composiciones farmacéuticas, Formulaciones y rutas de administración

- En un aspecto adicional, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF proporcionadas en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los métodos terapéuticos siguientes. En una realización, una composición farmacéutica comprende cualquiera de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF proporcionadas en el presente documento y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En otra realización, una composición farmacéutica comprende cualquiera de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF proporcionadas en el presente documento y al menos

un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe más adelante.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas de *unión* a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF disueltas o dispersadas en un excipiente farmacéuticamente

5 acceptable. Las expresiones "farmacéuticamente o farmacológicamente acceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que generalmente no son tóxicas para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, es decir, no producen una reacción adversa, alérgica o negativa distinta cuando se administran a un animal, tales como, por ejemplo, un ser humano, según sea adecuado. La preparación de una composición farmacéutica que

10 contiene al menos una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF y opcionalmente un ingrediente activo adicional será conocida para los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación, tal como se ejemplifica por Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Ed. Mack Printing Company, 1990, incorporada al presente documento por referencia. En particular, las composiciones son formulaciones

15 liofilizadas o soluciones acuosas. Tal como se usa en el presente documento, un "excipiente farmacéuticamente acceptable" incluye a cualquiera y a todos los disolventes, tampones, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterias, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, sales, estabilizantes y combinaciones de los mismos, como sabrá un experto habitual en la materia.

20 Las composiciones parenterales incluyen aquellas diseñadas para su administración mediante inyección, por ejemplo, subcutánea, intradérmica, intralesional, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intratecal o intraperitoneal. Para inyección, las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF de la invención pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como

25 solución de Hanks, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. La solución puede contener agentes formulatorios, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, las proteínas de fusión pueden estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso. Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando las proteínas de fusión

30 de la invención en la cantidad necesaria en el disolvente adecuado con varios de los otros ingredientes enumerados a continuación, según sea necesario. Puede lograrse fácilmente la esterilidad, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. En general, las dispersiones se preparan incorporando los varios principios activos esterilizados

en un vehículo estéril que contiene el medio básico de dispersión y/o los otros ingredientes. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, suspensiones o emulsiones, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío o criodesecación que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de un medio líquido esterilizado por filtración del mismo. El medio líquido debe estar tamponado de manera adecuada en caso necesario y el diluyente líquido se hará primeramente isotónico antes de la inyección con suficiente suero salino o glucosa. La composición debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se apreciará que la contaminación por endotoxinas debe mantenerse al mínimo a un nivel seguro, por ejemplo, menos de 0,5 ng/mg de proteína. Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero sin limitación: tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como polietilenglicol (PEG). Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener compuestos que aumenten la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol, dextrano o similares. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizantes adecuados o agentes que aumenten la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones elevadamente concentradas. Además, las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse como suspensiones para inyección oleosas adecuadas. Los disolventes lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos o liposomas.

Los principios activos pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas

de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco en forma coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences 18a Ed. Mack Printing Company, 1990). Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen al polipéptido, matrices que tienen la forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. En realizaciones particulares, puede lograrse la absorción prolongada de una composición inyectable mediante el uso de agentes que retrasen la absorción en las composiciones, tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina o combinaciones de los mismos.

Los excipientes ejemplares farmacéuticamente aceptables en el presente documento incluyen adicionalmente agentes de dispersión de fármacos intersticiales, tales como glucoproteínas de hialuronidasa neutros-activos solubles (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa PH-20 solubles humanas, tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Determinados sHASEGP y métodos de uso, incluyendo rHuPH20, se describen en las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos n.º 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, se combina un sHASEGP con uno o más glucosaminosacáridos adicionales, tales como condroitinasas.

Las formulaciones de anticuerpo ilustrativas se describen en la Patente de los Estados Unidos n.º 6.267.958. Las formulaciones acuosas de anticuerpo incluyen aquellas descritas en la Patente de los Estados Unidos n.º 6.171.586 y en el documento WO2006/044908, incluyendo estas últimas formulaciones un tampón de histidina-acetato.

Además de las composiciones descritas anteriormente, también pueden formularse las proteínas de fusión como una preparación de depósito. Dichas formulaciones de larga duración pueden administrarse mediante implante (por ejemplo, subcutáneo o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, Las proteínas de fusión pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico o en forma de derivados muy poco solubles, por ejemplo, una sal muy poco soluble.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas de fusión de la invención pueden fabricarse mediante mezclado convencional, disolución, emulsión, encapsulación,

atrapamiento o procesos de liofilización. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de manera convencional en uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológicamente aceptables que faciliten el procesamiento de las proteínas en preparaciones que puedan usarse farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de
5 administración elegida.

Las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF pueden formularse en una composición en forma de ácido libre, neutra o en forma de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables son sales que mantienen sustancialmente la actividad biológica del ácido o base libre. Estas incluyen las sales de adición de ácido, por ejemplo,
10 aquellas formadas con los grupos amino libres de una composición proteica o que se forman con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, los ácidos clorhídrico o fosfórico o ácidos orgánicos, tales como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también puede derivarse de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos; o bases orgánicas, tales como
15 isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína. Las sales farmacéuticas tienen a ser más solubles en disolventes acuosos y otros disolventes próticos que las correspondientes formas de base libre.

La composición en el presente documento también puede contener más de un principio activo según sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferentemente
20 aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Dichos principios activos están presentes de manera adecuada en combinaciones en cantidades que son eficaces para el fin previsto.

Las formulaciones que se van a usar para la administración *in vivo* son, generalmente, estériles. Puede lograrse fácilmente la esterilidad, por ejemplo, mediante filtración a través de
25 membranas de filtración estériles.

Métodos terapéuticos y composiciones

Puede usarse en métodos terapéuticos cualquiera de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF.

Para su uso en métodos terapéuticos, las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero
30 de ligando de la familia de TNF de la invención pueden formularse, dosificarse y administrarse de un modo coherente con la buena práctica médica. Los factores a tener en

cuenta en este contexto incluyen el trastorno particular que se va a tratar, el mamífero particular que se va a tratar, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la pauta de administración y otros factores conocidos para los profesionales sanitarios.

- 5 En un aspecto, se proporcionan moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF de la invención para su uso como medicamento. En aspectos adicionales, se proporcionan moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF para su uso en el tratamiento de una enfermedad, particularmente para su uso en el tratamiento del cáncer. En determinados aspectos, se proporcionan moléculas de
- 10 unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF para su uso en un método de tratamiento. En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite. En determinados aspectos, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia
- 15 de TNF para su uso en un método para tratar a un individuo que tiene una enfermedad que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión. En determinados aspectos, la enfermedad que se va a tratar es cáncer. Los ejemplos de cánceres incluyen tumores sólidos, cáncer de vejiga, carcinoma de células renales, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de mama,
- 20 cáncer de ovario, cáncer uterino, cáncer de cuello de útero, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer sanguíneo, cáncer de piel, carcinoma de células escamosas, cáncer óseo y cáncer riñón, melanoma, linfoma de linfocitos B, leucemia de células B, linfoma no Hodgkin y leucemia linfoblástica aguda. Por lo tanto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que
- 25 contiene trímero de ligando de la familia de TNF para su uso en el tratamiento del cáncer. El sujeto, paciente o "individuo" que necesita tratamiento es típicamente un mamífero, más específicamente un ser humano.

- En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF para su uso en el tratamiento enfermedades infecciosas, en
- 30 particular para el tratamiento de infecciones víricas. En un aspecto adicional, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF para su uso en el tratamiento enfermedades autoinmunitarias, tales como, por ejemplo, la enfermedad de Lupus.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF en la fabricación o preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite. En un aspecto, el medicamento es para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad que

5 comprende administrar a un individuo que tenga la enfermedad una cantidad terapéuticamente eficaz del medicamento. En determinadas realizaciones, la enfermedad que se va a tratar es un trastorno proliferativo, particularmente cáncer. Por lo tanto, en un aspecto, la invención se refiere al uso de una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del

10 cáncer. Los ejemplos de cánceres incluyen tumores sólidos, cáncer de vejiga, carcinoma de células renales, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer uterino, cáncer de cuello de útero, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer sanguíneo, cáncer de piel, carcinoma de células escamosas,

15 cáncer óseo y cáncer riñón, melanoma, linfoma de linfocitos B, leucemia de células B, linfoma no Hodgkin y leucemia linfoblástica aguda. Otros trastornos proliferativos celulares que pueden tratarse usando una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la presente invención incluyen, pero sin limitación, neoplasias localizadas en: el abdomen, hueso, mama, sistema digestivo, hígado, páncreas, peritoneo,

20 glándulas endocrinas (adrenales, paratiroides, pituitaria, testículos, ovario, timo, tiroides), ojo, cabeza y cuello, sistema nervioso (central y periférico), sistema linfático, pelvis, piel, tejidos blandos, bazo, región torácica y sistema urogenital. También se incluyen afecciones o lesiones precancerosas y metástasis cancerosas. En determinadas realizaciones, el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de células renales, cáncer de piel, cáncer de pulmón,

25 cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello. Un experto en la materia reconocerá que en algunos casos la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF puede no proporcionar una cura, sino solo proporcionar un beneficio parcial. En algunos aspectos, también se considera terapéuticamente beneficioso un cambio fisiológico que tenga cierto beneficio. Por lo tanto,

30 en algunos aspectos, una cantidad de molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que proporcione un cambio fisiológico se considera como una "cantidad eficaz" o como una "cantidad terapéuticamente eficaz".

En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha descrito en el presente

documento en la fabricación o preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas, en particular para el tratamiento de infecciones virales o para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, la enfermedad de Lupus.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad en un individuo, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención. En un aspecto, se administra una composición a dicho individuo, que comprende una proteína de fusión de la invención en una forma farmacéuticamente aceptable. En determinados aspectos, la enfermedad que se va a tratar es un trastorno proliferativo. En un aspecto particular, la enfermedad es cáncer. En otro aspecto, la enfermedad es una enfermedad infecciosa o una enfermedad autoinmunitaria. En determinados aspectos, el método comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente anticáncer si la enfermedad que va a tratarse es cáncer. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano.

Para la prevención o tratamiento de una enfermedad, la dosificación adecuada de una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención (cuando se usa sola o en combinación con otros uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, la ruta de administración, del peso corporal del paciente, del tipo de molécula de unión a antígeno, de la gravedad y curso de la enfermedad, independientemente de si la proteína de fusión se administrar con fines preventivos o terapéuticos, de intervenciones terapéuticas anteriores o concurrentes, el historial clínico del paciente y la respuesta a la proteína de fusión y del criterio del médico adjunto. El médico responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la concentración de ingrediente activo (o ingredientes activos) en una composición y la dosis adecuada para el sujeto individual. Se contemplan en el presente documento varias pautas de dosificación incluyendo, pero sin limitación a administraciones individuales o múltiples a lo largo de varios instantes, administración de bolo e infusión pulsada.

La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF se administra de manera adecuada al paciente de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, una dosis de aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg - 10 mg/kg) de molécula de unión a antígeno que contiene trímero de la familia de TNF puede ser una dosis inicial posible

para su administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica estará en el intervalo de aproximadamente 1 µg/g a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o un periodo mayor,

5 dependiendo de la afección, el tratamiento será generalmente sostenido hasta que suceda una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Una dosificación ejemplar de la proteína de fusión puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,005 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. En otros ejemplos, una dosis también puede comprender de aproximadamente 1 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 5 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 10

10 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 50 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 200 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 350 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 500 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 100

15 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 350 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal, a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal o más por administración y cualquier intervalo derivable intermedio. En ejemplos de un intervalo derivable de los números listados en el presente documento, puede administrarse un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg de

20 peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 5 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal, etc., basándose en los números descritos anteriormente. Por lo tanto, pueden administrarse una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 5,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) al paciente. Dichas dosis pueden administrarse de manera intermitente, por

25 ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de tal modo que el paciente recibe de aproximadamente dos a aproximadamente veinte o por ejemplo, aproximadamente seis dosis de la proteína de fusión). Puede usarse una dosis inicial de carga más alta, seguida de una o más dosis más bajas. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

30 Las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF de la invención se usarán generalmente en una cantidad eficaz para lograr el fin previsto. Para su uso en el tratamiento o prevención de una patología, la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF o las composiciones farmacéuticas de la misma, se administran o aplican en una cantidad terapéuticamente eficaz. La determinación

de la cantidad terapéuticamente eficaz se encuentra dentro de las capacidades de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

Para administración sistémica, puede estimarse inicialmente una dosis terapéuticamente eficaz a partir de ensayos *in vitro*, tales como ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración circulante que incluya la CI_{50} determinada en cultivo celular. Dicha información puede usarse para determinar de manera más precisa las dosis útiles en seres humanos.

Las dosis iniciales también pueden estimarse a partir de datos *in vivo*, por ejemplo, modelos animales, usando técnicas que se conocen bien en la materia. Un experto habitual en la materia podrá fácilmente optimizar la administración a seres humanos basándose en datos de animales.

La cantidad de dosificación e intervalo se ajustarán individualmente para proporcionar niveles en plasma de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF que sean suficientes para mantener el efecto terapéutico. Las dosificaciones de paciente habituales para su administración mediante inyección están en el intervalo de 0,1 a 50 mg/kg/día, típicamente de aproximadamente 0,5 a 1 mg/kg/día. Los niveles en plasma terapéuticamente eficaces pueden lograrse administrando múltiples dosis cada día. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, por HPLC.

En los casos de administración local o captación selectiva, la concentración local eficaz de la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de la familia de TNF puede no estar relacionada con la concentración en plasma. Un experto en la materia será capaz de optimizar dosis locales terapéuticamente eficaces sin experimentación innecesaria.

Una dosis terapéuticamente eficaz de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF descritas en el presente documento proporcionarán generalmente un beneficio terapéutico sin causar toxicidad sustancial. La toxicidad y la eficacia terapéutica de una proteína de fusión puede terminarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivo celular o animales experimentales. Los ensayos en cultivo celular y estudios en animales pueden usarse para determinar la DL_{50} (la dosis letal para el 50 % de una población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de una población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico,

- que puede expresarse como la relación DL_{50}/DE_{50} . Se prefieren las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF que muestran altos índices terapéuticos. En una realización, la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de la familia de TNF de acuerdo con la presente invención muestra un alto índice terapéutico. Los
- 5 datos obtenidos de ensayos de cultivos celulares y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificaciones adecuadas para su uso en seres humanos. La dosificación se encuentra preferentemente dentro del intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de una variedad de factores, por ejemplo, la forma de dosificación
- 10 empleada, la vía de administración utilizada, el estado del sujeto y similares. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden seleccionarse por el médico individual a la vista del estado del paciente (véase, por ejemplo, Fingl et al., 1975, en: The Pharmacological Basis of Therapeutics, cap. 1, pág. 1, incorporado al presente documento por referencia en su totalidad).
- 15 El médico tratante para pacientes tratados con proteínas de fusión de la invención sabrán cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la administración debido a toxicidad, disfunción orgánica y similares. Por el contrario, el médico tratante también sabrá ajustar el tratamiento a niveles mayores si la respuesta clínica no fuese adecuada (excluyendo la toxicidad). La magnitud de una dosis administrada en el control del trastorno de interés
- 20 variará con la gravedad de la afección a tratar, con la ruta de administración y similares. La gravedad de la afección puede, por ejemplo, evaluarse, en parte, por medio de métodos de evaluación pronósticos estándar. Además, la dosis y quizá la frecuencia de la dosis también variarán de acuerdo con la edad, el peso corporal y la respuesta del paciente individual.

Otros agentes y tratamientos

- 25 Las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF pueden administrarse en combinación con otros uno o más agentes en terapia. Por ejemplo, una proteína de fusión de la invención puede administrarse de manera conjunta con al menos un agente terapéutico adicional. La expresión "agente terapéutico" abarca cualquier agente que pueda administrarse para tratar un síntoma o enfermedad en un individuo que necesite
- 30 dicho tratamiento. Dicho agente terapéutico adicional puede comprender cualquier principio activo adecuado para la indicación particular que se esté tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. En determinadas realizaciones, un agente terapéutico adicional es otro agente anticáncer.

Dichos otros agentes están presentes de manera adecuada en combinación en cantidades que son efectivas para el fin previsto. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de proteína de fusión empleada, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores descritos anteriormente. Las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligandos de la familia de TNF se usan generalmente en las mismas dosis y con las rutas de administración descritas en el presente documento o de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 99% de las dosis descritas en el presente documento o en cualquier dosis o por cualquier ruta que se determine como adecuada empírica o clínicamente.

Dichas terapias combinadas indicadas anteriormente abarcan administración combinada (en la que dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma o en composiciones separadas) y administración separada, en cuyo caso, la administración de la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención puede suceder antes de, simultánea y/o posterior a, la administración del agente terapéutico adicional y/o adyuvante.

Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un contenedor y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al envase. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los envases pueden estar formados a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que está sola o combinada con otra composición eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón que es perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención.

La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la dolencia de elección. Por otra parte, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer envase con una composición contenida en este, en el que la composición comprende una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención; y (b) un segundo envase con una composición contenida en este, en donde la composición comprende un agente citotóxico o de otro modo terapéutico adicional. El artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender adicionalmente un prospecto que indica que las

composiciones pueden usarse para tratar una afección concreta.

- Como alternativa o además, el artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo (o tercer) envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), suero salino tamponado con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

Tabla C (secuencias):

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
1	4-1BBL humano (hu) (71-254)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE DTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGLPSRSE
2	4-1BBL hu (85-254)	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPL RSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
3	4-1BBL hu (80-254)	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLAL HLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARAR HAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
4	4-1BBL hu (52-254)	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDP AGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSW YSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKA GVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSA FGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHA

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		WQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
5	4-1BBL humano (hu) (71-248)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE DTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGL
6	4-1BBL hu (85-248)	DLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPL RSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
7	4-1BBL hu (80-248)	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLAL HLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARAR HAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
8	4-1BBL hu (52-248)	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDP AGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSW YSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKA GVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSA FGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHA WQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
9	hu 4-1BBL dimérico (71-254) conectado mediante el enlazador (G4S) ₂	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE DTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGLPSRSEGGGGSGGGGSREGPELSP DDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLAL HLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARAR HAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLSPRS E
10	hu 4-1BBL dimérico (71-248) conectado mediante el enlazador (G4S) ₂	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE DTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGL DLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPL RSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
11	hu 4-1BBL dimérico (80-254) conectado mediante el enlazador (G4S) ₂	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLAL HLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARAR HAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLSPRS EGGGSGGGGSDPAGLLDLRQGMFAQLV AQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLS YKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVV AGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALT VDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQR LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFR VTPEIPAGLSPRSE
12	hu 4-1BBL dimérico (52-254) conectado mediante el enlazador (G4S) ₂	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDP AGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSW YSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKA GVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSA FGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHA WQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLSPRSEG GGGSGGGGSPWAVSGARASPGSAASPRLR EGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNV

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		LLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKED TKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEG SGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLP PASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVH LHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEI PAGLPSRSE
13	cadena pesada HVR-H1, PD1-0103	GFSFSSY
14	cadena pesada HVR-H2, PD1-0103	GGR
15	cadena pesada HVR-H3, PD1-0103	TGRVYFALD
16	cadena ligera HVR-L1, PD1-0103	SESVDTSDNSF
17	cadena ligera HVR-L2, PD1-0103	RSS
18	cadena ligera HVR-L3, PD1-0103	NYDVPW
19	dominio variable VH de cadena pesada, PD1-0103	EVILVESGGGLVKPGGSLKLSCAAS <u>GFSFS</u> <u>SY</u> TMSWVRQTPEKRLDWVATISG <u>GGRDI</u> YPDSVKGRFTISRDNKNTLYLEMSSLMS EDTALYYCVLLTGRVYFALDSWGQGTSTV TVSS
20	dominio variable VL de cadena ligera, PD1-0103	KIVLTQSPASLPVSLGQRATISCRASE <u>SVDT</u> <u>SDNSFI</u> HWYQQRPGQSPKLLIY <u>RSSTLES</u> G VPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAVATYY CQQNYDVPWTFGGGTKLEIK
21	variante humanizada - dominio variable de cadena pesada VH de PD1-0103-0312, - 0313, -0314 y -0315	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFSFS</u> <u>SY</u> TMSWVRQAPGKGLEWVATISG <u>GGRDI</u> YYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGTL TVSS
22	variante humanizada - dominio variable VH de cadena pesada de PD1-0103-0312	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASE <u>SVDT</u> <u>TSDNSFI</u> HWYQQKPGQSPKLLIY <u>RSSTLES</u> GVPDRFSGSGSGTDFTLTITSSLAEDVAVY YCQQNYDVPWTFGQGTKVEIK
23	variante humanizada - dominio variable VH de cadena pesada de PD1-0103-0313	DVVMQTSPSLPVTLGQPASISCRASE <u>SVDT</u> <u>TSDNSFI</u> HWYQQRPGQSPRLIY <u>RSSTLES</u> GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		YCQ <u>QNYDVPW</u> TFGQGTKVEIK
24	variante humanizada - dominio variable VH de cadena pesada de PD1-0103-0314	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASE <u>SVDT</u> <u>SDNSFIHWY</u> QKPGQSPRLLIY <u>RS</u> TLES GI PARFSGSGSGTDFTLTISILEPEDFAVYYCQ <u>QNYDVPW</u> TFGQGTKVEIK
25	variante humanizada - dominio variable VH de cadena pesada de PD1-0103-0315	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASE <u>SVDT</u> <u>SDNSFIHWY</u> QKPGQSPRLLIY <u>RS</u> TLES GI PARFSGSGSGTDFTLTISILEPEDFAVYYCQ <u>QNYDVPW</u> TFGQGTKVEIK
26	cadena pesada HVR-H1, PD1-0098	GYSITSDY
27	cadena pesada HVR-H2, PD1-0098	YSG
28	cadena pesada HVR-H3, PD1-0098	HGSAPWYFD
29	cadena ligera HVR-L1, PD1-0098	SQNVHSDGNTY
30	cadena ligera HVR-L2, PD1-0098	KVS
31	cadena ligera HVR-L3, PD1-0098	GSHFPL
32	dominio variable VH de cadena pesada, PD1-0098	DVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVT <u>GYSIT</u> <u>SDY</u> AWNWIRQFPGDKLEWLGYYIT <u>YSGFTN</u> YNPSLKSRLSISRDTSKNQFFLQLNSVATED TATYYCARW <u>HGSAPWYFDY</u> WGRGTTLT VSS
33	dominio variable VL de cadena ligera, PD1-0098	DVLTMTQTPSLPVS LGDQASISCRSS <u>QNV</u> <u>HSDGNTY</u> LEWYLQKPGQSPNLLIY <u>KVSRR</u> FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYYCFQ <u>GSHFPL</u> TFGAGTKLELK
34	cadena pesada HVR-H1, PD1-0050	GYSITSDY
35	cadena pesada HVR-H2, PD1-0050	YTG
36	cadena pesada HVR-H3, PD1-0050	MDYYGSTLD
37	cadena ligera HVR-L1, PD1-0050	SESVDRYGNF
38	cadena ligera HVR-L2, PD1-0050	RAS
39	cadena ligera HVR-L3, PD1-0050	NNEDPY
40	dominio variable VH de cadena pesada,	DVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVT <u>GYSIT</u> <u>SDY</u> AWNWIRQFPGNKLEWMGYIT <u>YTGRT</u>

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
	PD1-0050	SYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTE DTATYYCARE <u>MDYYGSTLDY</u> YWGQGTTL TVSS
41	dominio variable VL de cadena ligera, PD1-0050	KIVLTQSPASLAVSLRQRATISCRASE <u>SVD</u> <u>RYGNSFI</u> HWYQQKPGQPPKVLIIY <u>RAS</u> NLE SGFPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAAT YYCQ <u>QNNEDPY</u> TFGSGTKLEIK
42	cadena pesada HVR-H1, PD1-0069	GYTFTDY
43	cadena pesada HVR-H2, PD1-0069	YSG
44	cadena pesada HVR-H3, PD1-0069	GITTGFA
45	cadena ligera HVR-L1, PD1-0069	SKGVSTSSYSF
46	cadena ligera HVR-L2, PD1-0069	YAS
47	cadena ligera HVR-L3, PD1-0069	SREFPW
48	dominio variable VH de cadena pesada, PD1-0069	QVQLQQSGPELVRPGVSVKISCKGS <u>GYTF</u> <u>TDY</u> AMHWVKQSHARTLEWIGVIST <u>YSGD</u> TNYNQKFCDKATMTVDKSSSTAYLELAR MTSEDSAIYYCARL <u>GITTGFA</u> YWGQGT LTVSA
49	dominio variable VL de cadena ligera, PD1-0069	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRAS <u>SKGVS</u> <u>TSSYSF</u> MHWYQQKPRQPPKLLIK <u>YAS</u> YLE SGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAAT YYCHH <u>SREFPW</u> TFGGGTKLEIK
50	cadena pesada HVR-H1, PD1-0073	GFTFSNY
51	cadena pesada HVR-H2, PD1-0073	GGR
52	cadena pesada HVR-H3, PD1-0073	YYGID
53	cadena ligera HVR-L1, PD1-0073	SQDVTTA
54	cadena ligera HVR-L2, PD1-0073	WAS
55	cadena ligera HVR-L3, PD1-0073	HYSIPW
56	dominio variable VH de cadena pesada, PD1-0073	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAAS <u>GFTE</u> <u>SNY</u> GMSWIRQTPEKGLEWVATISG <u>GGRD</u> TYYPDSVKGRFTISRDNVKNLNLQMSL RSEDFAFYCASY <u>YYGID</u> YWGQGTSVTV SS

