

POLIPÉPTIDOS DE FUSIÓN CD40L-Fc Y SUS MÉTODOS DE USO**REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS**

Esta solicitud de patente reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. N.º 62/336 129, presentada el 13 de mayo de 2016, que se incorpora a modo de referencia a la presente en su totalidad.

REFERENCIA A LA LISTA DE SECUENCIAS

Esta solicitud incorpora a modo de referencia una Lista de Secuencias presentada con esta solicitud en forma de texto titulado "CD40F-100-WO-SeqListing.txt" creado el 11 de mayo de 2017 y que tiene un tamaño de 41 547 bytes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cáncer sigue siendo uno de los problemas principales