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
57	dominio variable VL de cadena ligera, PD1-0073	DIVMTQPHKFMSTSVGDRVRITCKA <u>SQDV</u> <u>TTA</u> VAWYQQKPGQSPKLLIY <u>WAST</u> RHTG VPDRFTGSGSGTEFTLTISSVQAEDLALYY CQQ <u>HYSIPW</u> TFGGGKLEIK
58	cadena pesada HVR-H1, PD1-0078	GYTFTST
59	cadena pesada HVR-H2, PD1-0078	SDS
60	cadena pesada HVR-H3, PD1-0078	PFD
61	cadena ligera HVR-L1, PD1-0078	SQDVSTA
62	cadena ligera HVR-L2, PD1-0078	SAS
63	cadena ligera HVR-L3, PD1-0078	HYSHPF
64	dominio variable VH de cadena pesada, PD1-0078	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKAS <u>GYT</u> <u>FTST</u> WMHWVKQRPGQGLEWIGAIIDP <u>SDS</u> YTTYNQKFKGKATLTVDTSSTTAYMQLSS LTSEDSAVYYCTRS <u>PFD</u> YWGQGTTTLTVSS
65	dominio variable VL de cadena ligera, PD1-0078	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKA <u>SQDV</u> <u>STA</u> VAWYQQKPGQSPKLLIY <u>SAS</u> RYRTGV PDRFTGSGSGTDFTFAISSVQAEDLAVYYC QQ <u>HYSHPF</u> TFGSGTKLEIK
66	cadena pesada HVR-H1, PD1-0102	GYSITSGY
67	cadena pesada HVR-H2, PD1-0102	SSG
68	cadena pesada HVR-H3, PD1-0102	RNWFYD
69	cadena ligera HVR-L1, PD1-0102	SQSLNLSGTQKNY
70	cadena ligera HVR-L2, PD1-0102	WAS
71	cadena ligera HVR-L3, PD1-0102	DYTFPL
72	dominio variable VH de cadena pesada, PD1-0102	DVQLQESGPDLVKPSQSLTCTVT <u>GY SIT</u> <u>SGY</u> SWHWIRQFPGNKLEWMGFIH <u>SSG</u> DT NYNPSLKSRI SFTRDTSKNQFFLQLSSLTDE DTATYYCATY <u>RNWFYD</u> VWGAGTTVTVS S
73	dominio variable VL de cadena ligera, PD1-0102	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMRCKS <u>SQSL</u> <u>LNSGTQKNY</u> LTWYQQKPGQPPLLIY <u>WA</u> <u>ST</u> RESGVPNRFTGSGSGTDFTLTISSVQAE

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		DLSVYYCQSDYTFPLTFGGGTKLELK
74	Ligando dimérico 4-1BB (71-254) – CL* cadena Fc pomo	véase la Tabla 8
75	Ligando 4-1BB monomérico (71-254)- CH1*	véase la Tabla 8
76	Ligando 4-1BB dimérico (71-254) - CL cadena Fc pomo	véase la Tabla 9
77	Ligando 4-1BB monomérico (71-254)-CH1	véase la Tabla 9
78	Ligando dimérico 4-1BB (71-248) – CL* cadena Fc pomo	véase la Tabla 11
79	Ligando 4-1BB monomérico (71-248)- CH1*	véase la Tabla 11
80	Ligando dimérico 4-1BB (71-248) – CL cadena Fc pomo	véase la Tabla 12
81	Ligando 4-1BB monomérico (71-248)-CH1	véase la Tabla 12
82	cadena Fc agujero anti-PD1(314)	véase la Tabla 8
83	cadena ligera de anti- PD1(314)	véase la Tabla 8
84	ligando 4-1BB dimérico (71-254) de Fc agujero de anti-PD1(314)	véase la Tabla 10
85	ligando 4-1BB monomérico (71-254) de Fc pomo de anti-PD1(314)	véase la Tabla 10
86	ligando 4-1BB dimérico (71-248) de Fc agujero de anti-PD1(314)	véase la Tabla 13
87	ligando 4-1BB monomérico (71-248) de Fc pomo de anti-PD1(314)	véase la Tabla 13
88	ligando 4-1BB dimérico (71-248) de Fc agujero	véase la Tabla 14
89	ligando 4-1BB monomérico (71-248) de Fc agujero	véase la Tabla 15
90	ligando 4-1BB dimérico (71-248) de Fc pomo de anti-PD1(314)	véase la Tabla 15

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
91	cadena Fc agujero fusionada a cadena de ligando 4-1BB monomérico (71-248)	véase la Tabla 16
92	cadena de ligando 4-1BB monomérico (71-248) de Fc agujero de anti-PD1(314)	véase la Tabla 17
93	ligando 4-1BB dimérico (71-248) de Fc pomo	véase la Tabla 17
94	PD1 humano	n.º de UniProt Q15116
95	Linfotoxina α humana	n.º de UniProt P01374
96	TNF humano	n.º de UniProt P01375
97	Linfotoxina β humana	n.º de UniProt Q06643
98	OX40L humano	n.º de UniProt P23510
99	CD40L humano	n.º de UniProt P29965
100	FasL humano	n.º de UniProt P48023
101	CD27L humano	n.º de UniProt P32970
102	CD30L humano	n.º de UniProt P32971
103	4-1BBL humano	n.º de UniProt P41273
104	TRAIL humano	n.º de UniProt P50591
105	RANKL humano	n.º de UniProt O14788
106	TWEAK humano	n.º de UniProt O43508
107	APRIL humano	n.º de UniProt O75888
108	BAFF humano	n.º de UniProt Q9Y275
109	LIGHT humano	n.º de UniProt O43557
110	TL1A humano	n.º de UniProt O95150
111	GITRL humano	n.º de UniProt Q9UNG2
112	ectodisplasina A humana	n.º de UniProt Q92838
113	4-1BBL humano (50-254)	ACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPE LSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVL LIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE DTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALA LTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLS AGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGA

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		TVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
114	OX40L humano (51-183)	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFI LTSQKEDEIMKVQNNSVIINCDGFY LISLKG YFSQEVNISLHYQKDEEPL FQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVY LNVTTDNTSLDDFHVNGGELILIHQ NPGEFCVL
115	OX40L humano (52-183)	VSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFI LTSQKEDEIMKVQNNSVIINCDGFY LISLKG YFSQEVNISLHYQKDEEPL FQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVY LNVTTDNTSLDDFHVNGGELILIHQ NPGEFCVL
116	Enlazador peptídico G4S	GGGGS
117	Enlazador peptídico (G4S) ₂	GGGGS GGGGS
118	Enlazador peptídico (SG4) ₂	SGGGGS GGGG
119	Enlazador peptídico (G ₄ S) ₃	GGGGS GGGGS GGGGS
120	Enlazador peptídico G4(SG4) ₂	GGGGS GGGGS GGGG
121	Enlazador peptídico (G ₄ S) ₄	GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS
122	Enlazador peptídico	GSPGSSSSGS
123	Enlazador peptídico	GSGSGSGS
124	Enlazador peptídico	GSGSGNGS
125	Enlazador peptídico	GGSGSGSG
126	Enlazador peptídico	GGSGSG
127	Enlazador peptídico	GGSG
128	Enlazador peptídico	GGSGNGSG
129	Enlazador peptídico	GGNGSGSG
130	Enlazador peptídico	GGNGSG
131	secuencia de nucleótidos de 4-1BBL hu dimérico (71-254)-CL* Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 8
132	secuencia de nucleótidos de 4-1BBL hu monomérico (71-254)-CH1*	véase la Tabla 8
133	secuencia de nucleótidos de cadena Fc agujero de anti-PD1(0314)	véase la Tabla 8
134	secuencia de nucleótidos de cadena ligera	véase la Tabla 8

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
	de anti-PD1(0314)	
135	secuencia de nucleótidos de 4-1BBL hu dimérico (71-254)-CL Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 9
136	secuencia de nucleótidos de 4-1BBL hu monomérico (71-254)-CH1	véase la Tabla 9
137	secuencia de nucleótidos de cadena de Fc agujero de anti-PD1(0314) fusionada a hu 4-1BBL dimérico (71-254)	véase la Tabla 10
138	secuencia de nucleótidos de cadena de Fc pomo de anti-PD1(0314) fusionada a hu 4- 1BBL monomérico (71-254)	véase la Tabla 10
139	secuencia de nucleótidos de 4-1BBL hu dimérico (71-248)-CL* Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 11
140	secuencia de nucleótidos de 4-1BBL hu monomérico (71-248)-CH1*	véase la Tabla 11
141	secuencia de nucleótidos de 4-1BBL hu dimérico (71-248)-CL Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 12
142	secuencia de nucleótidos de 4-1BBL hu monomérico (71-248)-CH1	véase la Tabla 12
143	secuencia de nucleótidos de cadena de Fc agujero de anti-PD1(0314) fusionada a hu 4-1BBL dimérico (71-248)	véase la Tabla 13
144	secuencia de nucleótidos de cadena de Fc pomo de anti-PD1(0314) fusionada a hu 4- 1BBL monomérico (71-248)	véase la Tabla 13
145	secuencia de nucleótidos de cadena Fc agujero de ligando dimérico (71-248)	véase la Tabla 14
146	secuencia de nucleótidos de cadena Fc agujero de ligando monomérico (71-248)	véase la Tabla 15

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
147	secuencia de nucleótidos de cadena de Fc pomo de anti-PD1(0314) fusionada a hu 4- 1BBL dimérico (71-248)	véase la Tabla 15
148	secuencia de nucleótidos de cadena de Fc pomo fusionada a hu 4-1BBL monomérico (71-248)	véase la Tabla 16
149	secuencia de nucleótidos de cadena Fc agujero de ligando monomérico (71-248) de anti-PD1(0314)	véase la Tabla 17
150	secuencia de nucleótidos de cadena de Fc pomo fusionada a hu 4-1BBL dimérico (71-248)	véase la Tabla 17
151	secuencia de nucleótidos de cadena de Fc agujero de DP47	véase la Tabla 18
152	secuencia de nucleótidos de cadena ligera de DP47	véase la Tabla 18
153	cadena Fc agujero de DP47	véase la Tabla 18
154	cadena ligera de DP47	véase la Tabla 18
155	secuencia de nucleótidos de cadena de Fc agujero de DP47 fusionada a hu 4-1BBL dimérico (71-254)	véase la Tabla 19
156	secuencia de nucleótidos de cadena de Fc pomo de DP47 fusionada a hu 4-1BBL monomérico (71-254)	véase la Tabla 19
157	cadena de Fc agujero de DP47 fusionada a hu 4-1BBL dimérico (71-254)	véase la Tabla 19
158	cadena de Fc pomo de DP47 fusionada a hu 4-1BBL monomérico (71-254)	véase la Tabla 19
159	secuencia de nucleótidos de cadena pesada de DP47 (hu IgG1 PGLALA)	véase la Tabla 21
160	cadena pesada de DP47 (hu IgG1 PGLALA)	véase la Tabla 21

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
161	secuencia de nucleótidos de cadena pesada de PD1(0314) (huIgG1 PGLALA)	véase la Tabla 22
162	cadena pesada de PD1(0314) (huIgG1 PGLALA)	véase la Tabla 22
163	ECD de 4-1BB humano, aa 24-186 de Q07011	
164	Secuencia de nucleótidos de cadena de agujero de Fc	véase la Tabla 24
165	Secuencia de nucleótidos de cadena de Fc pomo de antígeno 4-1BB humano	véase la Tabla 24
166	cadena de agujero de Fc	véase la Tabla 24
167	cadena Fc pomo de antígeno 4-1BB humano	véase la Tabla 24
168	etiqueta avi	GLNDIFEAQKIEWHE
169	secuencia de nucleótidos de 4-1BB His humano	véase la Tabla 25
170	4-1BB His humano	véase la Tabla 25
171	cadena ligera de anti-PD1 (0312)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASE SVDTSDNSFIHWYQQKPGQSPKLLIYR SSTLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISL QAEDVAVYYCQQNYDVPWTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC

La información general referente a las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulinas humanas se proporciona en: Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Los aminoácidos de las cadenas de anticuerpo se numeran y citan de acuerdo con el sistema de numeración EU de acuerdo con Kabat (Kabat, E.A., et al.,

Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) tal como se ha definido anteriormente.

Los siguientes párrafos numerados son aspectos de la invención:

- 5 1. Una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende
 - (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1 y
 - (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro, en donde la molécula se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo que está conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende únicamente un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo.
- 10 2. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF del párrafo 1, que además comprende
 - (c) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad capaces de asociarse de manera estable.
- 15 3. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de los párrafos 1 o 2, que comprende
 - (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1 y
 - (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro, en donde la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que
 - 20 a. el primer polipéptido contiene un dominio CH1 o CL y el segundo polipéptido contiene un dominio CL o CH1, respectivamente, en donde el
- 25

- segundo polipéptido está unido al primer polipéptido mediante un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL y en donde el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al dominio CH1 o CL mediante un enlazador peptídico y en donde el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al dominio CL o CH1 de dicho polipéptido, o
- b. el primer polipéptido contiene un dominio CH3 y el segundo polipéptido contiene un dominio CH3, respectivamente y en donde el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al extremo C-terminal del dominio CH3 mediante un enlazador peptídico y en donde el segundo polipéptido comprende únicamente un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al extremo C-terminal del dominio CH3 de dicho polipéptido o
- c. el primer polipéptido contiene un dominio VH-CL o VL-CH1 y el segundo polipéptido contiene un dominio VL-CH1 o VH-CL, respectivamente, en donde el segundo polipéptido está unido al primer polipéptido mediante un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL y en donde el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y a VH o VL mediante un enlazador peptídico y en donde el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al VH o VL de dicho polipéptido.
4. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de uno cualquiera de los párrafos 1 a 3, en donde el miembro de la familia de ligandos de TNF coestimula la activación de células T humanas.

5. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de uno cualquiera de los párrafos 1 a 4, en donde el miembro de la familia de ligandos de TNF se selecciona entre 4-1BBL y OX40L.
- 5 6. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de uno cualquiera de los párrafos 1 a 5, en donde el miembro de la familia de ligando de TNF es 4-1BBL.
- 10 7. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de uno cualquiera de los párrafos 1 a 6, en la que el ectodominio de un miembro de la familia de ligandos de TNF comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, en particular, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 5.
- 15 8. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de uno cualquiera de los párrafos 1 a 7, en donde el ectodominio de un miembro de la familia de ligandos de TNF comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.
- 20 9. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de uno cualquiera de los párrafos 1 a 8, que comprende
 - (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1 y
 - (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,

en donde la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 10 y por que el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.
- 25

10. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de uno cualquiera de los párrafos 1 a 9, que comprende
- 5 (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a PD1 y
- (b) un primer polipéptido que contiene un dominio CH1 o CL y un segundo polipéptido que contiene un dominio CL o CH1, respectivamente, en donde el segundo polipéptido está unido al primer polipéptido mediante un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL,
- 10 y en donde la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al dominio CH1 o CL mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende únicamente un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un
- 15 fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al dominio CL o CH1 de dicho polipéptido.
11. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de uno cualquiera de los párrafos 1 a 10, en donde el resto capaz de unirse específicamente a PD1 se selecciona entre el grupo que consiste en un fragmento de
- 20 anticuerpo, una molécula Fab, una molécula Fab sobrecruzada, una molécula Fab monocatenaria, una molécula Fv, una molécula scFv, un anticuerpo de un solo dominio, una VH y una proteína de unión a antígeno de armazón.
12. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de uno cualquiera de los párrafos 1 a 11, en donde la molécula comprende un
- 25 resto capaz de unirse específicamente a PD1.
13. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de uno cualquiera de los párrafos 1 a 12, en donde el resto capaz de unirse específicamente a PD1 es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a PD1.
14. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de
- 30 TNF de uno cualquiera de los párrafos 1 a 13, en donde el resto capaz de unirse específicamente a PD1 comprende

5 (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y un dominio VL que comprende (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18,

10 (b) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 y un dominio VL que comprende (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31,

15 (c) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y un dominio VL que comprende (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 (v) HVR-L2 que
20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39,

(d) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44 y un dominio VL que comprende (iv) HVR-L1 que
25 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46 y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47,

30 (e) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 52 y un dominio VL que comprende (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54 y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55,

5 (f) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60 y un dominio VL que comprende (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61 (v) HVR-L2 que
10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63 o

(g) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68 y un dominio VL que comprende (iv) HVR-L1 que
15 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69 (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71.

15. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de
20 TNF de uno cualquiera de los párrafos 1 a 14, en donde el resto capaz de unirse específicamente a PD1 comprende

(a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20,

(b) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21
25 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22,

(c) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23,

(d) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21

y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24,

(e) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25,

5 (f) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33,

(g) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41,

(h) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49,

10 (i) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57,

(k) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 o

15 (l) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73.

16. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de uno cualquiera de los párrafos 1 a 14, en donde el resto capaz de unirse específicamente a PD1 comprende

20 (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y un dominio VL que comprende (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y (vi) HVR-L3 que
25 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18.

17. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de

TNF de uno cualquiera de los párrafos 1 a 16, en donde el resto capaz de unirse específicamente a PD1 comprende

(a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20,

5 (b) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22,

(c) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23,

10 (d) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 o

(e) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

15 18. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de uno cualquiera de los párrafos 2 a 17, en donde el dominio Fc es una IgG, particularmente un dominio Fc de IgG1 o un dominio Fc de IgG4.

19. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de uno cualquiera de los párrafos 2 a 18, en donde el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1 que comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones 234 y 235 (numeración EU) y/o 329 (numeración EU).

20 20. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de uno cualquiera de los párrafos 1 a 19, en donde la primera subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos S354C y T366W (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y la segunda subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos Y349C, T366S, L368A y
25 Y407V (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

21. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de uno cualquiera de los párrafos 1 a 20, en donde la molécula de unión a

antígeno comprende

una primera cadena pesada y una primera cadena ligera, comprendiendo ambas una molécula Fab capaz de unirse específicamente a PD1, un primer péptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos de los mismos conectados entre sí mediante un primer enlazador peptídico fusionado en su extremo C-terminal mediante un segundo enlazador peptídico a una segunda cadena pesada o ligera, y un segundo péptido que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF fusionado en su extremo C-terminal mediante un tercer enlazador peptídico a una segunda cadena ligera o pesada, respectivamente.

22. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de uno cualquiera de los párrafos 1 a 20, en donde el primer péptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo conectados entre sí mediante un primer enlazador peptídico está fusionado en su extremo C-terminal mediante un segundo enlazador peptídico a un dominio CH1 que forma parte de una cadena pesada, y el segundo péptido que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo está fusionado en su extremo C-terminal mediante un tercer enlazador peptídico a un dominio CL que forma parte de una cadena ligera.

23. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de uno cualquiera de los párrafos 1 a 20, en donde el primer péptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo conectados entre sí mediante un primer enlazador peptídico está fusionado en su extremo C-terminal mediante un segundo enlazador peptídico a un dominio CL que forma parte de una cadena pesada, y el segundo péptido que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo está fusionado en su extremo C-terminal mediante un tercer enlazador peptídico a un dominio CH1 que forma parte de una cadena ligera.

24. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de

- TNF de uno cualquiera de los párrafos 1 a 20, en donde el primer péptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo conectados entre sí mediante un primer enlazador peptídico está fusionado en su extremo C-terminal mediante un segundo enlazador peptídico a un dominio VH que forma parte de una cadena pesada, y el segundo péptido que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo está fusionado en su extremo C-terminal mediante un tercer enlazador peptídico a un dominio VL que forma parte de una cadena ligera.
25. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de los párrafos 21 a 23, en donde en el dominio CL adyacente al miembro de la familia de ligandos de TNF el aminoácido en la posición 123 (numeración EU) se ha reemplazado por arginina (R) y el aminoácido en la posición 124 (numeración EU) se ha sustituido por lisina (K) y en donde en el dominio CH1 adyacente al miembro de la familia de ligandos de TNF, los aminoácidos en la posición 147 (numeración EU) y en la posición 213 (numeración EU) se han sustituido por ácido glutámico (E).
26. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de uno cualquiera de los párrafos 1 a 20, en donde la molécula de unión a antígeno comprende
- (a) una primera cadena pesada y una primera cadena ligera, comprendiendo ambas una molécula Fab capaz de unirse específicamente a PD1,
- (b) una segunda cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 10 y una segunda cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.
27. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de uno cualquiera de los párrafos 1 a 20 o 26, en donde la molécula de unión a antígeno comprende

- (i) una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 o
- 5 una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25,
- 10 (ii) una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78 y SEQ ID NO: 80 y
- (iii) una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79 y SEQ ID NO: 81.
- 15
28. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de uno cualquiera de los párrafos 1 a 21, en donde la molécula de unión a antígeno comprende
- (a) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 83, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75,
- 20
- (b) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 83, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77,
- 25

- 5 (c) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 83, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, o
- 10 (d) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 83, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 81.
29. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de uno cualquiera de los párrafos 1 a 20, que comprende
- (a) al menos un dominio Fab capaz de unirse específicamente a PD1 y
- 15 (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,
- 20 en donde la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido contiene un dominio CH3 y el segundo polipéptido contiene un dominio CH3, respectivamente, y en donde el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al extremo C-terminal del dominio CH3 mediante un enlazador peptídico y en donde el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al extremo C-terminal del dominio CH3 de dicho polipéptido.
- 25 30. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF del párrafo 29, que comprende dos dominios Fab capaces de unirse específicamente a PD1.
31. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF del párrafo 29, en la que la molécula de unión a antígeno comprende

- (a) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85 y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83 o
- 5 (b) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87 y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83.
- 10 32. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF del párrafo 29, que comprende un dominio Fab capaz de unirse específicamente a PD1.
- 15 33. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de los párrafos 29 o 32, en donde la molécula de unión a antígeno comprende (i) un polipéptido de fusión que comprende una primera subunidad de un dominio Fc y dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al extremo C-terminal del dominio CH3 mediante un enlazador peptídico, (ii) una cadena pesada que comprende el dominio VH del dominio Fab capaz de unirse específicamente a PD1, una segunda subunidad del dominio Fc y un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado mediante un enlazador peptídico al extremo C-terminal del dominio CH3 y (iii) una cadena ligera que comprende el dominio VL del dominio Fab capaz de unirse específicamente a PD1, o
- 20 (i) un polipéptido de fusión que comprende una primera subunidad de un dominio Fc y un ectodominio de un miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo que está conectado al extremo C-terminal del dominio CH3 mediante un enlazador peptídico, (ii) una cadena pesada que comprende el dominio VH del dominio Fab capaz de unirse específicamente a PD1, una segunda subunidad del dominio Fc y dos ectodominios de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al extremo C-terminal del dominio CH3 mediante un enlazador peptídico, y (iii) una cadena ligera que
- 25 comprende el dominio VL del dominio Fab capaz de unirse específicamente a PD1.
- 30 34. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF

- del párrafo 31, en donde la molécula de unión a antígeno comprende
 (a) un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID
 NO: 88, una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID
 NO: 87 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID
 NO: 83,
35. (b) un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID
 NO: 89, una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID
 NO: 90 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID
 NO: 83,
- 10 36. (c) un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID
 NO: 91, una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID
 NO: 86 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID
 NO: 83,
- 15 37. (b) un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID
 NO: 93, una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID
 NO: 92 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID
 NO: 83,
38. Un polinucleótido aislado que codifica la molécula de unión a antígeno que contiene
 trímero de ligando de la familia de TNF de una cualquiera de los párrafos 1 a 34.
- 20 39. Un vector, particularmente un vector de expresión, que comprende el polinucleótido
 aislado del párrafo 35.
40. Una célula hospedadora que comprende al polinucleótido aislado del párrafo 35 o el
 vector del párrafo 36.
- 25 41. Un método para producir la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de
 ligandos de la familia de TNF de uno cualquiera de los párrafos 1 a 34, que comprende
 las etapas de
42. (i) cultivar la célula hospedadora del párrafo 37 en condiciones adecuadas para la

expresión de la molécula de unión a antígeno y
(ii) recuperar la molécula de unión a antígeno.

43. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de una cualquiera de los párrafos 1 a 34 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
44. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de uno cualquiera de los puntos 1 a 34 o la composición farmacéutica del párrafo 39, para su uso como medicamento.
45. La molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34 o la composición farmacéutica del párrafo 39, para su uso en el tratamiento del cáncer.
46. Uso de la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligandos de la familia de TNF de uno cualquiera de los párrafos 1 a 34 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
47. Un método para tratar una enfermedad en un individuo, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una molécula de unión a antígeno que comprende trímero de ligandos de la familia de TNF de uno cualquiera de los párrafos 1 a 34 en una forma farmacéuticamente aceptable.
48. El método del párrafo 43, en donde dicha enfermedad es cáncer.

EJEMPLOS

Lo siguiente son ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden ponerse en práctica otras varias realizaciones, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Técnicas de ADN recombinante

Se usaron métodos estándar para manipular el ADN tal como se describen en Sambrook et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Los reactivos moleculares biológicos se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La información general referente a las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina humana se proporciona en: Kabat, E.A. et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Publicación NIH n.º 91-3242.

Secuenciación de ADN

10 Las secuencias de ADN se determinaron mediante secuenciación bicatenaria.

Síntesis génica

Los segmentos génicos deseados se generaron bien por PCR usando moldes adecuados o se sintetizaron por Geneart AG (Regensburg, Alemania) a partir de oligonucleótidos sintéticos y productos de PCR mediante síntesis génica automatizada. En los casos donde no estaba disponible una secuencia génica exacta, se diseñaron cebadores oligonucleotídicos basándose en las secuencias a partir de los homólogos más cercanos y los genes se aislaron mediante RT-PCR a partir del ARN originado a partir del tejido adecuado. Los segmentos génicos flaqueados por sitios de escisión de endonucleasa de restricción singulares se clonaron en vectores de clonación/secuenciación estándar. El ADN de plásmido se purificó a partir de bacterias transformadas y se determinó la concentración mediante espectroscopía UV. La secuencia de ADN de los fragmentos génicos succionados se confirmó mediante secuenciación de ADN. Los segmentos génicos se diseñaron con sitios de restricción adecuados para permitir la sub-clonación en los vectores de expresión respectivos. Todas las construcciones se diseñaron con una secuencia de ADN de extremo 5' que codificaba un péptido líder que dirige a las proteínas para su secreción en células eucariotas.

Técnicas de cultivo celular

Se usaron técnicas estándar de cultivo tal como se describen en Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. y Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc.

30 **Purificación de proteínas**

Las proteínas se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo celular filtrados en referencia a protocolos convencionales. En resumen, se aplicaron los anticuerpos a una columna de proteína A Sefarosa (GE Healthcare) y se lavaron con PBS. La elución de los anticuerpos se logró a pH 2,8 seguido de la inmediata neutralización de la muestra. La proteína agregada se separó de los anticuerpos monoméricos mediante cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200, GE Healthcare) en PBS o en histidina 20 mM, NaCl 150 mM pH 6,0. Las fracciones de anticuerpo monomérico se agruparon, concentraron (en caso necesario) usando, por ejemplo, un concentrador por centrifugación Amicon Ultra (30 MWCO) de MILLIPORE, se congelaron y se almacenaron a -20 °C o -80 °C. Se proporcionó una parte de las muestras para su posterior análisis de proteínas y caracterización analítica, por ejemplo, mediante SDS-PAGE, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) o espectrometría de masas.

SDS-PAGE

Se usó el sistema de gel precolado NuPAGE® (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En particular, se usaron geles precolados NuPAGE® Novex® Bis-TRIS al 10 % o 4-12 % (pH 6,4) y un NuPAGE® MES (geles reducidos, con aditivo de tampón de ejecución antioxidante NuPAGE®) o tampón de ejecución MOPS (geles no reducidos).

Cromatografía de exclusión por tamaño analítica

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para la determinación de la agregación y estado oligomérico de los anticuerpos se llevó a cabo mediante cromatografía HPLC. En resumen, se aplicaron anticuerpos purificados con proteína A a una columna TSKgel G3000SW de Tosoh en NaCl 300 mM, $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM, pH 7,5 en un sistema HPLC 1100 de Agilent o a una columna Superdex 200 (GE Healthcare) en PBS 2 x en un sistema HPLC de Dionex. La proteína eluida se cuantificó mediante absorbancia UV e integración de las áreas de los picos. Sirvió como patrón el patrón de filtración en gel de BioRad 151-1901.

Espectrometría de masas

Esta sección describe la caracterización de los anticuerpos multiespecíficos con intercambio de VH/VL (CrossMabs de VH/VL) enfatizando en su correcto ensamblaje. Las estructuras primarias esperadas se analizaron mediante ionización por electropulverización-espectrometría de masas (IEN-EM) de los CrossMab intactos desglucosilados y de los CrossMabs desglucosilados/digeridos con plasmina o como alternativa desglucosilados/digeridos con LysC limitado.

Los CrossMab de VH/VL se desglucosilaron con N-glucosidasa F en un tampón fosfato o Tris a 37 °C durante hasta 17 h a una concentración de proteína de 1 mg/ml. Las digestiones de plasmina o LysC limitado (Roche) se llevaron a cabo con 100 µg de CrosMab de VH/VL desglucosilados en un tampón Tris, pH 8 a temperatura ambiente durante 120 horas y a 37 °C durante 40 min, respectivamente. Antes de la espectrometría de masas se desalaron las muestras mediante HPLC en una columna Sephadex G25 (GE Healthcare). La masa total se determinó mediante ESI-MS en un sistema maXis 4G UHR-QTOF MS (Bruker Daltonik) equipado con una fuente TriVersa NanoMate (Advion).

Determinación de la unión y de la afinidad de unión de los anticuerpos multiespecíficos para los respectivos antígenos usando resonancia de plasmón superficial (SPR) (BIACORE)

Se investigó la unión de los anticuerpos generales a sus respectivos antígenos mediante resonancia de plasmón superficial usando un instrumento BIACORE (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suecia). En resumen, para las medidas de afinidad, se inmovilizan anticuerpos JIR 109-005-098 de cabra anti-IgG humana en una microplaca CM5 mediante acoplamiento de amina para la presentación de los anticuerpos contra el antígeno respectivo. La unión se mide en tampón HBS (HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,005 %, pH 7,4), 25 °C (o como alternativa a 37 °C). El antígeno (de R&D Systems o purificado internamente) se añadió en varias concentraciones en solución. La asociación se midió mediante una inyección de antígeno de 80 segundos a 3 minutos; la disociación se midió lavando la superficie de la microplaca con tampón HBS durante 3-10 minutos y se estimó un valor de KD usando un modelo de unión de Langmuir 1:1. Los datos de control negativo (por ejemplo, curvas de tampón) se restaron de las curvas de muestra para la corrección de la deriva basal intrínseca del sistema y para la reducción del ruido de la señal. Se usó el programa informático de evaluación de Biacore respectivo para el análisis de los sensogramas y para el cálculo de los datos de afinidad.

Ejemplo 1

1.1 Generación de anticuerpos anti-PD1

Inmunización de ratones

Se inmunizó genéticamente a ratones NMRI, usando un vector de expresión de plásmido que codificaba PD1 humano de longitud completa mediante aplicación intradérmica de 100 µg de

ADN de vector (plásmido 15300_hPD1-fl), seguido de electroporación (2 pulsos cuadrados de 1000 V/cm, duración 0,1 ms, intervalo 0,125 s; seguido de 4 pulsos cuadrados de 287,5 V/cm, duración 10 ms, intervalo 0,125 s. Los ratones recibieron 6 inmunizaciones consecutivas en los días 0, 14, 28, 42, 56, 70 y 84. La sangre se extrajo en los días 36, 78 y 92 y se preparó el suero, que se usó para la determinación del título mediante ELISA (véase más adelante). Los animales con los títulos mayores se seleccionaron para refuerzo en el día 96, mediante inyección intravenosa de 50 ug de quimera de PD1 humano Fc humano y se aislaron los anticuerpos monoclonales por la tecnología de hibridoma, mediante la fusión de esplenocitos a la línea celular de mieloma 3 días después del refuerzo.

10 **Determinación de títulos en suero (ELISA)**

Se inmovilizó la quimera de PD1 humana recombinante-Fc humana en una placa NUNC Maxisorp de 96 pocillos a 0,3 ug/ml, 100 ul/pocillo, en PBS, seguido de: bloqueo de la placa con Crotein C al 2 % en PBS, 200 ul/pocillo; aplicación de diluciones en serie de antisueros, en duplicados, en Crotein C al 0,5 % en PBS, 100 ul/pocillo; detección con anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado a HRP (Jackson Immunoresearch/Dianova 115-036-071; 1/16 000). Para todas las etapas, se incubaron las placas durante 1 hora a 37 °C. Entre todas las etapas, las placas se lavaron 3 veces con Tween 20 al 0,05% en PBS. La señal se reveló mediante la adición de sustrato soluble BM Blue POD (Roche), 100 ul/pocillo; y se detuvo mediante la adición de HCl 1 M, 100 ul/pocillo. La absorbancia se leyó a 450 nm, frente a 690 nm como referencia. El título se definió como la dilución de antisuero que diese como resultado una señal semimáxima.

1.2 Caracterización de anticuerpos anti-PD1 / Unión de anticuerpos anti-PD1 a PD1 humana

ELISA para PD1 hu

Se recubrieron placas Nunc maxisorp recubiertas de estreptavidina (MicroCoat n.º 11974998001) con 25 µl/pocillo de ECD de PD1-AviHis biotinilado y se incubaron a 4°C durante la noche. Después de lavar (3 x 90 µl/pocillo con tampón PBST) se añadieron 25 µl de muestras de anticuerpos anti-PD1 o de referencia (anti-PD1 humana; Roche/anti-PD1 de ratón; Biolegend; n.º de cat. 329912) y se incubaron 1 h a TA. Después de lavar (3 x 90 µl/pocillo con tampón PBST) se añadieron 25µl/pocillo de anti-H+L-POD humano de cabra (JIR, JIR109-036-088)/ anti-POD de ratón de cabra (GE Healthcare; NA9310) en una dilución

1:2000/1:1000 y se incubaron a TA durante 1 h en un agitador. Después de lavar (3 x 90 µl/pocillo con tampón PBST) se añadieron 25 µl/pocillo de sustrato TMB (Roche n.º de catálogo 11835033001) y se incubó hasta una DO de 2 - 3. La medición tuvo lugar a 370/492 nm.

- 5 Los resultados del ELISA se listan como valores de CE_{50} [ng/ml] en la Tabla de resumen 1 y 2 a continuación.

ELISA celular para PD1

- Se sembró la línea celular adherente CHO-K1 transfectada de manera estable con plásmido 15311_hPD1-fl_pUC_Neo que codificaba PD1 humana de longitud completa y selección con
10 G418 (marcador de resistencia a neomicina en el plásmido) a una concentración de 0,01 x 10E6 células/pocillo en placas de 384 pocillos de fondo plano y se dejaron crecer durante toda la noche.

- Al día siguiente, se añadieron 25 µl/pocillo de muestra de PD1 o de anti PD1 humano (Roche)/anticuerpo de referencia anti PD1 de ratón (Biolegend; n.º de cat. 329912) y se
15 incubó durante 2 h a 4°C (para evitar la internalización). Después de lavar cuidadosamente (1 x 90 µl/pocillo de PBST) se fijaron las células añadiendo 30 µl/pocillo de glutaraldehído al 0,05% (Sigma, n.º de Cat: G5882, al 25%) diluido en tampón PBS 1 x y se incubó durante 10 min a TA. Después de lavar (3 x 90 µl/pocillo de PBST) se añadieron 25 µl/pocillo de anticuerpo secundario para la detección: anti-H+L-POD humano de cabra (JIR, JIR109-036-
20 088)/anti-POD de ratón de cabra (GE NA9310) seguido de incubación durante 1 h a TA en un agitador. Después de lavar (3 x 90 µl/pocillo de PBST) se añadieron 25 µl/pocillo de solución de sustrato TMB (Roche 11835033001) y se incubó hasta una DO de 1,0 - 2,0. Las placas se midieron a 370/492 nm.

- Los resultados del ELISA celular se listan como valores de “ CE_{50} CHO-PD1” [ng/ml] en la
25 Tabla de resumen 2 a continuación.

ELISA para PD1 de cyno

- Se recubrieron placas Nunc maxisorp recubiertas de estreptavidina (MicroCoat n.º 11974998001) con 25 µl/pocillo de ECD de PD1 de cyno-Biotina y se incubaron a 4°C durante la noche. Después de lavar (3 x 90 µl/pocillo con tampón PBST) se añadieron 25 µl
30 de muestras de anticuerpos anti-PD1 o de referencia (anti-PD1 humana; Roche) y se incubó

durante 1 h a TA en un agitador. Después de lavar (3 x 90 µl/pocillo con tampón PBST) se añadieron 25µl/pocillo de anti-H+L-POD humano de cabra (JIR, JIR109-036-088) en una dilución 1:1000 y se incubaron a TA durante 1 h en un agitador. Después de lavar (3 x 90 µl/pocillo con tampón de PBST) se añadieron 25 µl/pocillo de sustrato de TMB (Roche, 11835033001) y se incubó hasta una DO de 2 - 3. La medición tuvo lugar a 370/492 nm.

Los resultados del ELISA se listan como valores de CE_{50} [ng/ml] en la Tablas de resumen 1 y 2 a continuación.

Ensayo de reemplazo de ligando 1 de PD

Se recubrieron placas Nunc maxisorp recubiertas de estreptavidina (MicroCoat n.º 11974998001) con 25 µl/pocillo de ECD de PD1-AviHis biotinilado y se incubaron a 4°C durante la noche. Después de lavar (3 x 90 µl/pocillo con tampón PBST) se añadieron 25 µl de muestras de anticuerpos anti-PD1 o de referencia (anti-PD1 de ratón; Biolegend; n.º de cat. 329912) y se incubaron 1 h a TA en un agitador. Después de lavar (3 x 90 µl/pocillo con tampón PBST) se añadieron 25µl/pocillo de PD-L1 (quimera de B7-H1/PD-L1 humano recombinante-Fc; 156-B7, R&D) y se incubó durante 1 h a TA en un agitador. Después de lavar (3 x 90 µl/pocillo con tampón PBST) se añadieron 25µl/pocillo de anti-H+L-POD humano de cabra (JIR, 109-036-088) en una dilución 1:1000 y se incubaron a TA durante 1 h en un agitador. Después de lavar (3 x 90 µl/pocillo con tampón de PBST) se añadieron 25 µl/pocillo de sustrato de TMB (Roche, 11835033001) y se incubó hasta una DO de 2 - 3. La medición tuvo lugar a 370/492 nm.

Los resultados del ELISA se listan como valores de CE_{50} [ng/ml] en la Tabla de resumen 1 a continuación.

Ensayo de reemplazo de ligando 2 de PD

Se recubrieron placas Nunc maxisorp recubiertas de estreptavidina (MicroCoat n.º 11974998001) con 25 µl/pocillo de ECD de PD1-AviHis biotinilado y se incubaron a 4°C durante la noche. Después de lavar (3 x 90 µl/pocillo con tampón PBST) se añadieron 25 µl de muestras de anticuerpos anti-PD1 o de referencia (anti-huPD1 de ratón; Roche) y se incubó durante 1 h a TA en un agitador. Después de lavar (3 x 90 µl/pocillo con tampón PBST) se añadieron 25µl/pocillo de PD-L2 (quimera de B7-DC/PD-L2 humano recombinante-Fc; 1224-PL-100, R&D) y se incubó durante 1 h a TA en un agitador. Después de lavar (3 x 90 µl/pocillo con tampón PBST) se añadieron 25µl/pocillo de anti-H+L-POD humano de cabra

(JIR, 109-036-088) en una dilución 1:2000 y se incubaron a TA durante 1 h en un agitador. Después de lavar (3 x 90 µl/pocillo con tampón de PBST) se añadieron 25 µl/pocillo de sustrato de TMB (Roche, 11835033001) y se incubó hasta una DO de 2 - 3. La medición tuvo lugar a 370/492 nm.

- 5 Los resultados del ELISA se listan como valores de CE_{50} [ng/ml] en la Tabla de resumen 1 a continuación.

ELISA de mapeo epitópico/Ensayo de competición de unión

- Se recubrieron placas Nunc maxisorp (Nunc n.º 464718) con 25µl/pocillo de anticuerpo de captura (IgG anti-ratón de cabra; JIR; 115-006-071) y se incubaron durante 1 h a TA en un agitador. Después de lavar (3 x 90 µl/pocillo con tampón PBST) se bloquearon las placas durante 1 h con tampón PBS que contenía BSA al 2% a TA en un agitador. Después de lavar (3 x 90 µl/pocillo con tampón PBST) se añadieron 25µl de muestras de anti-PD1 de ratón y se incubaron durante 1 h a TA en un agitador. Después de lavar (3 x 90 µl/pocillo con tampón PBST) se bloqueó el anticuerpo de captura mediante 30 µl/pocillo de IgG de ratón (JIR; 015-000-003) durante 1 h a TA en un agitador. Al mismo tiempo, se preincubó ECD de PD1 biotinilado-AviHis con el segundo anticuerpo de muestra durante 1 h a TA en un agitador. Después de lavar la placa de ensayo (3 x 90 µl/pocillo con tampón PBST) se transfirió la mezcla de anticuerpo PD1 a la placa de ensayo y se incubó a TA durante 1 h en un agitador. Después de lavar (3 x 90 µl/pocillo con tampón PBST) se añadieron 25 µl/pocillo de POD estreptavidina (Roche, n.º 11089153001) en una dilución 1:4000 y se incubaron a TA durante 1 h en un agitador. Después de lavar (3 x 90 µl/pocillo con tampón de PBST) se añadieron 25 µl/pocillo de sustrato de TMB (Roche, n.º 11089153001) y se incubó hasta una DO de 1,5 - 2,5. La medición tuvo lugar a 370/492 nm. Los grupos epitópicos se definieron mediante agrupamiento jerárquico frente a anticuerpos de referencia.

- 25 **Tabla 1: Unión, inhibición de PD-L1 y grupos de región epitópica de anticuerpos para PD1 ejemplares (ELISA)**

Anticuerpo	ELISA de huPD1 CE₅₀ [ng/ml]	ELISA de cyPD1 CE₅₀ [ng/ml]	ELISA de inhibición de PD-L1 CI₅₀ [ng/ml]	ELISA de inhibición de PD-L2 CI₅₀ [ng/ml]	Grupo de región epitópica (mediante ensayo competitivo)
PD1- 0050	17,9	9,8	128	34	1
PD1- 0069	45,7	22,7	225	89	6
PD1- 0073	15,1	8,3	124	65	5
PD1- 0078	26,3	22,4	x	86	2
PD1- 0098	50,8	54,6	174	45	5
PD1- 0102	34,2	52,7	>35,5 µg/ml	140	4
PD1-0103	33,7	36,9	182	51	5

Tabla 2: Unión bioquímica y celular de anticuerpos para PD1 humanizados procedentes del anticuerpo de ratón parental PD1-0103 (ELISA)

Anticuerpo humanizado	ELISA de huPD1 CE₅₀ [ng/ml]	ELISA de cyPD1 CE₅₀ [ng/ml]	ELISA de CHO-PD1 CE₅₀ [ng/ml]
PD1-103-0312	11	8,3	10,1
PD1-103-0313	15	11	10,8
PD1-103-0314	11	8,3	7,7
PD1-103-0315	10	7,9	7,3

5 Caracterización Biacore de los anticuerpos anti-PD1 humanizados

Se ha usado un ensayo basado en resonancia de plasmón superficial (SPR) para determinar los parámetros cinéticos de la unión entre varias moléculas de unión a PD1 murino así como de referencias de unión de PD1 humano. Por lo tanto, se inmovilizó una IgG anti-humano

mediante acoplamiento de amina a la superficie de una microplaca sensora CM5 (Biacore). Entonces se capturaron las muestras y se unió el ECD de PD1 hu a estas. La superficie de la microplaca sensora se regeneró después de cada ciclo de análisis. Finalmente se obtuvieron las constantes de equilibrio y las constantes de velocidad cinética mediante el ajuste de los
5 datos a un modelo de interacción de Langmuir 1:1.

Se acoplaron aproximadamente 2000 unidades de respuesta UR de 20 µg/ml de IgG anti-humano (GE Healthcare n.º BR-1008-39) a las celdas de flujo 1 y 2 (como alternativa: 3 y 4) de una placa sensora CM5 en un Biacore T200 a pH 5,0 usando un kit de acoplamiento de amina suministrado por GE Healthcare.

10 La muestra y el tampón de ejecución fue HBS-EP+ (HEPES 0,01 M, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05 % v/v, pH 7.4). La temperatura de la celda de flujo se ajustó a 25 °C y la temperatura del compartimento de la muestra a 12 °C. El sistema se cebó con tampón de ejecución.

Las muestras se inyectaron durante 20 segundos con una concentración de 10 nM y se unieron
15 a la segunda celda de flujo. A continuación, un conjunto completo de concentraciones de ECD de PD1 humano (144 nM, 48 nM, 16 nM, 5,33 nM, 1,78 nM, 0,59 nM, 0,20 nM y 0 nM) sobre cada muestra durante 120 s seguido de un tiempo de disociación de 30/300 s y dos etapas de regeneración de 20 s con MgCl₂ 3 M, de los cuales el último contenía un "lavado adicional después de la inyección" con tampón de lavado.

20 Finalmente, los datos referenciados por partida doble se ajustaron a un modelo de interacción 1:1 de Langmuir con el programa informático Biacore T200 Evaluation. Los valores de K_D , k_a y k_d resultantes se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Constantes de velocidad cinética y constante de equilibrio para PD1-0103 quimérico y Ab para PD1 humanizada determinados mediante Biacore

25

Ligando	k_a [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_d [s ⁻¹]	K_D [nM]
PD1-0103 quimérico	3,86E+05	3,07E-04	0,8
PD1-0103-0312	1,95E+05	3,45E-04	1,8
PD1-0103-0313	1,60E+05	3,67E-04	2,3
PD1-0103-0314	1,87E+05	2,79E-04	1,5
PD1-0103-0315	1,89E+05	2,91E-04	1,5

Tal como se muestra en la Tabla 3, todas las versiones humanizadas de PD1-0103 quimérico (véase el ejemplo 1,3 para su generación) muestran propiedades cinéticas similares a las del anticuerpo parental (PD1-0103 quimérico).

Cinética

- 5 Se montó una placa sensora CM5 de serie S en el sistema Biacore 4000 y se abordaron hidrodinámicamente los puntos de detección de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se inmovilizó el anticuerpo de IgG policlonal de conejo <IgGFC γ M>R (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) a 10.000 UR sobre los puntos de detección 1 y 5 en las celdas de flujo 1, 2, 3 y 4. El acoplamiento se efectuó mediante química de EDC/NHS de
 10 acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los puntos restantes en las celdas de flujo sirvieron como referencia. El tampón de muestra era el tampón del sistema complementado con 1 mg/ml de carboximetildextrano.

En una realización, el ensayo se llevó a cabo a 25 °C. En otra realización, el ensayo se llevó a cabo a 37 °C. Se capturaron 50 nM de cada anticuerpo monoclonal murino sobre la superficie
 15 sensora mediante una inyección de 1 min a 10 μ l/min. Posteriormente, se inyectaron los antígenos respectivos en una serie de concentraciones de 100 nM, 2 x 33 nM, 11 nM, 4 nM, 1 nM y tampón del sistema 0 nM a 30 μ l/min durante 4 min de tiempo de fase de asociación. Se monitorizó la disociación durante otros 4 min. Se regeneró el sistema de captura usando una inyección de 3 min de glicina 10 mM, pH 1,5 a 30 μ l/min. Se calcularon los datos cinéticos
 20 relevantes usando el programa informático de evaluación de Biacore de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Mapeo de epítomos

Se dotó a un instrumento Biacore 4000 de un sensor Biacore CAP y se preparó del modo recomendado por el fabricante. El tampón del instrumento fue HBS-ET (HEPES 10 mM, pH
 25 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Tween 20 al 0,005% p/v. El instrumento funcionó a 25 °C.

Todas las muestras se diluyeron en tampón de sistema. Se capturó antígeno de ECD de PD1-AviHis biotinilado de 35kDa a 200 UR sobre la superficie sensora de CAP mediante una inyección de 1 min a 30 μ l/min en las celdas de flujo 1, 2, 3 y 4 en los puntos 1 y 5. Los puntos 2, 3 y 4 sirvieron como referencia. En otra realización, se capturó un antígeno de ECD
 30 de PD1-AviHis biotinilado de 35 kDa a 200 UR sobre el sensor CAP del mismo modo.

Posteriormente, se inyectó un anticuerpo primario a 100 nM durante 3 min a 30 μ l/min seguido de la inyección de un anticuerpo secundario a 100 nM durante 3 min a 30 μ l/min. El anticuerpo primario se inyectó hasta la saturación completa del antígeno presentado en la superficie. Al final de las fases de inyección de anticuerpo primario y secundario, se ajustaron los puntos de información de "unión tardía" (BL) para monitorizar la respuesta de unión de los anticuerpos respectivos. Se calculó la relación molar, un cociente entre la respuesta de unión del anticuerpo secundario "BL2" y la respuesta del anticuerpo primario "BL1". La relación molar se usó como indicador de la accesibilidad del antígeno del anticuerpo secundario, cuando el antígeno ya estaba en complejo con el anticuerpo primario.

- 10 Los complejos se retiraron completamente de la superficie sensora mediante una inyección durante 2 min a 30 μ l/min de tampón de regeneración de guanidina-HCl 2M, NaOH 250 mM según las recomendaciones del fabricante, seguido de una inyección de 1 min a 30 μ l/min de tampón del sistema.

1.3 Efecto de diferentes anticuerpos anti-PD1 en la producción de citocinas en una reacción de linfocitos mixtos (MLR)

- 15 **3A)** La reacción de linfocitos mixtos (MLR) es un inmunoensayo celular que mide la activación de linfocitos de un individuo (donante X) a linfocitos de otro individuo (donante Y). Se usó una reacción mixta de linfocitos para demostrar el efecto de bloquear la ruta de PD1 para células efectoras linfocitarias. Se ensayaron células T en el ensayo respecto de su activación y secreción de IFN-gamma en presencia o ausencia de anticuerpos monoclonales anti-PD1.

- 25 Para llevar a cabo una MLR alogénica, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de al menos cuatro donantes sanos de tipo HLA desconocido mediante centrifugación de gradiente de densidad usando Leukosep (Greiner Bio One, 227 288). En resumen, se diluyeron muestras de sangre heparinizada con un volumen triple de PBS y se dispusieron en capas alícuotas de 25 ml de la sangre diluida en tubos Leukosep de 50 ml. Después de centrifugar a 800 x g durante 15 min a temperatura ambiente (sin freno) se recogieron las fracciones que contenían linfocitos, se lavaron en PBS y se usaron directamente en el ensayo funcional o se resuspendieron en medio de congelación (DMSO al 10%, FCS al 90 %) a 1,0E+07 células/ml y se almacenaron en nitrógeno líquido. Se configuraron reacciones MLR de 2 vías individuales mezclando PBMC de dos donantes diferentes a una relación 1:1 de células estimuladoras/respondedoras y se efectuaron co-

cultivos al menos en placas de 96 pocillos de fondo plano duplicadas durante 6 días a 37 °C, CO₂ al 5%, en presencia o sin un intervalo de concentración diferente de los anticuerpos monoclonales anti-PD1, PD1-0050, PD1-0069, PD1-0073, PD1-0078, PD1-0098, PD1-0102, PD1-0103. Como anticuerpos anti-PD1 de referencia, se sintetizaron anticuerpos que comprendían los dominios VH y VL de nivolumab (también conocido como MDX-5C4 o MDX-1106) o de pembrolizumab (también conocido como MK-3475 u Org 1.09A) y se clonaron con armazones de IgG1 humana (con las mutaciones L234A, L235A y P329G (Índice EU de Kabat)). Como control negativo bien no se usó anticuerpo o se usó un anticuerpo de control de isotipo y se usó IL-2 humana recombinante (20 UE/ml) como control positivo. Después del día 6 se extrajeron 100 µl de medio de cada cultivo para la medición de citocinas. Se midieron los niveles de IFN-gamma usando el kit de ELISA OptEIA (BD Biosciences).

Los resultados se muestran en la tabla 4 (secreción/liberación de IFN-γ). Los anticuerpos monoclonales anti-PD1 promovieron la activación de células T y la secreción de IFN-gamma de una manera dependiente de la concentración. Se calculó el valor del % de aumento de la secreción de IFNγ en relación a la producción de IFN-γ de MRL sin añadir cualquier mAb de bloqueo (valor de IFNγ inducido por estimulación alogénica basal como E-c) y MLR añadiendo 20 EU/ml de IL-2 humana recombinante (control positivo = valor de IFNγ del 100% como E+c) y se calculó de acuerdo con la fórmula: Estimulación relativa [%] = ((Ejemplo - E-c)/(E+c - E-c)*100).

Tabla 4: Porcentaje de secreción de IFN-gamma después de estimulación alogénica y tratamiento con anticuerpo anti-PD1 en comparación con el efecto del tratamiento con IL-2 humana recombinante (20 EU/ml) (= aumento del 100%) como control positivo

	Concentración (µg/ml)	1:12	1:120	1:1200	Efecto en MLR
PD1-0050	44	136	96	33	+++
PD1-0069	60	76	71	55	+++
PD1-0073	43	103	63	38	++
PD1-0078	64	99	72	21	++

Varios anticuerpos que bloquean a PD1, PD1-0050, PD1-0069, PD1-0073, PD1-0078, PD1-0098, PD1-0102, PD1-0103 demostraron una fuerte acción inmunomoduladora potenciando la

secreción de interferón gamma (IFN- γ) (datos no mostrados para todos los anticuerpos).

3B) En un experimento adicional, se evaluó PD1-0103 quimérico (isotipo IgG1 humano con las mutaciones L234A, L235A y P329G (índice EU de Kabat)). El bloqueo de PD1 con PD1-0103 quimérico potencia fuertemente la secreción de IFN-gamma por células T humanas primarias alogénicas estimuladas. PD1-0103 quimérico es más potente que los anticuerpos anti-PD1 de referencia (véase la **figura 1**).

Por comparación, se sintetizaron los anticuerpos anti-PD1 de referencia que comprendían los dominios VH y VL de nivolumab (también conocido como MDX5C4 o MDX-1106) y de pembrolizumab (también conocido como MK-3475 u Org 1.09A) y se clonaron con armazones de IgG1 humana (con las mutaciones L234A, L235A y P329G (índice EU de Kabat)).

3C) En experimentos adicionales, se evaluó la actividad inmunomoduladora de las variantes humanizadas del anticuerpo anti-PD1, PD1-0103 (anticuerpos humanizados PD1-0103-0312, PD1-0103-0314, en las figuras 2 y 3) a) la liberación (secreción) de IFN γ b) la liberación (secreción) de TNF-alfa en MLR tal como se ha descrito anteriormente. Se compararon los efectos del anticuerpo quimérico PD1-0103 y sus versiones humanizadas con los anticuerpos anti-PD1 de referencia que comprenden los dominios VH y VL de nivolumab (también conocido como MDX5C4 o MDX-1106) y pembrolizumab (también conocido como MK-3475 U Org 1.09A) con armazones de IgG1 humana (con las mutaciones L234A, L235A y P329G (Índice EU de Kabat)). Después de 6 días de cultivo de MLR, se extrajeron 50 μ l de sobrenadante y se midieron múltiples citocinas en un solo cultivo usando el ensayo para Th1/Th2 de citocinas humanas Bio-Plex Pro™ (Bio-Rad Laboratories Inc.). (datos no mostrados para todas las citocinas).

El anticuerpo PD1-0103 quimérico y sus versiones humanizadas (PD1-0103_0312 y PD-0103_0314) fueron más potentes en comparación con los anticuerpos anti-PD1 de referencia para potenciar la activación de células T y la secreción de IFN-gamma (véase la **figura 2**).

Además, el anticuerpo PD1-0103 quimérico y sus variantes de humanización aumentan la secreción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) (véase la figura 3) y de IL-12 (datos no mostrados) por células presentadoras de antígenos y potencian la capacidad de los monocitos/macrófagos o de las células presentadoras de antígenos para estimular a una célula T.

1.4 Efecto del bloqueo de anti-PD1 en la liberación de granzima B citotóxica y de IFN- γ por células T CD4 humanas cultivadas conjuntamente con células dendríticas maduras alogénicas

Para investigar adicionalmente el efecto del tratamiento anti-PD1 en una configuración alogénica, se desarrolló un ensayo en el que se cultivan conjuntamente células T CD4 recién purificadas durante 5 días en presencia de células dendríticas alogénicas maduras (mDC) procedentes de monocitos. Se aislaron monocitos a partir de PBMC recientes una semana antes mediante adherencia plástica seguida de la retirada de las células no adherentes. Entonces se generaron CD inmaduras a partir de los monocitos cultivándolos durante 5 días en medio que contenía GM-CSF (50 ng/ml) e IL-4 (100 ng/ml). Para inducir la maduración de las iDC, se añadió TNF- α , IL-1 β e IL-6 (50 ng/ml de cada) al medio de cultivo durante 2 días adicionales. Entonces se evaluó la maduración de las DC midiendo su expresión superficial de la clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHCII), CD80, CD83 y CD86 mediante citometría de flujo (LSRFortessa, BD Biosciences).

En el día de la reacción mínima de linfocitos mixtos (mMLR), se enriquecieron las células T CD4 mediante un kit de microperlas (Miltenyi Biotec) a partir de 10^8 PBMC obtenidos de un donante no relacionado. Antes del cultivo, se marcaron las células T CD4 con 5 μ M de succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFSE). Entonces se sembraron en placas 10^5 células T CD4 en una placa de 96 pocillos junto con alo-DC maduras (5:1) en presencia o ausencia de anticuerpo de bloqueo anti-PD1 (PD1-0103, PD1-0103 quimérico o los anticuerpos humanizados PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314, PD1-0103-0315, abreviados como 0312, 0313, 0314, 0315 en **las figuras 4A y 4 B**), a la concentración de 10 μ g/ml si no se indica de manera distinta en las figuras.

Cinco días después se recogieron los sobrenadantes de cultivo, usados después para medir los niveles de IFN- γ mediante ELISA (R&D systems) y se dejaron las células a 37 °C durante 5 horas adicionales en presencia de Golgi Plug (Brefeldina A) y Golgi Stop (Monensina). Después, se lavaron las células, se tiñeron superficialmente con anticuerpo anti-CD4 humano y el colorante fijable de vivo/muerto Aqua (Invitrogen) antes de fijarse/permeabilizarse con tampón Fix/Perm (BD Bioscience). Se llevó a cabo la tinción celular para granzima B (BD Bioscience), IFN- γ e IL-2 (ambas de eBioscience).

También se ensayaron diferentes concentraciones de las variantes humanizadas de PD1-0103 (anticuerpos humanizados PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314, PD1-0103-

0315, abreviados como 0312, 0313, 0314, 0315 en las figuras, véase también el ejemplo 1,6 más adelante) y se observó que eran igualmente buenos para potenciar a granzima B e interferón gamma. DP47 es una IgG humana sin unión con una mutación LALA en la porción FcγR para evitar el reconocimiento por FcR y se usó como control negativo. Los resultados se muestran en las **figuras 4A y 4B**.

1.5 Derivados de anticuerpos quiméricos

Se generaron anticuerpos para PD1 quiméricos amplificando las regiones variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos de ratón anti-PD1 PD1-0098, PD1-0103 mediante PCR y clonándolos en vectores de expresión de cadena pesada como proteínas de fusión con armazones de IgG1 humana/CH1-bisagra-CH2-CH3 humano con las mutaciones L234A, L235A y P329G (índice EU de Kabat)) (leucina 234 a alanina, leucina 235 a alanina, prolina 329 a glicina) abrogando las funciones efectoras y los vectores de expresión de cadena ligera como proteínas de fusión a C-kappa humana. Los plásmidos de LC y HC se transfectaron entonces conjuntamente en HEK293 y se purificaron después de 7 días de los sobrenadantes mediante métodos convencionales de purificación de anticuerpos. Los anticuerpos quiméricos para PD1 se renombraron como PD1-0098 quimérico (chiPD1-0098) y PD1-0103 quimérico (chiPD1-0103). Por comparación, se sintetizaron los anticuerpos anti-PD1 de referencia que comprendían los dominios VH y VL de nivolumab (también conocido como MDX-5C4 o MDX-1106) y de pembrolizumab (también conocido como MK-3475 u Org 1.09A) y se clonaron con armazones de IgG1 humana (con las mutaciones L234A, L235A y P329G (índice EU de Kabat)).

1.6 Generación, expresión y purificación de variantes humanizadas del anticuerpo anti-PD1 PD1-0103 (huMab PD-0103) y caracterización

Humanización de los dominios VH y VL del anticuerpo murino anti-PD1 0103

Basándose en la secuencia de aminoácidos de los dominios VH y VL murinos del anticuerpo anti-PD1 murino PD1-0103 (SEQ ID NO: 43 y 44), se generaron variantes humanizadas del anticuerpo anti-PD1.

La variante de VH humanizado se basa en la IMGT_hVH_3_23 de línea germinal humana en combinación con IGHJ5-01 de línea germinal de elemento J humano con varias mutaciones. (que dan como resultado la SEQ ID NO: 45).

Las variantes humanizadas de VL se basan en las líneas germinales IMGT_hVK_4_1, IMGT_hVK_2_30, IMGT_hVK_3_11 e IMGT_hVK_1_39 en combinación con la línea germinal IGKJ1-01 con un elemento J humano. Diferentes mutaciones dieron como resultado las variantes humanizadas de SEQ ID NO: 46 a SEQ ID NO: 49.

- 5 Se retrotradujeron las secuencias de aminoácidos humanizadas para las regiones variables de cadena pesada y ligera de PD1-0103 en ADN y se sintetizó el ADNc resultante (GenArt) y después se clonó en vectores de expresión de cadena pesada como proteínas de fusión con armazones de IgG1 humana/CH1-bisagra-CH2-CH3 humano con mutaciones LALA y PG (leucina 234 a alanina, leucina 235 a alanina, prolina 329 a glicina) abrogando las funciones
- 10 efectoras o en los vectores de expresión de cadena ligera como proteínas de fusión a C-kappa humana. Los plásmidos de LC y HC se transfectaron entonces conjuntamente en HEK293 y se purificaron después de 7 días de los sobrenadantes mediante métodos convencionales de purificación de anticuerpos. Los anticuerpos para PD1 humanizados se nombraron del modo siguiente:

15 **Tabla 5: Secuencias de VH y VL de anticuerpos variantes humanizados de PD1-0103**

Anticuerpos humanizados de PD1-0103	Variante de VH humanizada/SEQ ID NO:	Variante de VL humanizada/SEQ ID NO:
PD1-0103-0312	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22
PD1-0103-0313	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 23
PD1-0103-0314	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 24
PD1-0103-0315	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 25

Tabla 6: Secuencias de HVR de anticuerpos variantes humanizados de PD1-0103

Anticuerpos humanizados de PD1-0103	HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 de variante humanizada/SEQ ID NO:	HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 de variante humanizada/SEQ ID NO:
PD-0103-0312	SEQ ID NO: 13, 14 y 15	SEQ ID NO: 16, 17 y 18
PD-0103-0313	SEQ ID NO: 13, 14 y 15	SEQ ID NO: 16, 17 y 18
PD-0103-0314	SEQ ID NO: 13, 14 y 15	SEQ ID NO: 16, 17 y 18
PD-0103-0315	SEQ ID NO: 13, 14 y 15	SEQ ID NO: 16, 17 y 18

- Las variantes humanizadas del anticuerpo PD1-0103 y de PD1-0103 quimérico parental se
- 20 caracterizaron del modo descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7: Resumen de resultados para las variantes humanizadas del anticuerpo PD1-0103 y PD1-0103 quimérico parental

Ensayo	PD1-0103 quimérico	PD-0103- 0312	PD-0103- 0313	PD-0103- 0314	PD-0103- 0315
Afinidad K_D [nM] a 37°C	2,0 / 0,8	1,5 / 1,8	1,9 / 2,3	1,6 / 1,5	1,7 / 1,5
CE ₅₀ ELISA [nM]	0,2	0,1	0,07	0,07	0,06
CE ₅₀ de CHO- PD1	+	+	+	+	+
CI ₅₀ de PD-L1, 2 [nM]	1,35	tbd	tbd	tbd	tbd
Ensayo de reacción de linfocitos mixtos	+++	+++	+++	++++	++
reactividad cruzada con cinomolgo (CE ₅₀ [nm])	+	0,08	0,06	0,05	0,04

1.7 Potencia de neutralización de anticuerpos para PD1

- 5 Para probar la potencia de neutralización de los anticuerpos para PD1 generados en el laboratorio para imitar la restauración de una respuesta de células T suprimida *in vivo* se usó un ensayo indicador de PD1/PD-L1 disponible en el comercio (Promega). Este sistema consiste en células Jurkat PD1+ NFAT y un homólogo de CHO PD-L1+, que también proporciona la señal de activación. En principio, el sistema indicador se basa en tres etapas: (1)
- 10 activación de NFAT mediada por TCR, (2) inhibición de la señal de NFAT tras la activación por el eje de PD-1/PD-L1 y (3) recuperación de la señal de NFAT mediante anticuerpos de bloqueo para PD1.

Material y métodos:

- Medio de PD-L1: PAN Biotech (n.º P04-03609); FBS (10%) y L-Gln (4 mM)
 - Medio de ensayo: RPMI 1640 (n.º 31870; Invitrogen), HEPES 25 mM, L-Gln 2 mM, FBS (2%)
- 5 • Células usadas para este ensayo (ambos tipos celulares se adquirieron a través de Promega):

células CHO PD-L1+ (lote n.º 139147): $2-3 \times 10^4$ células/96 pocillos

células Jurkat PD1+ NFAT (lote n.º 133024: $3,5 \times 10^4$ células/pocillo)

En el día 1, se descongelaron las células PD-L1+, se sembraron a la concentración celular
 10 indicada en el medio anteriormente indicado y se cultivaron durante una noche a 37°C y CO₂ al 5%. Al día siguiente, se retiró el medio y se incubaron las células PD-L1+ con los anticuerpos preparados a las concentraciones indicadas (en medio de ensayo). En paralelo, se descongelaron las células Jurkat PD1+ NFAT y se transfirieron los números de células anteriormente mencionados a y se cultivaron conjuntamente con las células PD-L1+. Después
 15 de una incubación de 6 h a 37 °C y CO₂ al 5%, Se calentó el sustrato Bio-Glo a temperatura ambiente (1-2 h antes de la adición). Se retiró la placa de cultivo celular del incubador y se ajustó a temperatura ambiente (10 min) antes de añadirse 80 µl de solución Bio-Glo por pocillo, se incubó durante 5-10 min antes de medir la luminiscencia en un lector Tecan Infinite de acuerdo con las recomendaciones del fabricante del kit. Los resultados pueden
 20 verse en las figuras 5A y 5B, donde se muestra la restauración de una supresión mediada por PD1/PD-L1 de la señal de NFAT por diferentes anticuerpos para PD1 tras la estimulación de TCR: **Figura 5 A:** PD1-0103 quimérico mostró un efecto reproduciblemente superior cuando se compara con un anticuerpo de referencia. Como referencia, se sintetizó un anticuerpo anti-PD1 que comprende los dominios VH y VL de nivolumab (también conocido como MDX-
 25 5C4 o MDX-1106) y se clonó con armazones de IgG1 humana (con las mutaciones L234A, L235A y P329G (Índice EU de Kabat)). **Figura 5B:** Las cuatro variantes humanizadas de PD1-0103 demostraron una potencia *in vitro* similar a la del anticuerpo principal y también fueron ligeramente superiores al anticuerpo de referencia.

Ejemplo 2

Preparación de moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc que contienen trímero de ligando 4-1BB dirigidas a PD1

Se sintetizaron diferentes fragmentos de la secuencia de ADN codificante de parte del
 5 ectodominio (aminoácidos 71-254 y 71-248) del ligando 4-1BB humano de acuerdo con la secuencia P41273 de la base de datos UniProt (SEQ ID NO: 103).

2.1. Preparación de molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB (71-254) dirigida a PD1 (0314) con dominios CH1-CL cruzados con restos cargados (construcción 7.1)

10 Se clonó un polipéptido que contiene dos ectodominios de ligando de 4-1BB (71-254), separados por enlazadores (G4S)₂ y se fusionaron al dominio CL de IgG1 humano, tal como se ilustra en la **figura 6A**: ligando de 4-1BB humano, conector (G4S)₂, ligando de 4-1BB humano, conector (G4S)₂, CL humano.

Se clonó un polipéptido que contiene un ectodominio de ligando de 4-1BB (71-254) y
 15 fusionado al dominio CH1 de IgG1 humana, tal como se describe en la **figura 6B**: ligando de 4-1BB humano, conector (G4S)₂, CH humano.

Para mejorar el emparejamiento correcto se han introducido las siguientes mutaciones en los CH-CL cruzados. En el ligando de 4-1BB dimérico fusionado a CL humano se introdujeron las mutaciones E123R y Q124K. En el ligando de 4-1BB monomérico fusionado a CH1
 20 humano, se clonaron las mutaciones K147E y K213E en el dominio CH1 humano como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional n.º WO 2015/150447.

Las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera que codifican una molécula de unión específica para PD1, clon 0314 (o 0103-0314), se subclonaron en fase bien con la cadena pesada constante del agujero o con la cadena ligera constante de IgG1 humana.
 25 La generación y preparación de las moléculas de unión a PD1 se describe en el ejemplo 1.

Las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala se han introducido en la región constante de las cadenas de pesos y agujeros para abrogar la unión a receptores de Fc gamma de acuerdo con el método descrito en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional n.º WO 2012/130831.

Para todas las construcciones se usó la tecnología de heterodimerización de pomos en agujeros con las mutaciones S354C/T366W en la cadena de pomos y las correspondientes mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V en la cadena de agujeros.

La combinación de la cadena de ligando dimérico-Fc pomo que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión de CH1 monomérico, la cadena dirigida anti-PD1-cadena de Fc de agujeros que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-PD1 permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando de 4-1BB trimérico y un Fab de unión a PD1 ensamblados (**figura 7**, construcción 7.1).

La tabla 8 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB humano (71-254)-PD1 (0314) monovalente que contiene sobrecruzamiento de CH1-CL y restos cargados (construcción 7.1).

Tabla 8: Secuencias de la construcción 7.1 de molécula de fusión de Fc (kih) que contiene ligando de 4-1BB humano (71-254) dirigida a PD1 (0314) monovalente

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
131	secuencia de nucleótidos de 4-1BBL hu dimérico (71-254)-CL* Fc de cadena de pomo	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGT GGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTG GTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGG AACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCT GCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTT CAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCT CCAAGAAGCGAAGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAG GATCTAGAGAGGGACCCGAAGTGTCCCCTGACGATCCA GCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTGCCCCA GCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCT

		GAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCC TGA CTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAA CTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTT CAGCTGGA ACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTC AGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCG CTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGA CCTGCCACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCT TCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGAC AGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCC CGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTG GGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTGCCGGACTG CCAAGCCCTAGATCAGAAGGGGGCGGAGGTTCCGGAGG GGGAGGATCTCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTTAT CTTCCCACCCAGCGACCGGAAGCTGAAGTCTGGCACAG CCAGCGTCGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCCGCG AGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAG AGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAGCAGGACA GCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACC CTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGC CTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGAC CAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCGACAAGACCCACA CCTGTCCTCCATGCCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGCGGCC CTAGCGTGTTCTGTTCCTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCC TGATGATCAGCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGG TGGATGTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATT GGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGACC AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCC ATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGT GGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA
--	--	---

		GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCGGGTAAA
132	secuencia de nucleótidos de 4- 1BBL hu monomérico (71- 254)-CH1*	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGT GGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTG GTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGG AACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCT GCTGGCGCTGCAGCTCTGGCTCTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCTCCGAGGCCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTT CAAGGCCGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGACT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGAGCCAGGCACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCTGCCGGCCTGCCTAGC CCTAGATCTGAAGGCGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGAGG ATCTGCTAGCACAAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGC CCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCC TGGGCTGCCTGGTGGAAAGTTACTTCCCCGAGCCCGTGA CCGTGTCCTGGAATTCTGGCGCCCTGACAAGCGGCGTG ACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACT CTCTGAGCAGCGTCTGACAGTGCCAGCAGCTCTCTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACGAGAAGGTGGAACCCAAGTC CTGC
133	secuencia de nucleótidos de cadena Fc agujero de anti- PD1(0314)	GAAGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGGGGACTGGTCCA GCCCCGGCGGTTCCCTGAGGCTGTCTTGCGCCGCTTCAGG GTTTCAGCTTTTCTCTTTACACCATGAGTTGGGTCAGACA GGCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGTCGCCACAATCA GCGGTGGCGGGCGCGACATTTATTACCCAGATTCCGTGA AAGGACGGTTCACCATCTCTAGGGACAACCTCAAAGAAT ACTCTGTATTTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGAT ACAGCAGTTTACTACTGTGTGCTCCTGACCGGCCGCGTC TATTTTGCCCTTGACTCCTGGGGACAAGGCACTCTGGTG ACCGTATCTAGTGCTAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTC

		CCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCAC AGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA GCCCGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGAGCCCTGACCTC CGGCGTGACACCTTCCCCGCGGTGCTGCAGAGTTCTGG CCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAG CAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGA GCCCAAGAGCTGCGACAAAACCTCACACATGCCACCGT GCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTC CTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGG ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCA GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGT GAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA
134	secuencia de nucleótidos de cadena ligera de anti-PD1 (0314)	GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGCCACACTCTCCCTG TCTCCTGGCGAAAGGGCTACCCTTTCATGCAGAGCAAGC GAGTCCGTGGACACTTCTGATAACAGTTTCATTCACTGG TATCAGCAGAAGCCAGGGCAGAGCCCCCGCTGCTCAT CTATCGGTCCTCTACACTGGAGTCAGGGATTCTGCCAG GTTTAGCGGCTCCGGTTCTGGGACCGACTTCACTTTGAC CATCAGTAGCCTGGAACCAGAGGATTTTGCTGTGTACTA TTGTCAACAGAATTACGACGTCCCCTGGACATTCGGCCA GGAACCAAAGTGGAGATAAAGCGTACGGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA AATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACT

		TCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGAT AACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTAC AGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCA GCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
74	hu 4-1BBL dimérico (71- 254)-CL* Fc de cadena de pomo	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGGSREGPEL SPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN AFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFP PSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNREGCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
75	hu 4-1BBL monomérico (71- 254) – CH1*	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGGSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDEKVEPKSC
82	cadena Fc agujero anti-PD1(0314)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGTLVTVSS

		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
83	cadena ligera de anti-PD1 (0314)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDTSNFIHWYQQ KPGQSPRLLIYRSSTLESIGIPARFSGSGGTDFLTISSELPED FAVYYCQQNYDVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC

2. 2. Preparación de molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB (71-254) dirigida a PD1 (0314) con dominios CH1-CL cruzados sin restos cargados (construcción 7.2)

- 5 Se clonó un polipéptido que contiene dos ectodominios de ligando de 4-1BB (71-254), separados por enlazadores (G4S)₂ y se fusionaron al dominio CL de IgG1 humano, tal como se ilustra en la **figura 6C**: ligando de 4-1BB humano, conector (G4S)₂, ligando de 4-1BB humano, conector (G4S)₂, CL humano.

- 10 Se clonó un polipéptido que contiene un ectodominio de ligando de 4-1BB (71-254) y fusionado al dominio CH1 de IgG1 humana, tal como se describe en la **figura 6D**: ligando de 4-1BB humano, conector (G4S)₂, CH1 humano.

Las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera que codifican una molécula de unión específica para PD1, clon 0103-0314, se subclonaron en fase bien con la cadena pesada constante del agujero o con la cadena ligera constante de IgG1 humana.

- 15 Las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala se han introducido en la región constante de las cadenas de pomos y agujeros para abrogar la unión a receptores de Fc gamma (WO 2012/130831).

La combinación de la cadena de ligando dimérico-Fc como que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión de CH1 monomérico, la cadena dirigida anti-FAP-cadena de Fc de agujeros que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-FAP permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando de 4-1BB trimérico y un Fab de unión a FAP ensamblados (**figura 7**, construcción 7.2).

La tabla 9 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB humano (71-254) anti-PD1 (0314) monovalente que contiene sobrecruzamiento de CH1-CL sin restos cargados (construcción 7.2).

Tabla 9: Secuencias de la construcción 7.2 de molécula de fusión de Fc (kih) que contiene ligando de 4-1BB humano (71-254) dirigida a PD1 (0314) monovalente

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
135	secuencia de nucleótidos de 4-1BBL hu dimérico (71-254)-CL Fc de cadena de pomo	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGT GGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTG GTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGG AACTGCGGAGAGTGTTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCT GCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTT CAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCT CCAAGAAGCGAAGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAG GATCTAGAGAGGGACCCGAAGTGTCCCCTGACGATCCA GCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTGCCCCA GCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCT GAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCC TGA CTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAA

		CTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTT CAGCTGGAAGTGAAGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTC AGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCG CTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGA CCTGCCACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCT TCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGAC AGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCC CGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTG GGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTGCCGGACTG CCAAGCCCTAGATCAGAAGGGGGCGGAGGTTCCGGAGG GGGAGGATCTCGTACGGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTAT CTTTCCCCCATCCGATGAACAGCTGAAAAGCGGCACCGC CTCCGTCTGTGTCTGCTGAACAATTTTTACCCTAGGGA AGCTAAAGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCACTGCAGT CCGGCAACTCCCAGGAATCTGTGACAGAACAGGACTCC AAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACACTG TCTAAGGCTGATTATGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGC GAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGACAAGACCCACACCT GTCCCCCTTGTCTGCCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTT CTGTGTTCTGTTCCTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGA TGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTG GATGTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGG TACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGACCAA GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC GGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT GCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGG TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAA GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
--	--	---

		CTCCGGGTAAA
136	secuencia de nucleótidos de 4-1BBL hu monomérico (71-254)-CH1	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGT GGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTG GTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGG AACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCT GCTGGCGCTGCAGCTCTGGCTCTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCTCCGAGGGCCCGGAATAGCGCATTGTTGGGTTT CAAGGCCGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGACT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGAGCCAGGCACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCTGCCGGCCTGCCTAGC CCTAGATCTGAAGGCGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGAGG ATCTGCTAGCACCAAAGGCCCTTCCGTGTTTCTCTGGC TCCTAGCTCCAAGTCCACCTCTGGAGGCACCGCTGCTCT CGGATGCCTCGTGAAGGATTATTTCTCTGAGCCTGTGAC AGTGTCTCTGGAATAGCGGAGCACTGACCTCTGGAGTGC ATACTTTCCCCGCTGTGCTGCAGTCCTCTGGACTGTACA GCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCAGCAGCAGCCTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGT CTTGT
133	secuencia de nucleótidos de cadena Fc agujero de anti-PD1(0314)	véase la Tabla 8
134	secuencia de nucleótidos de cadena ligera de anti-PD1(0314)	véase la Tabla 8

76	hu 4-1BBL dimérico (71- 254)-CL Fc de cadena de pomo	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGGSREGPEL SPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN AFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
77	hu 4-1BBL monomérico (71- 254) – CH1	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGGSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSC
82	cadena Fc agujero anti-PD1(0314)	véase la Tabla 8
83	cadena ligera de anti-PD1 (0314)	véase la Tabla 8

2.3 Preparación de molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB (71-254) dirigida a PD1 (0314) bivalente con los ligandos de 4-1BB diméricos y monoméricos fusionados en el extremo C-terminal de cada cadena pesada (construcción 7.3)

- 5 Se clonó un polipéptido que contiene dos ectodominios de ligando de 4-1BB (71-254), separados por enlazadores (G4S)₂ al extremo C-terminal de la cadena de Fc de agujero de IgG1 humana, tal como se ilustra en la **figura 6E**: Fc de agujero de IgG1 humana, conector (G4S)₂, ligando de 4-1BB humano, conector (G4S)₂, ligando de 4-1BB humano. Un polipéptido que contiene un ectodominio de ligando de 4-1BB (71-254) se fusionó al extremo
- 10 C-terminal de la cadena Fc pomo de IgG1 humana, tal como se describe en la **figura 6F**: Fc pomo de IgG1 humana, conector (G4S)₂, ligando de 4-1BB humano.

Las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera que codifican una molécula de unión específica para PD1, clon 0103-0314, se subclonaron en fase bien con la cadena pesada constante del agujero, con el pomo o con la cadena ligera constante de IgG1

15 humana.

Las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala se han introducido en la región constante de las cadenas de pomos y agujeros para abrogar la unión a receptores de Fc gamma de acuerdo con el método descrito en el documento WO 2012/130831.

- La combinación de la cadena de ligando dimérico de agujero de huIgG1 anti-FAP que
- 20 contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V, la cadena de ligando monomérico de pomo de huIgG1 anti-FAP que contiene las mutaciones S354C/T366W y la cadena ligera anti-FAP permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando de 4-1BB trimérico y dos Fab de unión a PD1 ensamblados (**figura 7**, construcción 7.3).

La tabla 10 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la construcción 7.3 de

25 molécula de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB dirigida a PD1 (0314) bivalente (trímero separado de PD1 con 2 Fab anti-PD1, ligando de 4-1BB dimérico y monomérico fusionado en el extremo C-terminal de cada cadena pesada, respectivamente).

Tabla 10: Secuencias de la construcción 7.3 de molécula de fusión de Fc (kih) que contiene ligando de 4-1BB humano (71-254) dirigida a PD1 (0314) bivalente

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
137	secuencia de nucleótidos de cadena de Fc agujero de anti-PD1(0314) fusionada a hu 4-1BBL dimérico (71-254)	GAAGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGGGGACTGGTCCA GCCCCGGCGGTTCCCTGAGGCTGTCTTGCGCCGCTTCAGG GTTTCAGCTTTTCTCTTACACCATGAGTTGGGTCAGACA GGCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGTCGCCACAATCA GCGGTGGCGGGCGCGACATTTATTACCCAGATTCCGTGA AAGGACGGTTCACCATCTCTAGGGACAACCTCAAAGAAT ACTCTGTATTTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGAT ACAGCAGTTTACTACTGTGTGCTCCTGACCGGCCGCGTC TATTTTGCCCTTGACTCCTGGGGACAAGGCACTCTGGTG ACCGTATCTAGTGCTAGCACCAAGGGCCCTCCGTGTTC CCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCAC AGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA GCCCCGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGAGCCCTGACCTC CGGCGTGCACACCTTCCCCGCGGTGCTGCAGAGTTCTGG CCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAG CAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGA GCCCCAAGAGCTGCGACAAAACCTCACACATGCCACCGT GCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTC CTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGG ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTCTCGTGCGCA GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGT GAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC

		ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGA GGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCT GGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCA GAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAG CGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCT GAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCA AGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGC GGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTC TGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCG CTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCA GCTCCGAGGCCCCGGAATAGCGCATTGTTGGGTTTCAAGGCA GGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTG CATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCA GCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAAGT GACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAG CGAAGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAG AGGGACCCGAACTGTCCCCTGACGATCCAGCCGGGCTG CTGGATCTGAGACAGGGAATGTTCCGCCAGCTGGTGGCT CAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTAC TCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGG ACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGG CTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTTCAGCTGGAAC TGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTG TCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCT GGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGACCTGCCACCA GCCTCTAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTC AGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGG GAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTT GGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTC GCGTGACACCTGAGATCCCTGCCGGACTGCCAAGCCCTA GATCAGAA
138	secuencia de nucleótidos de cadena de Fc pomo de anti-	GAAGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGGGGACTGGTCCA GCCCGGCGGTTCCCTGAGGCTGTCTTGCGCCGCTTCAGG GTTCAGCTTTTCCTCTTACACCATGAGTTGGGTCAGACA GGCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGCCACAATCA

	PD1(0314) fusionada a hu 4- 1BBL monomérico (71- 254)	GCGGTGGCGGGCGCGACATTTATTACCCAGATTCCGTGA AAGGACGGTTCACCATCTCTAGGGACAACCTCAAAGAAT ACTCTGTATTTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGAT ACAGCAGTTTACTACTGTGTGCTCCTGACCGGCCGCGTC TATTTTGCCCTTGACTCCTGGGGACAAGGCACTCTGGTG ACCGTATCTAGTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTC CCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA CCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAG CGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGG ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGC CCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCC CAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCTCT TCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGA CCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCA TCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCTGCAGAGATGA GCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAA GGGCTTCTACCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCACCCCC CCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACTCC AAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAA CGTGTTTACAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACA ACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGC GGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGG GCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGG ACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCAGA ACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCG ATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGA GCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAG
--	--	--

		GCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTTCAGCTGGAACTGCGG AGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTG GCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCT GCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGC TCCGAGGCCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAG GCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGC ATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAG CTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTTCAGAGTG ACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGC GAA
134	secuencia de nucleótidos de cadena ligera de anti-PD1(0314)	véase la Tabla 8
84	cadena de Fc agujero de anti-PD1 (0314) fusionada a hu 4-1BBL dimérico (71-254)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFA QLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKEL VVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSA AGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLHLHSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE GGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAG VYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAL ALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLHLHSAGQRLGVHLHTE ARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE

85	cadena de Fc pomo de anti-PD1 (0314) fusionada a hu 4-1BBL monomérico (71- 254)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQK SLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFA QLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKEL VVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSA AGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
83	cadena ligera de anti-PD1 (0314)	véase la Tabla 21

2.4. Preparación de molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB (71-248) dirigida a PD1 (0314) con dominios CH1-CL cruzados con restos cargados (construcción 7.4)

- 5 Se clonó un polipéptido que contiene dos ectodominios de ligando de 4-1BB (71-248), separados por enlazadores (G4S)₂ y se fusionaron al dominio CL de IgG1 humano, tal como se ilustra en la **figura 8A**: ligando de 4-1BB humano, conector (G4S)₂, ligando de 4-1BB humano, conector (G4S)₂, CL humano. Se clonó un polipéptido que contiene un ectodominio de ligando de 4-1BB (71-248) y fusionado al dominio CH de IgG1 humana, tal como se describe en la **figura 8B**: ligando de 4-1BB humano, conector (G4S)₂, CH1 humano.

Para mejorar el emparejamiento correcto se han introducido las siguientes mutaciones en los CH-CL cruzados. En el ligando de 4-1BB dimérico fusionado a CL humano se introdujeron las mutaciones E123R y Q124K. En el ligando de 4-1BB monomérico fusionado a CH1 humano, se clonaron las mutaciones K147E y K213E en el dominio CH1 humano como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional n.º WO 2015/150447.

Las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera que codifican una molécula de unión específica para PD1, clon 0103-0314, se subclonaron en fase bien con la cadena pesada constante del agujero o con la cadena ligera constante de IgG1 humana.

Las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala se han introducido en la región constante de las cadenas de pomos y agujeros para abrogar la unión a receptores de Fc gamma de acuerdo con el método descrito en el documento WO 2012/130831.

La combinación de la cadena de ligando dimérico-Fc pomo que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión de CH1 monomérico, la cadena dirigida anti-PD1(0314)-cadena de Fc de agujeros que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-PD1(0314) permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando de 4-1BB trimérico y un Fab de unión a FAP ensamblados (**figura 7**, construcción 7.4).

La tabla 11 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB humano (71-248)-PD1 (0314) monovalente que contiene sobrecruzamiento de CH1-CL con restos cargados (construcción 7.4).

Tabla 11: Secuencias de la construcción 7.4 de molécula de fusión de Fc (kih) que contiene ligando de 4-1BB humano (71-248) dirigida a PD1 (0314) monovalente

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
139	secuencia de nucleótidos de 4-1BBL hu dimérico (71-248)-CL* Fc de cadena de pomo	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGT GGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTG GTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGG AACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCT GCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTT CAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG

		TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGACTGGGAGG CGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAAGGACCCG AGCTGTCCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGA GACAGGGAATGTTGCCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTG CTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCA GGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTAC AAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGG GGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAAGTGAAGCGGGT GGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCT GCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGGGGCTGCAG CACTGGCCCTGACTGTGGACCTGCCCCAGCTTCTTCCG AGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCGAAGGACGCCTG CTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCT GCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGA CTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACAC CTGAGATCCCCGCTGGACTGGGCGGAGGCGGTTCGGA GGGGGAGGATCTCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTT ATCTTCCCACCCAGCGACCGGAAGCTGAAGTCTGGCAC AGCCAGCGTCGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCCG CGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGC AGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAGCAGGA CAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGA CCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTAC GCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTG ACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCAGACAAGACCCA CACCTGTCCTCCATGCCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGCGG CCCTAGCGTGTTCTGTTCCTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGACAC CCTGATGATCAGCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGATGTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCA ATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAG ACCAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAG CCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC CCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCC TGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
--	--	--

		CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC TTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC CCTGTCTCCGGGTAAA
140	secuencia de nucleótidos de 4- 1BBL hu monomérico (71- 248)-CH1*	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGT GGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTG GTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCAGTACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGG AACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCT GCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTT CAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGAAGTGGGAGG CGGAGGTTCCGGAGGCGGAGGATCTGCTAGCACAAAGG GCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCAAGAGCA CATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGGAA GATTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAATTCT GGCGCCCTGACAAGCGGCGTGACACCTTCCAGCCGTG CTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTG ACAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CGAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGC
133	secuencia de nucleótidos de cadena Fc agujero de anti- PD1(0314)	véase la Tabla 8

134	secuencia de nucleótidos de cadena ligera de anti-PD1(0314)	véase la Tabla 8
78	hu 4-1BBL dimérico (71-248)-CL* Fc de cadena de pomo	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGSGGGGSREGPELSPDDPA GLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTG GLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSV SLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQG RLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRV TPEIPAGLGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
79	hu 4-1BBL monomérico (71-248) – CH1*	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGSGGGGSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DEKVEPKSC
82	cadena Fc agujero anti-PD1(0314)	véase la Tabla 8
83	cadena ligera de	véase la Tabla 8

	anti-PD1 (0314)	
--	-----------------	--

2.5 Preparación de molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB (71-248) dirigida a PD1 (0314) con dominios CH1-CL cruzados sin restos cargados (construcción 7.5)

- 5 Se clonó un polipéptido que contiene dos ectodominios de ligando de 4-1BB (71-248), separados por enlazadores (G4S)₂ y se fusionaron al dominio CL de IgG1 humano, tal como se ilustra en la **figura 8C**: ligando de 4-1BB humano, conector (G4S)₂, ligando de 4-1BB humano, conector (G4S)₂, CL humano. Se clonó un polipéptido que contiene un ectodominio de ligando de 4-1BB (71-248) y fusionado al dominio CH de IgG1 humana, tal como se describe en la **figura 8D**: ligando de 4-1BB humano, conector (G4S)₂, CH humano.
- 10

Las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera que codifican una molécula de unión específica para PD1, clon 0103-0314, se subclonaron en fase bien con la cadena pesada constante del agujero o con la cadena ligera constante de IgG1 humana.

- Las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala se han introducido en la región constante de las cadenas de pomos y agujeros para abrogar la unión a receptores de Fc gamma de acuerdo con el método descrito en el documento WO 2012/130831.
- 15

- La combinación de la cadena de ligando dimérico-Fc como que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión de CH1 monomérico, la cadena dirigida anti-PD1-cadena de Fc de agujero que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-PD1 permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando de 4-1BB trimérico y un Fab de unión a FAP ensamblados (**figura 7**, construcción 7.5).
- 20

- La tabla 12 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB humano (71-248)-PD1 (0314) monovalente que contiene sobrecruzamiento de CH1-CL sin restos cargados (construcción 7.5).
- 25

Tabla 12: Secuencias de la construcción 7.5 de molécula de fusión de Fc (kih) que contiene ligando de 4-1BB humano (71-248) dirigida a PD1 (0314) monovalente

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
141	secuencia de nucleótidos de 4- 1BBL hu dimérico (71- 248)-CL Fc de cadena de pomo	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGT GGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTG GTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGG AACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCT GCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTGTTGGGTTT CAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGACTGGGAGG CGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAAGGACCCG AGCTGTCCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGA GACAGGGAATGTTGCCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTG CTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCA GGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCTAC AAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGG GGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAAGTGAAGCGGGT GGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCT GCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGGGGCTGCAG CACTGGCCCTGACTGTGGACCTGCCCCCAGCTTCTTCCG AGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCGAAGGACGCCTG CTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCT GCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGA CTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACAC CTGAGATCCCCGCTGGACTGGGCGGAGGCGGTTCGGGA GGGGGAGGATCTCGTACGGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTT ATCTTTCCTCCATCCGATGAACAGCTGAAAAGCGGCACC GCCTCCGTCGTGTGTCTGCTGAACAATTTTACCCTAGG GAAGCTAAAGTGCAGTGGAAGTGGATAACGCACTGCA GTCCGGCAACTCCCAGGAATCTGTGACAGAACAGGACT

		CCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACAC TGTCTAAGGCTGATTATGAGAAACACAAAGTCTACGCCT GCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACA AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGACAAGACCCACAC CTGTCCCCCTTGTCTGCCCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCC TTCTGTGTTCTGTTCCTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCT GATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGG TGGATGTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATT GGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGACC AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTGAGCGTCTCACCCTGCTGCACCAGGACTGGCTGAA TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCC ATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGT GGTGCTGTGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCGGGTAAA
142	secuencia de nucleótidos de 4- 1BBL hu monomérico (71- 248)-CH1	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGT GGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTG GTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGG AACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCT GCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCAGCGAGGCCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTC CAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGACTGGGAGG

		CGGAGGTTCCGGAGGCGGAGGATCTGCTAGCACCAAAG GCCCTTCCGTGTTTCCTCTGGCTCCTAGCTCCAAGTCCAC CTCTGGAGGCACCGCTGCTCTCGGATGCCTCGTGAAGGA TTATTTTCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAATAGCGG AGCACTGACCTCTGGAGTGCATACTTCCCCGCTGTGCT GCAGTCCTCTGGACTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGAC AGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCT GCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC AAGAAGGTGGAACCCAAGTCTTGT
133	secuencia de nucleótidos de cadena Fc agujero de anti- PD1(0314)	véase la Tabla 8
134	secuencia de nucleótidos de cadena ligera de anti-PD1(0314)	véase la Tabla 8
80	hu 4-1BBL dimérico (71- 248)-CL Fc de cadena de pomo	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDDPA GLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTG GLSYKEDTKELVVAAGVYYYVFFQLELRRVVAGEGSGSV SLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQG RLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRV TPEIPAGLGGGGSGGGGSRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD

		IAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
81	hu 4-1BBL monomérico (71- 248) – CH1	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSC
82	cadena Fc agujero anti-PD1(0314)	véase la Tabla 8
83	cadena ligera de anti- PD1(0314)	véase la Tabla 8

2.6 Preparación de molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB (71-248) dirigida a PD1 (0314) bivalente con los ligandos de 4-1BB diméricos y monoméricos fusionados en el extremo C-terminal de cada cadena pesada (construcción 7.6)

5

Se clonó un polipéptido que contiene dos ectodominios de ligando de 4-1BB (71-248), separados por enlazadores (G4S)₂ al extremo C-terminal de la cadena de Fc de agujero de IgG1 humana, tal como se ilustra en la **figura 8E**: Fc de agujero de IgG1 humana, conector (G4S)₂, ligando de 4-1BB humano, conector (G4S)₂, ligando de 4-1BB humano. Un polipéptido que contiene un ectodominio de ligando de 4-1BB (71-248) y fusionado al extremo C-terminal de la cadena Fc poma de IgG1 humana, tal como se describe en la **figura 8F**: Fc poma de IgG1 humana, conector (G4S)₂, ligando de 4-1BB humano.

10

Las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera que codifican una molécula de unión específica para PD1, clon 0103-0314, se subclonaron en fase bien con la cadena pesada constante del agujero, con el poma o con la cadena ligera constante de IgG1 humana.

15

Las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala se han introducido en la región

constante de las cadenas de pomos y agujeros para abrogar la unión a receptores de Fc gamma de acuerdo con el método descrito en el documento WO 2012/130831.

La combinación de la cadena de ligando dimérico de agujero de huIgG1 anti-PD1 que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V, la cadena de ligando monomérico de pomos de huIgG1 anti-PD1 que contiene las mutaciones S354C/T366W y la cadena ligera anti-PD1 permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando de 4-1BB trimérico y dos Fab de unión a PD1 ensamblados (**figura 7**, construcción 7.6).

La tabla 13 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la construcción 7.6 de molécula de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB dirigida a PD1 (0314) bivalente (trímero separado de PD1 con 2 Fab anti-PD1, ligando de 4-1BB dimérico y monomérico fusionado en el extremo C-terminal de cada cadena pesada, respectivamente).

Tabla 13: Secuencias de molécula de fusión de Fc (kih) que contiene ligando de 4-1BB humano (71-248) dirigida a PD1 (0314) bivalente (construcción 7.6)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
143	secuencia de nucleótidos de cadena de Fc agujero de anti-PD1(0314) fusionada a hu 4-1BBL dimérico (71-248)	GAAGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGGGGACTGGTCCA GCCCCGGCGGTTCCCTGAGGCTGTCTTGCGCCGCTTCAGG GTTTCAGCTTTTCCCTCTTACACCATGAGTTGGGTCAGACA GGCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGTCGCCACAATCA GCGGTGGCGGGCGCGACATTTATTACCCAGATTCCGTGA AAGGACGGTTCACCATCTCTAGGGACAACCTCAAAGAAT ACTCTGTATTTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGAT ACAGCAGTTTACTACTGTGTGCTCCTGACCGGCCGCGTC TATTTTGCCCTTGACTCCTGGGGACAAGGCACTCTGGTG ACCGTATCTAGTGCTAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTT CCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCAC AGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA GCCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTC CGGCGTGACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGG CCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAG CAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGA GCCCCAAGAGCTGCGACAAAACCTCACACATGCCCACCGT

		GCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTC CTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGG ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCCTCTCGTGC GCA GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGT GAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGA GGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGACTGCT GGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCAGCTGGTGGCCC AGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACA GCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGC CTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGC CAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGA ACT GCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGT CTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTG GCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTG CCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAA GGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGG AGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCT GGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGTGGGCCTGTTC AGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCAGGCCTGGGAGGCGG CGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAAGGACCCGAGC TGTCCCCCGACGATCCCGCTGGGCTGCTGGATCTGAGAC AGGGCATGTTGCTCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGC TGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGC TGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAA
--	--	--

		GAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGT GTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAAGCTGAGGCGGGTGGT GGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCA TCTGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGGGGCTGCAGCACT GGCCCTGACTGTGGACCTGCCCCCAGCTTCTTCCGAGGC CAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGC ATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCAT ACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCA GGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGA GATCCCAGCCGGGCTC
144	secuencia de nucleótidos de cadena de Fc pomo de anti- PD1(0314) fusionada a hu 4- 1BBL monomérico (71- 248)	GAAGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGGGGACTGGTCCA GCCCCGGCGGTTCCCTGAGGCTGTCTTGCGCCGCTTCAGG GTTTCAGCTTTTCTCTTACACCATGAGTTGGGTCAGACA GGCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGTCGCCACAATCA GCGGTGGCGGGCGCGACATTTATTACCCAGATTCCGTGA AAGGACGGTTCACCATCTCTAGGGACAACCTCAAAGAAT ACTCTGTATTTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGAT ACAGCAGTTTACTACTGTGTGCTCCTGACCGGCCGCGTC TATTTTGCCCTTGACTCCTGGGGACAAGGCACTCTGGTG ACCGTATCTAGTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTC CCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA CCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAG CGGCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGG ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGC CCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCC CAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCT TCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGA CCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCA

		TCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCTGCAGAGATGA GCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAA GGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCC CCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCC AAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAA CGTGTTGAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACA ACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGC GGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGG GCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGACTGCTGG ACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCAGCTGGTGGCCCAG AACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGC GATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTG AGCTACAAAGAGGACACCAAAGAAGTGGTGGTGGCCAA GGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGGC GAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCT GGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGC CGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAG CAGCGAGGCCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCA GGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTG CATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCA GCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTTCAGAGT GACCCCCGAGATTCTGCCGGGCTC
134	secuencia de nucleótidos de cadena ligera de anti-PD1(0314)	véase la Tabla 8
86	cadena de Fc agujero de anti-PD1 (0314) fusionada a hu 4-1BBL dimérico (71-248)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD

		GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFA QLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKEL VVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSA AGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGS GGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDG PLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVF FQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVD LPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARH AWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
87	cadena de Fc pomo de anti-PD1 (0314) fusionada a hu 4-1BBL monomérico (71- 248)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGTLTVTSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFA QLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKEL VVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSA AGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
83	cadena ligera de anti-PD1 (0314)	véase la Tabla 8

2.7 Preparación de moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB (71-248) dirigida a PD1 (0314) monovalentes con los ligandos de 4-1BB diméricos y monoméricos fusionados en el extremo C-terminal de cada cadena pesada (cadena de pomo en anti-PD1, construcciones 7.11 y 7.12)

Se subclonó un polipéptido que contiene dos ectodominios de ligando 4-1BB separados por enlazadores (G4S)₂ en fase con el extremo C-terminal de cadena Fc agujero o pomo de IgG1 humana, como se ilustra en **la figura 9A**: Fc de IgG1 humana, conector (G4S)₂, ligando de 4-1BB humano, conector (G4S)₂, ligando de 4-1BB humano. Se subclonó un polipéptido que contiene un ectodominio de ligando 4-1BB en fase con el extremo C-terminal de la cadena Fc pomo o agujero de IgG1 humana como se describe en **la figura 9B**: Fc de IgG1 humana, conector (G4S)₂, ligando de 4-1BB humano.

Las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera que codifican una molécula de unión específica para PD1, clon 0314, se subclonaron en fase bien con la cadena pesada constante del pomo o con la cadena ligera constante de IgG1 humana.

Las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala se han introducido en la región constante de las cadenas de pomos y agujeros para abrogar la unión a receptores de Fc gamma de acuerdo con el método descrito en el documento WO 2012/130831.

La combinación de la cadena de agujero de IgG1 humana que contenía las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V, la cadena de pomo de IgG1 hu de anti-PD1 que contenía las mutaciones S354C/T366W y la cadena ligera de anti-PD1 permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando 4-1BB trimérico ensamblado y un Fab de unión a PD1 (**figuras 9C y D**, construcciones 7.11 y 7.12).

La tabla 14 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la construcción 7.11 de molécula de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB dirigida a PD1 (0314) monovalente (trímero separado de PD1 con un Fab anti-PD1, ligando 4-1BB dimérico fusionado en el extremo C-terminal de la cadena Fc agujero y ligando 4-1BB monomérico fusionado en el extremo C-terminal de la cadena Fc de pomo).

Tabla 14: Secuencias de molécula de fusión de Fc (kih) que contiene ligando de 4-1BB humano (71-248) dirigida a PD1 (0314) monovalente (construcción 7.11)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
145	secuencia de nucleótidos de cadena Fc agujero de ligando dimérico (71-248)	GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGA AGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAA ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA CAGCACGTACCGTGTTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACC ATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGA ACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATC CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGA AGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAG CCCTGATGATCCTGCCGGAAGTCTGGACCTGCGGCAGGG AATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCAGAACGTGCTGCTGAT CGATGGCCCCCTGTCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGC TGCGGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGG ACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTAC TACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGCAGAGAGTGGTGGCC GGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTG CAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCA CTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCG GAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCT GTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAG AGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGC GCTACAGTGCTGGGCCTGTTTCAGAGTGACCCCCGAGATT

		CCAGCAGGCCTGGGAGGCGGCGGATCTGGCGGCGGAGG ATCTAGAGAAGGACCCGAGCTGTCCCCGACGATCCCG CTGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGCATGTTCTGCTCAGC TGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGA GCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTG ACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAACT GGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTCA GCTGGAAGTGAAGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAG GATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCT CTGCAGCAGGGGCTGCAGCACTGGCCCTGACTGTGGAC CTGCCCCCAGCTTCTTCCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTC GGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACA GCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCC GGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTG GGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCAGCCGGGCTC
144	secuencia de nucleótidos de cadena de Fc pomo de anti- PD1(0314) fusionada a hu 4- 1BBL monomérico (71- 248)	véase la Tabla 13
134	secuencia de nucleótidos de cadena ligera de anti-PD1(0314)	véase la Tabla 8
88	cadena de ligando dimérico (71-248) de Fc agujero	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK GQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPDSIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPE

		LSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGL AGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLD LRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSY KEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGL
87	cadena de Fc pomo de anti-PD1 (0314) fusionada a hu 4-1BBL monomérico (71- 248)	véase la Tabla 13
83	cadena ligera de anti-PD1 (0314)	véase la Tabla 8

La tabla 15 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la construcción 7.12 de molécula de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB dirigida a PD1 (0314) monovalente (trímero separado de PD1 con un Fab anti-PD1, ligando 4-1BB dimérico fusionado en el extremo C-terminal de la cadena Fc pomo y ligando 4-1BB monomérico fusionado en el extremo C-terminal de la cadena Fc de agujero).

Tabla 15: Secuencias de molécula de fusión de Fc (kih) que contiene ligando de 4-1BB humano (71-248) dirigida a PD1 (0314) monovalente (construcción 7.12)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
146	secuencia de nucleótidos de cadena Fc agujero	GACAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGA AGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAA ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT

	de ligando monomérico (71- 248)	CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACC ATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGA ACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATC CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAGAGAGGGGCCCT GAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGACTGCTGGACCTG CGGCAGGGAATGTTTGCCAGCTGGTGGCCCAGAACGT GCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCC TGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTA CAAAGAGGACACCAAGAAGTGGTGGTGGCCAAGGCCG GCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGCAGAGAG TGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCC TGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTG CTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCG AGGCCCGGAATAGCGCATTGTTGGTTTCAAGGCAGGCTG CTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTG CACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGAC ACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTTCAGAGTGACCC CCGAGATTCCTGCCGGGCTC
147	secuencia de nucleótidos de cadena de Fc pomo de anti- PD1(0314) fusionada a hu 4- 1BBL dimérico	GAAGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGGGGACTGGTCCA GCCCCGGCGGTTCCCTGAGGCTGTCTTGCGCCGCTTCAGG GTTTCAGCTTTTCTCTTACACCATGAGTTGGGTCAGACA GGCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGTCGCCACAATCA GCGGTGGCGGGCGCGACATTTATTACCCAGATTCCGTGA AAGGACGGTTCACCATCTCTAGGGACAACCTCAAAGAAT ACTCTGTATTTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGAT

	(71-248)	ACAGCAGTTTACTACTGTGTGCTCCTGACCGGCCGCGTC TATTTTGCCCTTGACTCCTGGGGACAAGGCACTCTGGTG ACCGTATCTAGTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTC CCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA CCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAG CGGCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGG ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGC CCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCC CAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCT TCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGA CCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCA TCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCTGCAGAGATGA GCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAA GGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCACCCCC CCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCC AAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAA CGTGTTCACTGTCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACA ACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGC AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAGCTGGT GGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTG GTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGCGGTGTACTACGTGTTCTTTCACTGG AACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCT GCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCT
--	----------	---

		CCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTGTTGGGTTT CAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCT GGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTG TTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCAGGCCTGGGAGG CGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAAGGACCCG AGCTGTCCCCCGACGATCCCGCTGGGCTGCTGGATCTGA GACAGGGCATGTTTCGCTCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGC TGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAG GGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACA AAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGG GTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAAGTGAAGCGGGTG GTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTG CATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGGGGCTGCAGC ACTGGCCCTGACTGTGGACCTGCCCCCAGCTTCTTCCGA GGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGC TGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTG CATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGAC TCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACC TGAGATCCCAGCCGGGCTC
134	secuencia de nucleótidos de cadena ligera de anti-PD1(0314)	véase la Tabla 8
89	cadena de ligando monomérico (71-248) de Fc agujero	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK GQPREPQVCTLPISRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGREGPELSPDDPAGLL DLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLS YKEDTKELVVAAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLL HLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEI PAGL

90	cadena de Fc pomo de anti-PD1 (0314) fusionada a hu 4-1BBL dimérico (71-248)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVKDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQK SLSLSPGREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQN VLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYV FFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALT V DLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARAR HAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSREGPE LSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGL AGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGL
83	cadena ligera de anti-PD1 (0314)	véase la Tabla 8

2.8 Preparación de moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB (71-248) dirigida a PD1 (0314) monovalentes con los ligandos de 4-1BB diméricos y monoméricos fusionados en el extremo C-terminal de cada cadena pesada (cadena de agujero en anti-PD1, construcciones 7.13 y 7.14)

Se subclonó un polipéptido que contiene dos ectodominios de ligando 4-1BB separados por enlazadores (G4S)₂ en fase con el extremo C-terminal de cadena Fc agujero o pomo de IgG1 humana, como se ilustra en **la figura 9A**: Fc de IgG1 humana, conector (G4S)₂, ligando de 4-1BB humano, conector (G4S)₂, ligando de 4-1BB humano. Se subclonó un polipéptido que contiene un ectodominio de ligando 4-1BB en fase con el extremo C-terminal de la cadena Fc

pomo o agujero de IgG1 humana como se describe en **la figura 9B**: Fc de IgG1 humana, conector (G4S)₂, ligando de 4-1BB humano.

Las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera que codifican una molécula de unión específica para PD1, clon 0314, se subclonaron en fase bien con la cadena pesada constante del agujero o con la cadena ligera constante de IgG1 humana.

Las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala se han introducido en la región constante de las cadenas de pomos y agujeros para abrogar la unión a receptores de Fc gamma de acuerdo con el método descrito en el documento WO 2012/130831.

La combinación de la cadena de agujero de IgG1 humana anti-PD1 que contenía las mutaciones Y349C/T366S/L368A/ Y407V, la cadena de pomo de IgG1 hu que contenía las mutaciones S354C/T366W y la cadena ligera de anti-PD1 permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando 4-1BB trimérico ensamblado y un Fab de unión a PD1 (**figuras 10A y B**, construcciones 7.13 y 7.14).

La tabla 16 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la construcción 7.13 de molécula de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB dirigida a PD1 (0314) monovalente (trímero separado de PD1 con un Fab anti-PD1, ligando 4-1BB dimérico fusionado en el extremo C-terminal de la cadena Fc agujero y ligando 4-1BB monomérico fusionado en el extremo C-terminal de la cadena Fc de pomo).

Tabla 16: Secuencias de molécula de fusión de Fc (kih) que contiene ligando de 4-1BB humano (71-248) dirigida a PD1 (0314) monovalente (construcción 7.13)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
143	secuencia de nucleótidos de cadena Fc agujero de ligando dimérico (71-248) de anti-PD1(0314)	véase la Tabla 13

148	secuencia de nucleótidos de cadena de Fc poma fusionada a hu 4-1BBL monomérico (71-248)	GACAAAACATCACACATGCCCCACCGTGCCCAGCACCTGA AGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAA ACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACC ATCTCCAAAGCCAAAGGGGAGCCCCGAGAACCACAGGT GTACACCCTGCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGA ACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACC CCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAG CCTGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGA CAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAACTGACCGT GGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCT GCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACC CAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGG AAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGA GCCCTGATGATCCTGCCGACTGCTGGACCTGCGGCAGG GAATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGA TCGATGGCCCCCTGTCTGGTACAGCGATCCTGGACTGG CTGGCGTGTCAGTACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAG GACACCAAAGAAGTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTA CTACGTGTTCTTTTCAGCTGGAAGTGCAGGAGAGTGGTGGC CGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCT GCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGC ACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCC GGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACC TGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACA GAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGG CGCTACAGTGCTGGGCTGTTTCAGAGTGACCCCCGAGAT TCCTGCCGGGCTC
134	secuencia de nucleótidos de cadena ligera de	véase la Tabla 8

	anti-PD1(0314)	
86	anti-PD1(0314) cadena de ligando dimérico (71-248) de Fc agujero	véase la Tabla 13
91	cadena de Fc pomo fusionada a hu 4-1BBL monomérico (71- 248)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSRE GPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEA RNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQG ATVLGLFRVTPEIPAGL
83	cadena ligera de anti-PD1 (0314)	véase la Tabla 8

La tabla 17 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la construcción 7.14 de molécula de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB dirigida a PD1 (0314) monovalente (trímero separado de PD1 con un Fab anti-PD1, ligando 4-1BB dimérico fusionado en el extremo C-terminal de la cadena Fc pomo y ligando 4-1BB monomérico fusionado en el extremo C-terminal de la cadena Fc de agujero).

Tabla 17: Secuencias de molécula de fusión de Fc (kih) que contiene ligando de 4-1BB humano (71-248) dirigida a PD1 (0314) monovalente (construcción 7.14)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
149	secuencia de nucleótidos de	GAAGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGGGGACTGGTCCA GCCCCGCGGTTCCCTGAGGCTGTCTTGCGCCGCTTCAGG GTTTCAGCTTTTCCTCTTACACCATGAGTTGGGTCAGACA

	cadena Fc agujero de ligando monomérico (71- 248) de anti- PD1(0314)	GGCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGCGCCACAATCA GCGGTGGCGGGCGCGACATTTATTACCCAGATTCCGTGA AAGGACGGTTCACCATCTCTAGGGACAACCTCAAAGAAT ACTCTGTATTTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGAT ACAGCAGTTTACTACTGTGTGCTCCTGACCGGCCGCGTC TATTTTGCCCTTGACTCCTGGGGACAAGGCACTCTGGTG ACCGTATCTAGTGCTAGCACCAAGGGCCCTCCGTGTTC CCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCAC AGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA GCCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTC CGGCGTGACACCTTCCCCGCGGTGCTGCAGAGTTCTGG CCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAG CAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGA GCCCAAGAGCTGCGACAAAACCTCACACATGCCACCGT GCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTC CTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGG ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCA GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGT GAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGA GGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGACTGCT GGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCAGCTGGTGGCCC AGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACA GCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGC
--	---	---

		CTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGC CAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTTCAGCTGGA ACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGT CTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTG GCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTG CCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAA GGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGG AGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCT GGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTC AGAGTGACCCCCGAGATTCCTGCCGGGCTC
150	secuencia de nucleótidos de cadena de Fc pomo fusionada a hu 4-1BBL dimérico (71-248)	GACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGA AGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAA AACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACC ATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTACACCCTGCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGA ACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACC CCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAG CCTGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGA CAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAACTGACCGT GGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCT GCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACC CAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGG AAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGA GCCCTGATGATCCTGCCGGACTGCTGGACCTGCGGCAGG GAATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGA TCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGG CTGGCGTGTCCTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAG GACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTA CTACGTGTTCTTTTCAGCTGGAACCTGCGGAGAGTGGTGGC CGCGGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCT

		GCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGC ACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCC GGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACC TGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACA GAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGG CGCTACAGTGCTGGGCCTGTTTCAGAGTGACCCCCGAGAT TCCAGCAGGCCTGGGAGGCGGCGGATCTGGCGGCGGAG GATCTAGAGAAGGACCCGAGCTGTCCCCGACGATCCC GCTGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGCATGTTGCTCAG CTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTG AGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCT GACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAAC TGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTC AGCTGGAAGTGAAGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCA GGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGC TCTGCAGCAGGGGCTGCAGCACTGGCCCTGACTGTGGA CCTGCCCCCAGCTTCTTCCGAGGCCAGAAACAGCGCCTT CGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGAC AGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCC CGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTG GGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCAGCCGGGCTC
134	secuencia de nucleótidos de cadena ligera de anti-PD1(0314)	véase la Tabla 8
92	anti-PD1(0314) cadena de ligando monomérico (71-248) de Fc agujero	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVKDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS

		DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFA QLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKEL VVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSA AGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
93	cadena Fc pomo fusionada a 4- 1BBL hu dimérico (71-248)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSRE GPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEA RNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQG ATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGL DLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGL SYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSL ALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLL HLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPE IPAGL
83	cadena ligera de anti-PD1 (0314)	véase la Tabla 8

2.9 Preparación de moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc que contienen trímero de ligando de 4-1BB humano no dirigidas (moléculas de control)

Las moléculas de control se prepararon como se ha descrito anteriormente para las moléculas
5 de unión a antígeno dirigidas a PD1, con la única diferencia de que la molécula de unión anti-PD1 (VH y VL) se reemplazó por un control de línea germinal, denominado DP47, que no se une al antígeno.

El control B es una molécula de unión a antígeno de Fc (kih) de ligando 4-1BB (71-254) humano trimérico monovalente no dirigida (**figura 11A**) que contenía un sobrecruzamiento

CH-CL con restos cargados. Corresponde con la construcción 7.1, aunque las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera de la molécula de unión a PD1 se reemplazaron con las del control de línea germinal (DP47) y se subclonaron en fase bien con la cadena pesada constante del agujero o la cadena ligera constante de IgG1 humana.

- 5 Se preparó un control C de variante bivalente (**figura 11B**) en analogía con las construcciones bivalentes 7.3 y 7.6 y se preparó un control D de variante monovalente (**figura 11C**) en analogía con la construcción 7.3 (que contiene un trímero de ligando 4-1BB (71-248)), con la única diferencia de que la molécula de unión anti-PD1 (VH y VL) se reemplazó por un control de línea germinal, denominado DP47, que no se une al antígeno.
- 10 La tabla 18 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB (71-254) no dirigido a DP47 con sobrecruzamiento CH1-CL y restos cargados en los brazos que contienen ligando de 4-1BB (control B).

Tabla 18: Secuencias de molécula de unión a antígeno de fusión Fc(kih) que contiene trímero 4-1BB (71-254) no dirigido a DP-47 (trímero 4-1BBL separado de DP47), control B

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
131	secuencia de nucleótidos de 4-1BBL hu dimérico (71-254)-CL* Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 8
132	secuencia de nucleótidos de 4-1BBL hu (71-254) monomérico—CH1*	véase la Tabla 8
151	secuencia de	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACA

	nucleótidos de cadena de Fc agujero de DP47	GCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGG ATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCA GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTA GTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGA AGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC ACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA CACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGCAGCGGATTTGA CTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGC TAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTC CTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGA AGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAA ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACC ATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGA ACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATC CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTTCCCTCGTGAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA
152	secuencia de nucleótidos de	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTG TCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGGCCAGT CAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAG

	cadena ligera de DP47	AAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCA TCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGG CAGTGGATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAG ACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCA GTATGGTAGCTCACCGCTGACGTTTCGGCCAGGGGACCA AAGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCT TCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAG AGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCC AATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGAC AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
74	hu 4-1BBL dimérico (71- 254)-CL* Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 8
75	hu 4-1BBL monomérico (71- 254) – CH1*	véase la Tabla 8
153	cadena Fc agujero de DP47	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGS GFDYWGQGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
154	cadena ligera de DP47	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF

		AVYYCQQYGSSPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNFPYAPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
--	--	---

La tabla 19 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de control C de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) separado no dirigido de DP47 bivalente.

5 **Tabla 19: Secuencias de la molécula de fusión de Fc (kih) que contiene ligando de 4-1BB humano (71-254) no dirigida de DP47 bivalente, control C**

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
155	secuencia de nucleótidos de cadena de Fc agujero de DP47 fusionada a hu 4-1BBL dimérico (71-254)	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACA GCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGG ATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCA GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTA GTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGA AGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC ACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA CACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGCAGCGGATTTGA CTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGC TAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAG CAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGT CCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGACACAC TTCCCCGCGGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTG AGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAA CACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCG ACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAA GCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAA CCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC

		ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT CTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG TGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAA CCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC CGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATG CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAA GCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGC CCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGC ATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATC GATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCT GCGGTGTCAC TGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGA CACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACT ACGTGTTCTTTTCAGCTGGAAGTGCAGAGAGTGGTGGCCG GCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGC AGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCAC TGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGA ATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGT CTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAG GCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGC TACAGTGCTGGGCCTGTTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCC AGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAGGCGGAGGCG GATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAGGGACCCGAACTG TCCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAG GGAATGTTCCGCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTG ATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTG GCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGA AGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGT ACTATGTGTTTTTTTCAGCTGGAAGTGAAGCGGGTGGTGG CTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATC TGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTGG
--	--	---

		CTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGCCTCTAGCGAGGCCA GAAACAGCGCCTTCGGGTCCAAGGACGCCTGCTGCATC TGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACT GAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGG GGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGAT CCCTGCCGGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAA
156	secuencia de nucleótidos de cadena de Fc pomo de DP47 fusionada a hu 4- 1BBL monomérico (71- 254)	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACA GCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGG ATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCA GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTA GTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGA AGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC ACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA CACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGCAGCGGATTTGA CTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGC TAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTC CTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACC TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGA AGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCCTTCTT ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACC ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTACACCCTGCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGA ACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACC CCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAG CCTGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGA

		CAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAACTGACCGT GGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCT GCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACC CAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGG AAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGA GCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGG GCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGA TCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGG CTGGCGTGTCCTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAG GACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTA CTACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGCAGGAGAGTGGTGGC CGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCT GCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGC ACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCG GAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCT GTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAG AGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGC GCTACAGTGCTGGGCCTGTTTCAGAGTGACCCCCGAGATT CCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA
152	secuencia de nucleótidos de cadena ligera de DP47	véase la Tabla 18
157	cadena de Fc agujero de DP47 fusionada a hu 4-1BBL dimérico (71-254)	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGS GFDYWGQGLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVA QNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAK

		AGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLH TEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGG GSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLI DGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYY VFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALT VDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARA RHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
158	cadena de Fc pomo de DP47 fusionada a hu 4- 1BBL monomérico (71- 254)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGS GFDYWGQGT LVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVA QNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLH TEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
154	cadena ligera de DP47	véase la Tabla 18

La tabla 20 muestra, respectivamente, las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) separado no dirigido de DP47 monovalente que contenía CH-CL cruzados con restos cargados, control D.

- 5 **Tabla 20: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico (71-248) separado no dirigido de DP47 monovalente con cruce CH-CL y con restos cargados (control D). * restos cargados**

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
139	secuencia de nucleótidos de 4-1BBL hu dimérico (71-248)-CL* Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 11
140	secuencia de nucleótidos de 4-1BBL hu monomérico (71-248)-CH1*	véase la Tabla 11
151	secuencia de nucleótidos cadena de Fc agujero de DP47	véase la Tabla 18
152	secuencia de nucleótidos de cadena ligera de DP47	véase la Tabla 18
78	hu 4-1BBL dimérico (71-254)-CL* Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 11
79	hu 4-1BBL monomérico (71-254) – CH1*	véase la Tabla 11
153	cadena Fc agujero de DP47	véase la Tabla 18
154	cadena ligera de DP47	véase la Tabla 18

2.10 Preparación de moléculas de unión a antígeno de IgG1 humanas como controles

Una molécula de control adicional (control F) usada en los ensayos fue una IgG1 humana de control de línea germinal de DP47 no dirigida, que contenía las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala, para abrogar la unión a receptores de Fc gamma de acuerdo con el método descrito en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional n.º WO 2012/130831.

La tabla 21 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la huIgG1 PGLALA de DP47 no dirigida (control F).

10 **Tabla 21: Secuencias de huIgG1 de DP47 no dirigida (control F)**

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
159	secuencia de nucleótidos de	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACA GCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGG ATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCA

	cadena pesada de DP47 (hu IgG1 PGLALA)	GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTA GTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGA AGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC ACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA CACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGCAGCGGATTTGA CTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGC TAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTC CTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGA AGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAA ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACC ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGA ACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
152	secuencia de nucleótidos de cadena ligera de	véase la Tabla 18

	DP47	
160	cadena pesada de DP47 (hu IgG1 PGLALA)	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGS GFDYWGQGLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLS PGK
154	cadena ligera de DP47	véase la Tabla 18

La tabla 22 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la huIgG1 PGLALA anti-PD1 (clon 0314), es decir, control M.

Tabla 22: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de huIgG1 PGLALA anti-PD1 (0314)
(control M)

5

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
161	secuencia de nucleótidos de cadena pesada de PD1(0314) (huIgG1 PGLALA)	GAAGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGGGGAC TGGTCCAGCCCGGCGGTTCCCTGAGGCTGTCT TGCGCCGCTTCAGGGTTCAGCTTTTCCTCTTAC ACCATGAGTTGGGTCAGACAGGCACCTGGCAA GGGACTGGAGTGGGTCGCCACAATCAGCGGTG GCGGGCGCGACATTTATTACCCAGATTCCGTG AAAGGACGGTTCACCATCTCTAGGGACAACCTC AAAGAATACTCTGTATTTGCAGATGAACAGCC TGAGAGCTGAGGATACAGCAGTTTACTACTGT GTGCTCCTGACCGGCCGCGTCTATTTTGCCCTT

		GACTCCTGGGGACAAGGCACTCTGGTGACCGT ATCTAGTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCT TCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCT GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA GGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTTCGT GGAAGTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTC CAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACA AACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCT GAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTT CCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT CGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAG CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA CACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCA AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGG CTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGA CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC GGGTAAA
134	secuencia de nucleótidos de cadena ligera de anti-PD1(0314)	véase la Tabla 8

162	cadena pesada de PD1(0314) (huIgG1 PGLALA)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTM SWVRQAPGKGLEWVATISGGGRDIYYPDSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVLLT GRVYFALDSWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
83	cadena ligera de anti-PD1 (0314)	véase la Tabla 8

Ejemplo 3

Producción y purificación de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc de ligando 4-1BB trimérico dividido dirigidas anti-PD1 monovalentes y bivalentes y de moléculas de control

5

Las secuencias que codifican la molécula de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico separado dirigida y no dirigida se clonaron en un vector plasmídico, que dirige la expresión de la inserción a partir de un promotor de MPSV y contiene una secuencia de poliA sintética situada en el extremo 3' del CDS. Además, el vector contiene una secuencia OriP de EBV para el mantenimiento episómico del plásmido.

10

Las moléculas de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico separado se produjeron cotransfectando células HEK293-EBNA con los vectores de expresión en mamíferos usando polietilenimina. Las células se transfectaron con los correspondientes vectores de expresión. Para las construcciones 7.1, 7.2, 7.4, 7.6 y las correspondientes moléculas de control, control B y D, a una proporción de 1:1:1:1 (“vector de cadena de Fc agujero”: “vector de cadena ligera de PD1”: “vector de cadena Fc pomo”: “vector de cadena ligera de 4-1BBL”). Para las construcciones 7.3, 7.6, 7.11, 7.12, 7.13, 7.14 y el control C, a una proporción de 1:1:1

15

(“vector de cadena Fc agujero”: “vector de cadena Fc pomo”: “vector de cadena ligera de anti-PD1”). Las IgG humanas, usadas como control en el ensayo, se produjeron como para las construcciones biespecíficas (para la transfección solo se usaron un vector para la cadena ligera y un vector para la cadena pesada a una proporción de 1:1).

- 5 Para la producción en matraces agitados de 500 ml, se sembraron 300 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección. Para la transfección, las células se centrifugaron durante 10 minutos a 210 x g y el sobrenadante se reemplazó por 20 ml de medio CD CHO precalentado. Los vectores de expresión (200 µg de ADN total) se mezclaron en 20 ml de medio CD CHO. Después de la adición de 540 µl de PEI, la solución se agitó
- 10 vorticialmente durante 15 segundos y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después, las células se mezclaron con la solución de ADN/PEI, se transfirieron a un matraz agitado de 500 ml y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en un incubador con una atmósfera de CO₂ al 5 %. Después de la incubación, se añadieron a las células 160 ml de medio Excell suplementado con L-glutamina 6 mM, PEP SOY 5 g/l y ácido valproico 1,2 mM y se
- 15 cultivaron las células durante 24 horas. Un día después de la transfección se añadieron alimentación 7 al 12 % y glucosa (concentración final de 3 g/l). Después de cultivar durante 7 días, se recogió el sobrenadante mediante centrifugación durante 30-40 minutos a al menos 400 x g. La solución se esterilizó por filtración (filtro de 0,22 µm), se suplementó con azida de sodio hasta una concentración final del 0,01 % (p/v) y se mantuvo a 4 °C.
- 20 Las proteínas secretadas se purificaron a partir de los sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad usando proteína A, seguido de cromatografía de exclusión por tamaño. Para la cromatografía de afinidad, se cargó el sobrenadante en una columna MabSelect Sure (VC = 5-15 ml, resina de GE Healthcare) equilibrada con fosfato de sodio (20 mM), tampón de citrato de sodio (20 mM) (pH 7,5). La proteína no unida se eliminó mediante
- 25 lavado con al menos 6 volúmenes de columna del mismo tampón. La proteína unida se eluyó usando bien un gradiente lineal (20 VC) o una elución por etapas (8 VC) con citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, tampón de glicina 100 mM (pH 2,5). Para el gradiente lineal se añadió una etapa adicional de elución de 4 volúmenes de columna.

- El pH de las fracciones recogidas se ajustó añadiendo 1/10 (v/v) de fosfato de sodio 0,5 M,
- 30 pH8.0. La proteína se concentró antes de cargarla en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, cloruro de sodio 140 mM, solución de Tween20 al 0,01 % (v/v) de pH 6,0.

- La concentración proteica se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando un coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos. La pureza y peso molecular de la fusión de Fc(kih) de ligando de 4-1BB trimérico dirigida se analizó mediante SDS-PAGE en presencia y ausencia de un agente reductor (1,4-ditiotreitol 5 mM) y tinción con SimpleBlue™ SafeStain de Coomassie (Invitrogen, EE.UU.) o CE-SDS usando un dispositivo Caliper LabChip GXII (Perkin Elmer). El contenido agregado de las muestras se analizó usando una columna analítica de exclusión por tamaño TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) equilibrada con K₂HPO₄ 25 mM, NaCl 125 mM, monoclóhidrato de L-arginina 200 mM, NaN₃ al 0,02 % (p/v), pH 6,7, tampón de ejecución a 25 °C.
- 10 La tabla 23 resume el rendimiento y contenido final de monómero de las moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) que contienen trímero de ligando de 4-1BB dirigidas a FAP (4B9) y moléculas de control.

Tabla 23 Análisis bioquímico de las moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) que contienen trímero de ligando de 4-1BB dirigidas a PD1 y moléculas de control

Construcción	Monómero [%] (SEC)	Rendimiento [mg/l]
Construcción 7.1	97,2	110,2
Construcción 7.3	96,6	8,9
Construcción 7.5	85	5,1
Construcción 7.6	100	16,5
Control B	99	15,4
Control C	98	12,6
Control D	99,5	25,9
Control M	99	34,4
Control F	100	50

Ejemplo 4

Unión simultánea de moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc de ligando trimérico dividido 4-1BB dirigidas a PD1 mediante resonancia de plasmón superficial

4.1 Preparación, purificación y caracterización de los antígenos para la resonancia de plasmón superficial

Preparación de la molécula de fusión 4-1BB Fc (kih)

Se subclonó una secuencia de ADN que codifica el ectodominio de 4-1BB humano (aminoácidos 24 a 186 de 4-1BB humano acorde con Q07011, SEQ ID NO: 163) en fase con los dominios CH2 y CH3 de cadena pesada de IgG1 humana en el pomo. Se introdujo un sitio de escisión de proteasa AcTEV entre un ectodominio del antígeno y la Fc de IgG1 humana. Se introdujo un marcador Avi para la biotinilación dirigida en el extremo C-terminal del antígeno-Fc de pomo. La combinación del antígeno-cadena de Fc de pomo que incluye las mutaciones S354C/T366W, con una cadena Fc de agujero que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V permite la generación de un heterodímero que incluye una sola copia de la cadena que contiene el ectodominio de 4-1BB, creando de este modo una forma monomérica de antígeno ligado a Fc. La tabla 24 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la construcción de fusión de antígeno-Fc.

Tabla 24: Secuencias de ADNc y aminoácidos de moléculas de fusión de Fc (kih) de antígeno monomérico

SEQ ID NO:	Antígeno	Secuencia
164	Secuencia de nucleótidos de cadena de agujero de Fc	GACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGA ACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAA ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACC ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT

		GTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGA ACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATC CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
165	Secuencia de nucleótidos de cadena de Fc pomo de antígeno 4-1BB humano	CTGCAGGACCCCTGCAGCAACTGCCCTGCCGGCACCTTC TGCGACAACAACCGGAACCAGATCTGCAGCCCCTGCCC CCCCAACAGCTTCAGCTCTGCCGGCGGACAGCGGACCT GCGACATCTGCAGACAGTGCAAGGGCGTGTTCAGAACC CGGAAAGAGTGCAGCAGCACCAGCAACGCCGAGTGCGA CTGCACCCCCGGCTTCCATTGTCTGGGAGCCGGCTGCAG CATGTGCGAGCAGGACTGCAAGCAGGGCCAGGAACTGA CCAAGAAGGGCTGCAAGGACTGCTGCTTCGGCACCTTC AACGACCAGAAGCGGGGCATCTGCCGGCCCTGGACCAA CTGTAGCCTGGACGGCAAGAGCGTGCTGGTCAACGGCA CCAAAGAACGGGACGTCGTGTGCGGCCCCAGCCCTGCT GATCTGTCTCCTGGGGCCAGCAGCGTGACCCCTCCTGCC CCTGCCAGAGAGCCTGGCCACTCTCCTCAGGTGACGAA CAGTTATATTTTCAGGGCGGCTCACCCAAATCTGCAGAC AAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTC CTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCC AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACA TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATA ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCT CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC ACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA GGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC

		AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATCCGGAGGCCTGA ACGACATCTTCGAGGCCCAGAAGATTGAATGGCACGAG
166	cadena de agujero de Fc	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
167	cadena Fc pomo de antígeno 4- 1BB humano	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDI CRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQ DCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDG KSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHS PQVDEQLYFQGGSPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQV SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE

Todas las secuencias que codifican la molécula de fusión de 4-1BB-Fc se clonaron en un vector plasmídico, que dirige la expresión de la inserción a partir de un promotor de MPSV y contiene una secuencia de señal de poliA sintética situada en el extremo 3' del CDS. Además,

5 el vector contiene una secuencia OriP de EBV para el mantenimiento episómico del plásmido.

Para la preparación de la molécula de fusión de antígeno monomérico/Fc biotiniladas, se transfectaron de manera conjunta células HEK293 EBNA en suspensión que crecían de manera exponencial con tres vectores que codificaban los dos componentes de la proteína de fusión (cadenas de pomo y agujero) así como BirA, una enzima necesaria para la reacción de

10 biotinilación. Los vectores correspondientes se usaron a una relación de 2: 1: 0,05 (“ECD de antígeno-AcTEV-Fc pomo”: “Fc agujero”: “BirA”).

Para la producción de proteína, en matraces agitados de 500 ml, se sembraron 400 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección. Para la transfección, las células se centrifugaron durante 5 minutos a 210 g y el sobrenadante se reemplazó por medio CD CHO

precalentado. Los vectores de expresión se resuspendieron en 20 ml de medio CD CHO que contenía 200 µg de ADN de vector. Después de la adición de 540 µl de polietilenimina (PEI), la solución se agitó vorticialmente durante 15 segundos y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después, las células se mezclaron con la solución de ADN/PEI, se transfirieron a un matraz agitado de 500 ml y se incubaron durante 3 horas a 37°C en un incubador con una atmósfera de CO₂ al 5 %. Después de la incubación, se añadieron 160 ml de medio F17 y se cultivaron las células durante 24 horas. Un día después de la transfección, se añadieron ácido valproico 1 mM y alimentación 1 al 7 % con suplementos al cultivo. Después de 7 días de cultivo, el sobrenadante celular se recogió mediante eliminación por centrifugación de las células durante 15 min a 210 g. La solución se esterilizó por filtración (filtro de 0,22 µm), se suplementó con azida de sodio hasta una concentración final del 0,01 % (p/v) y se mantuvo a 4°C.

Las proteínas secretadas se purificaron a partir de los sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad usando proteína A, seguido de cromatografía de exclusión por tamaño. Para la cromatografía de afinidad, se cargó el sobrenadante en una columna HiTrap ProteinA HP (VC = 5 ml, GE Healthcare) equilibrada con 40 ml de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 7,5. La proteína no unida se eliminó mediante lavado con al menos 10 volúmenes de columna de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, tampón que contiene cloruro de sodio 0,5 M (pH 7,5). La proteína unida se eluyó usando un gradiente de pH lineal de cloruro de sodio (de 0 a 500 mM) creado en 20 volúmenes de columna de citrato de sodio 20 mM, Tween 20 al 0,01 % (v/v), pH 3,0. Entonces se lavó la columna con 10 volúmenes de columna de citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 500 mM, Tween 20 al 0,01 % (v/v), pH 3,0.

Se ajustó el pH de las fracciones recogidas añadiendo 1/40 (v/v) de Tris 2M, pH8.0. La proteína se concentró y filtró antes de cargarla en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con MOPS 2 mM, cloruro de sodio 150 mM, solución de azida de sodio al 0,02 % (p/v) de pH 7,4.

Para la determinación de la afinidad por el receptor humano, también se subclonó el ectodominio de 4-1BB humano en fase con un marcador avi (GLNDIFEAQKIEWHE, SEQ ID NO: 168) y uno de hexahistidina.

La producción de proteína se llevó a cabo tal como se describió anteriormente para la proteína de fusión de Fc. Las proteínas secretadas se purificaron a partir de los sobrenadantes de

cultivo celular mediante cromatografía quelante, seguido de cromatografía de exclusión por tamaño. La primera etapa cromatográfica se llevó a cabo en un cartucho NiNTA Superflow (5 ml, Qiagen) se equilibraron en fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 500 mM, pH 7.4. La elución se llevó a cabo aplicando un gradiente sobre 12 volúmenes de columna del 5 % al 45 % de tampón de elución (fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 500 mM, imidazol 500 mM, pH 7,4). La proteína se concentró y filtró antes de cargarla en una columna HiLoad Superdex 75 (GE Healthcare) equilibrada con MOPS 2 mM, cloruro de sodio 150 mM, solución de azida de sodio al 0,02 % (p/v) de pH 7,4 (tabla 25).

Tabla 25: Secuencias de la molécula 4-1BB humano monomérico-His

SEQ ID NO:	Antígeno	Secuencia
169	secuencia de nucleótidos de 4-1BB His humano	CTGCAGGACCCCTGCAGCAACTGCCCTGCCGGCACCTTCTG CGACAACAACCGGAACCAGATCTGCAGCCCCTGCCCCCCC AACAGCTTCAGCTCTGCCGGCGGACAGCGGACCTGCGACA TCTGCAGACAGTGCAAGGGCGTGTTTCTGAGAACCCGGAAAGA GTGCAGCAGCACCAGCAACGCCGAGTGCGACTGCACCCCC GGCTTCCATTGTCTGGGAGCCGGCTGCAGCATGTGCGAGC AGGACTGCAAGCAGGGCCAGGAAGTACCAAGAAGGGCT GCAAGGACTGCTGCTTCGGCACCTTCAACGACCAGAAGCG GGGCATCTGCCGGCCCTGGACCAACTGTAGCCTGGACGGC AAGAGCGTGCTGGTCAACGGCACCAAAGAACGGGACGTCTG TGTGCGGCCCCAGCCCTGCTGATCTGTCTCCTGGGGCCAGC AGCGTGACCCCTCCTGCCCTGCCAGAGAGCCTGGCCACTC TCCTCAGGTCGACGAACAGTTATATTTTCAGGGCGGCTCAG GCCTGAACGACATCTTCGAGGGCCCAGAAGATCGAGTGGCA CGAGGCTCGAGCTCACCACCATCACCATCAC
170	4-1BB His humano	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICR QCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCK QGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLV NGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQVDEQL YFQGGSGLNDIFEAQKIEWHEARAHHHHHH

10

El antígeno de fusión Fc de PD1 humano se adquirió de R&D Systems (n.º de cat. 1086-PD-050).

4.2 Determinación de la unión simultánea de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc de ligando trimérico dividido 4-1BB C-terminal dirigidas mediante resonancia de plasmón superficial

La capacidad de unión simultánea a 4-1BB Fc (kih) humano y a PD1 humano se evaluó mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). Todos los experimentos de SPR se llevaron a cabo en un dispositivo Biacore T200 a 25 °C con HBS-EP como tampón de ejecución (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005%, Biacore, Friburgo/Alemania).

Se acopló 4-1BB Fc (kih) humano biotinilado directamente a una celda de flujo de una microplaca sensora de estreptavidina (SA). Se usaron niveles de inmovilización de hasta 200 unidades de resonancia (UR). Las moléculas de fusión de Fc (kih) ligando 4-1BB C-terminal se hicieron pasar a un intervalo de concentración de 200 nM con un caudal de 30 µl/minuto a través de las celdas de flujo durante 90 segundos y la disociación se ajustó a cero segundos. Se inyectó PD1-Fc humano (R&D systems) como segundo analito a un caudal de 30 µl/minuto a través de las celdas de flujo durante 90 segundos a una concentración de 500 nM (**figura 12A**). La disociación se controló durante 120 s. Se corrigieron las diferencias del índice refractivo en bruto restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia, en los casos donde no se inmovilizó proteína. Todas las construcciones biespecíficas pudieron unirse simultáneamente a 4-1BB humano y a PD1 humano (**figuras 12B, 12C, 12D y 12E**).

20

Ejemplo 5

Caracterización funcional de las moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc que contienen trímero de ligando de 4-1BB dirigidas a PD1

5.1. Unión sobre PBMC humanas frescas y activadas de las moléculas de unión a antígeno de fusión Fc (kih) que contienen trímero de ligando 4-1BB dirigidas a

25

PD1

Se obtuvieron capas leucocitarias del centro de donación de sangre de Zürich. Para aislar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) frescas se diluyó la capa leucocitaria con el mismo volumen de DPBS (Gibco, de Life Technologies, n.º de cat. 14190 326). Los tubos de centrifugación de polipropileno de 50 ml (TTP, n.º de cat. 91050) fueron suministrados con 15 ml de Histopaque 1077 (SIGMA Life Science, n.º de cat. 10771, polisacarosa y diatrizoato de sodio, ajustado a una densidad de 1,077 g/ml) y los contenidos

de la capa leucocitaria diluida se dispusieron en capas sobre el Histopaque 1077. Los tubos se centrifugaron durante 30 min a 450 x g. Después, las PBMC se recogieron de la interfaz, se lavaron tres veces con DPBS y se resuspendieron en medio de células T que consistía en medio RPMI 1640 (Gibco de Life Technology, n.º de cat. 42401-042) suministrado con suero fetal bovino al 10 % (v/v) (FBS, originario de los Estados Unidos, PAN biotech, P30-2009, Lote P150307GI, irradiado con gamma, libre de micoplasma, inactivado por calor durante 35 min a 56 °C), GlutaMAX-I al 1 % (v/v) (GIBCO de Life Technologies, n.º de cat. 35050 038), piruvato de sodio 1 mM (SIGMA, n.º de cat. S8636), aminoácidos no esenciales MEM al 1 % (v/v) (SIGMA, n.º de cat. M7145) y β -mercaptoetanol 50 μ M (SIGMA, M3148).

- 10 Las PBMC se usaron directamente después de aislarlas (unión sobre PBMC frescas) o se estimularon para inducir la expresión de 4-1BB sobre la superficie celular de las células T (unión sobre PBMC humanas activadas). Para inducir la regulación positiva de 4-1BB en células T humanas, se cultivaron las PBMC durante 3 días en RPMI 1640 (GIBCO de Life Technologies, n.º de cat. 42401-042) suministrado con suero bovino fetal al 10% (FBS, 15 originario de los Estados Unidos, PAN biotech, P30-2009, Lote P150307GI, irradiado con gamma, libre de micoplasma, inactivado por calor durante 35 min a 56 °C), GlutaMAX-I al 1% (GIBCO de Life Technologies, n.º de cat. 35050-038), 200 U/ml de Proleukin (Novartis Pharma Schweiz AG, CHCLB-P-476-700-10340, Lote AA4493BAL) y 2 ug/ml de PHA-L (SIGMA, n.º de cat. L2769) a una concentración de 1×10^6 células/ml. Después de tres días, se 20 recogieron las PBMC humanas preactivadas, se resuspendieron en RPMI 1640 suministrado con FBS al 10 %, piruvato de sodio 1 mM (SIGMA, n.º de cat. S8636), Gluta-MAX-I al 1%, solución MEM de aminoácidos no esenciales al 1% (SIGMA, n.º de cat. M7145) y beta-mercaptoetanol 50 μ M (Sigma M3148) a una concentración final de 1×10^6 células/ml. Posteriormente, las células se sembraron en placas de cultivo tisular de 6 pocillos (TTP, n.º de 25 cat. 92006) que se habían recubierto durante una noche a 4°C con 10 ug/ml anti-CD3 humano (clon OKT3, IgG2a de ratón, BioLegend, n.º de cat. 317315) y 2 μ g/ml de anti-CD28 humano (clon CD28.2, IgG1 de ratón, BioLegend, n.º de cat. 302923). Las células se incubaron adicionalmente durante 2 días a 37°C y CO₂ al 5%.

- 30 Para el ensayo de unión, se añadieron $0,1 \times 10^6$ PBMC frescas o activadas a cada pocillo de una placa de 96 pocillo para suspensión de fondo redondo (Greiner Bio-One, cellstar, n.º de cat. 650185). Las placas se centrifugaron 5 minutos a 350 x g y a 4 °C y se desechó el sobrenadante. Posteriormente, las células se tiñeron en 100 μ l/pocillo de DPBS que contenía colorante de viabilidad fijable eF660 diluido a 1:5000 (eBioscience, n.º de cat. 65-0864-18)

durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad. Las células se lavaron una vez con 200 µl de tampón DPBS enfriado en hielo. A continuación, Se añadieron 50 µl/pocillo de tampón FACS frío a 4 °C (DPBS suministrado con FBS al 2 %, EDTA 5 mM, pH 8 (Amresco, n.º de cat. E177) y azida sódica 7,5 mM (Sigma-Aldrich, n.º de cat. S2002)) que contenía

5 concentraciones tituladas de la construcción 7.1, la construcción 7.3, la construcción 7.5 y la construcción 7.6 y como controles, se añadieron el control B, el control C, el control D, el control M y el control F y las células se incubaron durante 60 minutos a 4 °C, se lavaron tres veces con 200 µl/pocillo de tampón FACS al 4 °C. Las células se resuspendieron adicionalmente en 50 µl/pocillo de tampón FACS frío a 4 °C que contenía 0,67 µg/ml de anti-

10 CD45 humano-AF488 (clon HI30, IgG1k de ratón, BioLegend, n.º de cat. 304019), 0,33 µg/ml de anti-CD8a humano-BV510 (clon SK1, IgG1 k de ratón, BioLegend, n.º de cat. 344732), 0,23 µg/ml de anti-CD4 humano-BV421 (clon OKT4, IgG2bk de ratón, BioLegend, n.º -de cat. 317434), 0,67 µg/ml de anti-CD3 humano-PerCP-Cy5.5 (clon UCHT1, IgG1 k de ratón, BioLegend, n.º de cat. 300430), 0,67 µg/ml de anti-CD19 humano-PE/Cy7 (clon HIB19,

15 IgG1 k de ratón, BioLegend, n.º de cat. 302216), 5 µg/ml de fragmento F(ab')₂ de cabra específico de fragmento F(ab')₂ de IgG anti-humano AffiniPure conjugado a PE (Jackson ImmunoResearch, n.º de cat. 109 116 098) y se incubaron durante 30 min a 4°C. Las células se lavaron dos veces con 200 µl/pocillo de tampón FACS a 4 °C y después se fijaron con DPBS suministrado con formaldehído al 1 % (Sigma, HT501320-9.5L). Las células se

20 resuspendieron en 100 µl/pocillo de tampón FACS y se adquirieron usando un analizador MACS Quant 10 (Miltenyi Biotech). Los datos se analizaron usando FlowJo V10 (FlowJo, LLC) y GraphPad Prism 6.04 (GraphPad Software, Inc)

Se ajustaron ventanas lógicas para células T CD45⁺ CD3⁺ CD19^{neg} CD8^{neg} CD4⁺ vivas, células T CD45⁺ CD3⁺ CD19 neg CD4^{neg} CD8⁺, células T CD45⁺ CD3⁺ CD4^{neg} CD8^{neg} γδ y

25 células B CD45⁺ CD3^{neg} CD19⁺ y se representaron las medias geométricas de la intensidad de fluorescencia del fragmento F(ab')₂ de cabra específico de fragmento Fcγ de IgG anti-IgG humana AffiniPure conjugado a PE frente a la concentración titulada de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc de ligando trimérico dividido 4-1BB dirigidas a PD1 o no dirigidas a DP47. Tal como se muestra en **las figuras 13A-H**, en las PBMC humanas frescas aisladas en

30 reposo de donantes sanos, solo se unieron las moléculas de unión a antígeno de fusión Fc de ligando trimérico dividido 4-1BB dirigidas a PD1 (construcción 7.1, construcción 7.3, construcción 7.5 y construcción 7.6) y el control M de IgG humana dirigida a PD1 se unió a células T CD3⁺ CD4⁺, CD3⁺ CD8⁺ y CD3⁺ CD4^{neg} CD8^{neg} γδ. Sin embargo, las moléculas de

unión a antígeno de fusión Fc de ligando trimérico dividido 4-1BB no dirigidas a DP47 (control B, C y D) no se unieron a ninguna de las PBMC recientemente aisladas. Por lo tanto, en las PBMC humanas recientemente aisladas, la mayoría de las células no expresan 4-1BB, mientras que una población de células T expresa una cantidad detectable de PD1. En la tabla 26, se resumen los valores de CE_{50} para las curvas de unión a PBMC humanas aisladas recientes.

Tabla 26: Valores de CE_{50} de las curvas de unión a PBMC humanas en reposo aisladas recientes

	Control M	Construcción 7.1	Construcción 7.3	Construcción 7.5	Construcción 7.6
CE_{50} [nM] en células T CD4 activadas	0,03	0,13	0,11	0,28	0,11
CE_{50} [nM] en células T CD8 activadas	0,07	0,21	0,17	0,38	0,19
CE_{50} [nM] en células T $\gamma\delta$ activadas	0,03	0,34	0,13	0,42	0,27

Tal como se muestra en las figuras 14A-H, después de la activación, las células T $CD45^+ CD3^+ CD19^{neg} CD8^{neg} CD4^+$, las células T $CD45^+ CD3^+ CD19^{neg} CD4^{neg} CD8^+$, las células T $CD45^+ CD3^+ CD4^{neg} CD8^{neg} \gamma\delta$ y las células B $CD45^+ CD3^{neg} CD19^+$ vivas expresan 4-1BB humano y PD1 humano. Las moléculas solo de unión a PD1 (control M) o las moléculas solo de unión a 4-1BB humano (control B, control C y control D) prueban de este modo, que PD1 está altamente regulado positivamente en células T $CD4^+$, células T $CD8^+$, células T $\gamma\delta$ y células B, mientras que 4-1BB está regulado positivamente, principalmente en células T $CD8^+$, células T $\gamma\delta$ y células B, y en menor medida en células T $CD4^+$. Las moléculas de unión a antígeno de fusión Fc de ligando trimérico dividido 4-1BB dirigidas a PD1 (construcción 7.1, construcción 7.3, construcción 7.5 y construcción 7.6) se unen a PD1 y a 4-1BB humano y esto se refleja por medias geométricas mayores de la intensidad de fluorescencia en comparación con los controles de ajuste. En la tabla 27, se resumen los valores de CE_{50} para las curvas de unión a PBMC humanas activadas.

Tabla 27: Valores de CE₅₀ de las curvas de unión a PBMC humanas activadas

	Control B	Control C	Control D	Control M	Construcción 7.1	Construcción 7.3	Construcción 7.5	Construcción 7.6
CE ₅₀ [nM] en células T CD8 activadas	0,19	0,15	0,08	0,30	0,15	0,09	0,62	0,25
CE ₅₀ [nM] en células T CD4 activadas	0,43	0,25	0,15	0,33	0,32	0,15	1,32	0,33
CE ₅₀ [nM] en células T $\gamma\delta$ activadas	0,20	0,16	0,09	0,71	0,12	0,12	0,52	0,32
CE ₅₀ [nM] en células CD19 activadas	0,15	0,15	0,08	0,33	0,15	0,08	1,13	0,40

5.2 Unión a células tumorales transfectadas con PD1 humano y 4-1BB humano

Para los ensayos de unión a células tumorales que expresan PD1 y 4-1BB, se usaron dos células tumorales modificadas genéticamente. La generación de células del clon 26 de células HeLa humanas que expresan hu4-1BB-NF κ B-luc se describirá en el ejemplo 5.3.1. Para las líneas celulares tumorales que expresan PD1, se transfectaron células CHO-k1 con PD1 humano del siguiente modo: la línea celular parental adherente CHO-K1 (ATCC CCL-61) se transfectó de manera estable con el plásmido 15311_hPD1-fl_pUC_Neo que codifica PD1 humano de longitud completa y selección con G418 (marcador de resistencia a neomicina en el plásmido).

Se resuspendieron $0,1 \times 10^6$ células tumorales en DPBS (Gibco de Life Technologies, n.º de cat. 14190 326) y se añadieron a cada pocillo de placas de 96 pocillos de suspensión celular de fondo redondo (greiner bio-one, cellstar, n.º de cat. 650185). Las células se lavaron una vez con 200 μ l de DPBS. Las células se resuspendieron en 100 μ l/pocillo de tampón DPBS frío a 4 °C que contiene colorante de viabilidad fijable eFluor 660 diluido a 1:5000 (eBioscience, n.º de cat. 65-0864-18) y las placas se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron una vez con 200 μ l/pocillo de tampón DPBS frío a 4 °C y se resuspendieron en 50

μl/pocillo de tampón de FACS frío a 4 °C (DPBS suministrado con FBS al 2 %, EDTA 5 mM, pH 8 (Amresco, n.º de cat. E177) y azida sódica 7,5 mM (Sigma-Aldrich S2002)) que contenía moléculas de unión a antígeno de fusión Fc de ligando trimérico dividido 4-1BB dirigidas a PD1 a una serie de concentraciones, seguido de incubación durante 1 hora a 4 °C.

- 5 Después de un lavado exhaustivo, se tiñeron las células adicionalmente con 50 μl/pocillo de tampón de FACS frío a 4 °C que contenía 5 μg de fragmento F(ab')₂ de cabra específico de fragmento F(ab')₂ anti-IgG humana AffiniPure conjugado a PE (Jackson ImmunoResearch, n.º de cat. 109 116 098) durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con 200 μl/pocillo de tampón FACS a 4 °C y las células se fijaron en 50 μl/pocillo de DPBS que
- 10 contenía formaldehído al 1 % (Sigma, HT501320-9.5L). Las células se resuspendieron en 100 μl/pocillo de tampón FACS y se adquirieron usando un analizador MACS Quant 10 (Miltenyi Biotech). Los datos se analizaron usando FlowJo V10 (FlowJo, LLC) y GraphPad Prism 6.04 (GraphPad Software, Inc).

- Se representaron ventanas lógicas para células tumorales vivas y se representaron las medias
- 15 geométricas de la intensidad de fluorescencia del fragmento F(ab')₂ de cabra específico de fragmento Fcγ de IgG anti-IgG humana AffiniPure conjugado a PE frente a la concentración titulada de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc de ligando trimérico dividido 4-1BB dirigidas a PD1 o sus controles. Tal como se muestra en las **figuras 15A y 15B**, solo las moléculas de fusión de ligando 4-1BB trimérico dividido dirigidas a PD1, construcción 7.1.,
 - 20 construcción 7.3, construcción 7.5 y construcción 7.6 y el control M se unieron al clon 5 de CHO-k1-huPD1 que expresa PD1 mientras que las moléculas de control no dirigidas a PD1, control B, control C, control D y control F no se unieron a las células tumorales. En las **figuras 16A y 16B**, solo las moléculas de fusión de ligando 4-1BB trimérico dividido, construcción 7.1, construcción 7.3, construcción 7.5 y construcción 7.6 y el control B, control
 - 25 C y control D se unieron al clon 26 de HeLa-hu4-1BB-NFκB-luc que expresa 4-1BB humano, mientras que los controles que no contenían ligando trimérico dividido 4-1BB fusionado (control F y control M) no se unieron a las células tumorales que expresan 4-1BB humano. En la tabla 28 se muestran los valores de CE₅₀ de las curvas.

- Tabla 28: Valores de CE₅₀ de las curvas de unión a células tumorales que expresan PD1 humano o 4-1BB humano**

	Control C	Control B	Control D	Control M	Construcción 7.1	Construcción 7.3	Construcción 7.5	Construcción 7.6
CE ₅₀ [nM] en células del clon 26 de HeLa- huCD137- NFkB-luc	0,16	0,19	0,25	n.d.	0,14	0,28	0,36	0,32
CE ₅₀ [nM] en células del clon 5 de CHO- K1-huPD1	n.d.	n.d.	n.d.	1,59	1,73	1,43	3,33	1,82

Ejemplo 6

La actividad biológica de las moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc que contienen trímero de ligando de 4-1BB dirigidas a PD1

5 **Activación de NF-κB de la línea celular indicadora HeLa que expresa 4-1BB humano**

6.1 Generación de células HeLa que expresan 4-1BB humano y NF-κB-luciferasa

Se transdujo la línea celular HeLa de carcinoma de cuello de útero (ATCC CCL-2) inducida con papilomavirus humano 18 con un plásmido basado en el vector de expresión pETR10829, que contiene la secuencia de 4-1BB humano (n.º de referencia de UniProt Q07011) bajo el control de un promotor de CMV y un gen de resistencia a la puomicina. Las células se cultivaron en medio DMEM (Gibco de Life Technologies, n.º de cat. 42430-025) suministrado con suero fetal bovino al 10% (FBS, GIBCO de Life Technologies, n.º de cat. 16000-044, Lote. n.º 941273, irradiado con gamma, libre de micoplasma, inactivado por calor a 56 °C durante 35 minutos), GlutaMAX-I al 1 % (GIBCO de Life Technologies, n.º de cat. 35050-038) y 3 µg/ml de Puomicina (InvivoGen, n.º de cat. ant-pr-1).

Las células HeLa transducidas con 4-1BB se ensayaron respecto de la expresión de 4-1BB

mediante citometría de flujo: Se resuspendieron $0,2 \times 10^6$ células vivas en 100 μ l de tampón FACS (DPBS suministrado con FBS al 2 %, EDTA 5 mM pH 8 (Amresco, n.º de cat. E177) y 7,5 mM de azida sódica (Sigma-Aldrich, n.º de cat. S2002)) que contenía 0,1 μ g del clon 4B4-1 de IgG1 κ de ratón anti-4-1BB humano conjugada a PerCP/Cy5.5 (BioLegend n.º de cat. 309814) o su control de isotipo (clon MOPC 21 de control de isotipo de IgG1 κ de ratón conjugado a PerCP/Cy5.5, BioLegend n.º de cat. 400150) y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con tampón de FACS, se resuspendieron en 300 μ l de tampón de FACS que contenía 0,06 μ g de DAPI (Santa Cruz Biotec, n.º de cat. Sc-3598) y se adquirieron usando un LSR-Fortessa de 5 láseres (BD Bioscience, programa informático DIVA). Se efectuaron diluciones limitantes para generar clones individuales del modo siguiente: Las células HeLa transducidas con 4-1BB humano se resuspendieron en medio a una concentración de 10, 5 y 2,5 células/ml y se transfirieron 200 μ l de suspensiones celulares a placas de 96 pocillos tratadas para cultivo tisular de fondo redondo (6 placas/concentración de células, TPP n.º de cat. 92697). Se recogieron los clones individuales, se expandieron y se ensayaron respecto de la expresión de 4-1BB tal como se ha descrito anteriormente. Se seleccionó el clon con la expresión mayor de 4-1BB (clon 5) para su posterior transfección con el vector de expresión de NF κ B-luciferasa, 5495p Tranlucen HygB. El vector confiere a las células transfectadas tanto resistencia a la higromicina B como capacidad para expresar luciferasa bajo el control de un elemento de respuesta a NF κ B (Panomics, n.º de cat. LR0051).

Las células HeLa clon 5 de 4-1BB humano se cultivaron hasta una confluencia del 70%. Se añadieron 50 μ g (40 μ l) de vector de expresión 5495p Tranlucent HygB linearizado (enzimas de restricción AseI y SalI) a un pulsador génico estéril de 0,4 cm/MicroPulser Cuvette (Biorad, n.º de cat. 165-2081). Se añadieron $2,5 \times 10^6$ células HeLa clon 5 de 4-1BB humano en 400 μ l de DMEM sin suplemento y se mezclaron cuidadosamente con la solución de plásmido. La transfección de células se llevó a cabo usando un sistema Gene Pulser Xcell Total (Biorad, 165 2660) con las siguientes configuraciones: pulso exponencial, capacitancia 500 μ F, voltaje 160 V, resistencia ∞ . Inmediatamente después del pulso las células transfectadas se transfirieron a un matraz de cultivo de 75 cm² (TPP, n.º de cat. 90075) con 15 ml de medio DMEM caliente a 37 °C (Gibco de Life Technologies n.º de cat. 42430-025) suministrado con FBS al 10 % y GlutaMAX I al 1 % (GIBCO de Life Technologies, n.º de cat. 35050 038). Al día siguiente, se añadió medio de cultivo que contenía 3 μ g/ml de puromicina (InvivoGen, n.º de cat. ant-pr-1) y 200 μ g/ml de higromicina B (Roche, n.º de cat. 10843555001). Las células supervivientes se expandieron y se llevó a cabo una dilución limitante tal como se describe anteriormente para generar clones individuales. Se ensayaron los clones respecto de la

expresión de 4-1BB tal como se describe anteriormente y respecto de la actividad de NFκB-luciferasa del modo siguiente: Se recogieron clones en medio de selección y se contaron usando un contador de células Vi-cell xr 2.03 (Beckman Coulter, n.º de cat. 731050). Se ajustaron las células a una densidad celular de $0,33 \times 10^6$ células/ml y se transfirieron 150 µl de esta suspensión celular a cada pocillo de una placa de 96 pocillos estéril de cultivo tisular de color blanco de fondo plano con tapa (Greiner bio one, n.º de cat. 655083) y como control a una placa normal de 96 pocillos de cultivo tisular de fondo plano (TPP n.º de cat. 92096) para ensayar la supervivencia y la densidad celular al día siguiente. Las células se incubaron a 37°C y CO₂ al 5 % durante toda la noche. Al día siguiente se añadieron 50 µl de medio que contenía diferentes concentraciones de factor de necrosis tumoral alfa humano recombinante (rhTNF α, PeproTech, n.º de cat. 300 01A) a cada pocillo de una placa de 96 pocillos dando como resultado una concentración final de rhTNF α de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 0 ng/pocillo. Las células se incubaron durante 6 horas a 37 °C y CO₂ al 5 % y después se lavaron tres veces con 200 µl/pocillo de DPBS. Se añadió tampón indicador de lisis (Promega, n.º de cat. E3971) a cada pocillo (30 µl) y se almacenaron durante toda una noche las placas a -20 °C. Al día siguiente, las placas y el tampón de detección congeladas (Sistema de ensayo Luciferase 1000, Promega, n.º de cat. E4550) se descongelaron a temperatura ambiente. Se añadieron 100 µl de tampón de detección a cada pocillo y se midió la placa lo más rápido posible usando un lector de microplacas SpectraMax M5/M5e y el programa informático SoftMax Pro (Molecular Devices). Las URL por encima del control (sin rhTNF α añadido) se tomaron como actividad de luciferasa. Se seleccionó el clon 26 de NFκB-luc-4-1BB-HeLa para su uso posterior porque mostraba la actividad de luciferasa más elevada y un nivel considerable de expresión de 4-1BB.

6.2 Activación con NF-κB de células indicadoras HeLa que expresan 4-1BB humano co-cultivadas con células del clon 5 de CHO-k1-huPD1 que expresan PD1

Las células del clon 26 de NFκB-luc-4-1BB-HeLa se lavaron con DPBS (Gibco de Life Technologies, n.º de cat. 14190 326) y se trataron con EDTA Tripsina al 0,05 % (Gibco de Life Technologies n.º de cat. 25300 054) durante 5 min a 37 °C. Las células se recogieron y resuspendieron en medio DMEM (Gibco de Life Technologies n.º de cat. 42430 025) suministrado con suero de ternero fetal al 10 % (FBS, originario de los Estados Unidos, PAN biotech, P30-2009, Lote P150307GI, irradiado con gamma, libre de micoplasma, inactivado por calor durante 35 min a 56 °C) y GlutaMAX-I al 1 % (GIBCO de Life Technologies, n.º de cat. 35050 038). Se contaron las células usando el contador celular Vi-cell xr 2.03 (Beckman

- Coulter, n.º de cat. 731050) y se ajustaron a una densidad celular de $0,2 \times 10^6$ células/ml. Se transfirieron 100 µl (2×10^4 células) de esta suspensión celular a cada pocillo de una placa de 96 pocillos estéril de cultivo tisular de color blanco de fondo plano con tapa (Greiner bio one, n.º de cat. 655083) y las placas se incubaron a 37 °C y CO₂ al 5 % durante toda la noche. Al día siguiente, se usaron 50 µl de medio que contenía diferentes títulos de moléculas de fusión que contenían ligando 4-1BB trimérico dividido, construcción 7.1., construcción 7.3, construcción 7.5 y construcción 7.6 o los controles de ajuste control B, control C, control D, control F y control M. Para el sobrecruzamiento mediado por la unión a PD1 se usaron células del clon 5 de CHO-k1-huPD1 que expresan PD1.
- Se lavaron las células del clon 5 de CHO-k1-huPD1 adherentes con DPBS (Gibco de Life Technologies, n.º de cat. 14190 326) y se trataron con tampón de disociación celular a base de PBS sin enzima (Gibco de Life Technologies, n.º de cat. 13151-014) durante 10 minutos a 37 °C. Posteriormente, se recogieron las células y se contaron usando el contador celular Vi-cell xr 2.03. Las células se resuspendieron en DEM suministrado con FBS al 10% y L-GlutaMAX-I al 1% a 2×10^6 células/ml y se añadieron 50 µl/pocillo. Después de añadir las células del clon 5 de CHO-k1-huPD1 que expresan PD1 reticulante, se incubaron las placas durante 6 horas 37 °C y CO₂ al 5 %. Las placas de 96 pocillos de fondo plano blancas se lavaron tres veces con 200 µl/pocillo de DPBS. Se prepararon 40 µl de tampón de lisis indicador fresco (Promega, n.º de cat. E3971) y se añadieron a cada pocillo y se almacenó la placa durante una noche a -20 °C. Al día siguiente, las placas congeladas y el tampón de detección (sistema de ensayo Luciferase 1000, Promega, n.º de cat. E4550) se descongelaron a temperatura ambiente. Se añadieron 100 µl de tampón de detección a cada pocillo y las placas se midieron tan rápido como fue posible usando el lector de microplacas SpectraMax M5/M5e y el programa informático SoftMax Pro (Molecular Devices) con las siguientes configuraciones: para luciferasa (URL), tiempo de integración de 500ms, sin filtro, recogida de toda la longitud de onda y lectura superior.

La molécula de unión a antígeno de fusión de Fc que contenía trímero de ligando de 4-1BB dirigida a PD1 (trímero de 4-1BBL separado de PD1) desencadenó la activación de la ruta de señalización de NF-κB en la línea celular indicadora en presencia de células tumorales que expresan PD1. Por el contrario, la variante no dirigida de la misma molécula no logro desencadenar dicho efecto a cualquiera de las concentraciones ensayadas (**figuras 17C y 17D**). Esta actividad de 4-1BBL dirigido fue estrictamente dependiente de la expresión de PD1 en la superficie celular de células tumorales, ya que no pudo detectarse activación de

NF- κ B tras cultivar la línea celular indicadora de NF- κ B con células tumorales negativas a PD1 incluso en presencia de molécula de unión a antígeno de fusión de Fc que contiene trímero de ligando de 4-1BB dirigida a PD1 (**figuras 17A y 17B**). Se muestran las actividades medidas para las construcciones 7.1, 7.3, 7.5 y 7.6. Los valores de CE_{50} medidos en presencia de células tumorales que expresan PD1 se proporcionan en la tabla 29 a continuación.

Tabla 29: Valores de CE_{50} de las curvas de actividad de luciferasa inducida por activación de NF κ B

	Construcción 7.1	Construcción 7.3	Construcción 7.5	Construcción 7.6
CE_{50} [nM] con clon 5 de CHO-k1-huPD1	0,004	0,004	0,006	0,007

Citas:

- Ascierto, P. A., E. Simeone, M. Sznol, Y. X. Fu e I. Melero (2010), Clinical experiences with anti-CD137 and anti-PD1 therapeutic antibodies. *Semin Oncol* 37:508-516.
- Aggarwal B.B. (2003), Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* 3(9),745-56.
- Banner D. et al (1993), Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 73, 431-445.
- Bodmer J., Schneider P. y Tschopp, J. (2002), The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends in Biochemical Sciences* 27(1), 19-26.
- 10 Broll, K., Richter, G., Pauly, S., Hofstaedter, F. y Schwarz, H. (2001). CD137 expression in tumor vessel walls. High correlation with malignant tumors. *Am J Clin Pathol* 115, 543-549.
- Buechele, C., Baessler, T., Schmiedel, B.J., Schumacher, C.E., Grosse-Hovest, L., Rittig, K. y Salih, H.R. (2012). 4-1BB ligand modulates direct and Rituximab-induced NK-cell reactivity in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Immunol* 42, 737-748.
- 15 Chen S., Lee L., Fisher T., Jessen B., Elliott M., Evering W., Logronio K., Tu K.H., Tsaparikos K., Li X., Wang H., Ying C., Xiong M., Van Arsdale T. y Lin J.C. (2015), Combination of 4-1BB Agonist and PD-1 Antagonist Promotes Antitumor Effector/Memory CD8 T Cells in a Poorly Immunogenic Tumor Model. *Cancer Immunology Research* 3(2), 149-160. Publicado en línea el 11 de noviembre de 2014.
- 20 Choi, B.K., Kim, Y.H., Kwon, P.M., Lee, S.C., Kang, S.W., Kim, M.S., Lee, M.J. y Kwon, B.S. (2009). 4-1BB functions as a survival factor in dendritic cells. *J Immunol* 182, 4107-4115.
- Cuadros, C., Dominguez, A.L., Lollini, P.L., Croft, M., Mittler, R.S., Borgstrom, P. y Lustgarten, J. (2005). Vaccination with dendritic cells pulsed with apoptotic tumors in combination with anti-OX40 and anti-4-1BB monoclonal antibodies induces T cell-mediated protective immunity in Her-2/neu transgenic mice. *Int J Cancer* 116, 934-943.
- 25 Curran, M.A., Kim, M., Montalvo, W., Al-Shamkhani, A. y Allison, J.P. (2011). Combination CTLA-4 blockade and 4-1BB activation enhances tumor rejection by increasing T-cell

infiltration, proliferation, and cytokine production. PLoS One 6, e19499.

Diehl, L., van Mierlo, G.J., den Boer, A.T., van der Voort, E., Fransen, M., van Bostelen, L., Krimpenfort, P., Melief, C.J., Mittler, R., Toes, R.E. y Offringa, R. (2002). In vivo triggering through 4-1BB enables Th-independent priming of CTL in the presence of an intact CD28
5 costimulatory pathway. J Immunol 168, 3755-3762.

Dubrot, J., Milheiro, F., Alfaro, C., Palazon, A., Martinez-Forero, I., Perez-Gracia, J.L., Morales-Kastresana, A., Romero-Trevejo, J.L., Ochoa, M.C., Hervas-Stubbs, S., et al. (2010). Treatment with anti-CD137 mAbs causes intense accumulations of liver T cells without selective antitumor immunotherapeutic effects in this organ. Cancer Immunol Immunother 59,
10 1223-1233.

Futagawa, T., Akiba, H., Kodama, T., Takeda, K., Hosoda, Y., Yagita, H. y Okumura, K. (2002). Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells. Int Immunol 14, 275-286.

Guo, Z., Cheng, D., Xia, Z., Luan, M., Wu, L., Wang, G. y Zhang, S. (2013). Combined TIM-3 blockade and CD137 activation affords the long-term protection in a murine model of
15 ovarian cancer. J Transl Med 11, 215.

Heinisch, I.V., Daigle, I., Knopfli, B. y Simon, H.U. (2000). CD137 activation abrogates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-mediated anti-apoptosis in neutrophils. Eur J Immunol 30, 3441-3446.

20 Hornig, N., Kermer, V., Frey, K., Diebolder, P., Kontermann, R.E., Mueller, D. (2012). Combination of a bispecific antibody and costimulatory antibody-ligand fusion proteins for targeted cancer immunotherapy. J. Immunother. 35, 418-429.

Ju, S.A., Cheon, S.H., Park, S.M., Tam, N.Q., Kim, Y.M., An, W.G. y Kim, B.S. (2008). Eradication of established renal cell carcinoma by a combination of 5-fluorouracil and anti-4-
25 1BB monoclonal antibody in mice. Int J Cancer 122, 2784-2790.

Kienzle, G. y von Kempis, J. (2000). CD137 (ILA/4-1BB), expressed by primary human monocytes, induces monocyte activation and apoptosis of B lymphocytes. Int Immunol 12, 73-82.

Kim, D.H., Chang, W.S., Lee, Y.S., Lee, K.A., Kim, Y.K., Kwon, B.S. y Kang, C.Y. (2008).

4-1BB engagement costimulates NKT cell activation and exacerbates NKT cell ligand-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *J Immunol* 180, 2062-2068.

Kim, Y.H., Choi, B.K., Oh, H.S., Kang, W.J., Mittler, R.S. y Kwon, B.S. (2009). Mechanisms involved in synergistic anticancer effects of anti-4-1BB and cyclophosphamide therapy. *Mol Cancer Ther* 8, 469-478.

Kwon, B.S. y Weissman, S.M. (1989). cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1963-1967.

Lee, H., Park, H.J., Sohn, H.J., Kim, J.M. y Kim, S.J. (2011). Combinatorial therapy for liver metastatic colon cancer: dendritic cell vaccine and low-dose agonistic anti-4-1BB antibody co-stimulatory signal. *J Surg Res* 169, e43-50.

Levitsky, V., de Campos-Lima, P.O., Frisan, T. y Masucci, M.G. (1998). The clonal composition of a peptide-specific oligoclonal CTL repertoire selected in response to persistent EBV infection is stable over time. *J Immunol* 161, 594-601.

Li, F. y Ravetch, J.V. (2011). Inhibitory Fcγ receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies. *Science* 333, 1030-1034.

Lin, W., Voskens, C.J., Zhang, X., Schindler, D.G., Wood, A., Burch, E., Wei, Y., Chen, L., Tian, G., Tamada, K., et al. (2008). Fc-dependent expression of CD137 on human NK cells: insights into "agonistic" effects of anti-CD137 monoclonal antibodies. *Blood* 112, 699-707.

Melero, I., Johnston, J.V., Shufford, W.W., Mittler, R.S. y Chen, L. (1998). NK1.1 cells express 4-1BB (CDw137) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by anti-4-1BB monoclonal antibodies. *Cell Immunol* 190, 167-172.

Melero, I., Shuford, W.W., Newby, S.A., Aruffo, A., Ledbetter, J.A., Hellstrom, K.E., Mittler, R.S. y Chen, L. (1997). Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat Med* 3, 682-685.

Merchant, A.M., Zhu, Z., Yuan, J.Q., Goddard, A., Adams, C.W., Presta, L.G. y Carter, P. (1998). An efficient route to human bispecific IgG. *Nat Biotechnol* 16, 677-681.

Morales-Kastresana, A., Sanmamed, M.F., Rodriguez, I., Palazon, A., Martinez-Forero, I., Labiano, S., Hervas-Stubbs, S., Sangro, B., Ochoa, C., Rouzaut, A., et al. (2013). Combined immunostimulatory monoclonal antibodies extend survival in an aggressive transgenic

hepatocellular carcinoma mouse model. *Clin Cancer Res* 19, 6151-6162.

Mueller, D., Frey, K., Kontermann, R.E. (2008), A novel antibody-4-1BBL fusion protein for targeted costimulation in cancer immunotherapy, *J. Immunother.* 31, 714-722.

Murillo, O., Dubrot, J., Palazon, A., Arina, A., Azpilikueta, A., Alfaro, C., Solano, S., Ochoa, M.C., Berasain, C., Gabari, I., et al. (2009). In vivo depletion of DC impairs the anti-tumor effect of agonistic anti-CD137 mAb. *Eur J Immunol* 39, 2424-2436.

Narazaki, H., Zhu, Y., Luo, L., Zhu, G. y Chen, L. (2010). CD137 agonist antibody prevents cancer recurrence: contribution of CD137 on both hematopoietic and nonhematopoietic cells. *Blood* 115, 1941-1948.

10 Nishimoto, H., Lee, S.W., Hong, H., Potter, K.G., Maeda-Yamamoto, M., Kinoshita, T., Kawakami, Y., Mittler, R.S., Kwon, B.S., Ware, C.F., et al. (2005). Costimulation of mast cells by 4-1BB, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, with the high-affinity IgE receptor. *Blood* 106, 4241-4248.

Olofsson, P.S., Soderstrom, L.A., Wagsater, D., Sheikine, Y., Ocaya, P., Lang, F., Rabu, C., 15 Chen, L., Rudling, M., Aukrust, P., et al. (2008). CD137 is expressed in human atherosclerosis and promotes development of plaque inflammation in hypercholesterolemic mice. *Circulation* 117, 1292-1301.

Palazon, A., Teijeira, A., Martinez-Forero, I., Hervas-Stubbs, S., Roncal, C., Penuelas, I., Dubrot, J., Morales-Kastresana, A., Perez-Gracia, J.L., Ochoa, M.C., et al. (2011). Agonist 20 anti-CD137 mAb act on tumor endothelial cells to enhance recruitment of activated T lymphocytes. *Cancer Res* 71, 801-811.

Schwarz, H., Valbracht, J., Tuckwell, J., von Kempis, J. y Lotz, M. (1995). ILA, the human 4-1BB homologue, is inducible in lymphoid and other cell lineages. *Blood* 85, 1043-1052.

Shao, Z. y Schwarz, H. (2011). CD137 ligand, a member of the tumor necrosis factor family, 25 regulates immune responses via reverse signal transduction. *J Leukoc Biol* 89, 21-29.

Shi, W. y Siemann, D.W. (2006). Augmented antitumor effects of radiation therapy by 4-1BB antibody (BMS-469492) treatment. *Anticancer Res* 26, 3445-3453.

Shindo Y., Yoshimura K., Kuramasu A., Watanabe Y., Ito H.; Kondo T., et al. (2015). Combination Immunotherapy with 4-1BB activation and PD-1 blockade enhances antitumor

efficacy in a mouse model of subcutaneous tumor. *Anticancer Res.* 35(1), 129-136.

Simeone, E. y Ascierto, P.A. (2012). Immunomodulating antibodies in the treatment of metastatic melanoma: the experience with anti-CTLA-4, anti-CD137, and anti-PD1. *J Immunotoxicol* 9, 241-247.

- 5 Snell, L.M., Lin, G.H., McPherson, A.J., Moraes, T.J. y Watts, T.H. (2011). T-cell intrinsic effects of GITR and 4-1BB during viral infection and cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 244, 197-217.

- 10 Stagg, J., Loi, S., Divisekera, U., Ngiow, S.F., Duret, H., Yagita, H., Teng, M.W. y Smyth, M.J. (2011). Anti-ErbB-2 mAb therapy requires type I and II interferons and synergizes with anti-PD-1 or anti-CD137 mAb therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 7142-7147.

Teng, M.W., Sharkey, J., McLaughlin, N.M., Exley, M.A. y Smyth, M.J. (2009). CD1d-based combination therapy eradicates established tumors in mice. *J Immunol* 183, 1911-1920.

- 15 von Kempis, J., Schwarz, H. y Lotz, M. (1997). Differentiation-dependent and stimulus-specific expression of ILA, the human 4-1BB-homologue, in cells of mesenchymal origin. *Osteoarthritis Cartilage* 5, 394-406.

Wei, H., Zhao, L., Li, W., Fan, K., Qian, W., Hou, S., Wang, H., Dai, M., Hellstrom, I., Hellstrom, K.E. y Guo, Y. (2013). Combinatorial PD-1 blockade and CD137 activation has therapeutic efficacy in murine cancer models and synergizes with cisplatin. *PLoS One* 8, e84927.

- 20 Wei H., Zhao L., Hellstrom I., Hellstrom K.E. y Guo Y. (2014). Dual targeting of CD137 co-stimulatory and PD-1 co-inhibitory molecules for ovarian cancer immunotherapy, *OncoImmunology*, 3:4, e28248, DOI: 10.4161/onci.28248.

- 25 Wilcox, R.A., Chapoval, A.I., Gorski, K.S., Otsuji, M., Shin, T., Flies, D.B., Tamada, K., Mittler, R.S., Tsuchiya, H., Pardoll, D.M. y Chen, L. (2002). Cutting edge: Expression of functional CD137 receptor by dendritic cells. *J Immunol* 168, 4262-4267.

Wilcox, R.A., Tamada, K., Flies, D.B., Zhu, G., Chapoval, A.I., Blazar, B.R., Kast, W.M. y Chen, L. (2004). Ligation of CD137 receptor prevents and reverses established anergy of CD8⁺ cytolytic T lymphocytes in vivo. *Blood* 103, 177-184.

Zhang, N., Sadun, R.E., Arias, R.S., Flanagan, M.L., Sachsman, S.M., Nien, Y., Khawli, L.A.,

Hu, P., Epstein, A.L. (2007). Targeted and untargeted CD137L fusion proteins for the immunotherapy of experimental solid tumors. Clin. Cancer Res. 13, 2758-2767.

Zhang, X., Voskens, C.J., Sallin, M., Maniar, A., Montes, C.L., Zhang, Y., Lin, W., Li, G., Burch, E., Tan, M., et al. (2010). CD137 promotes proliferation and survival of human B cells.
5 J Immunol 184, 787-795.
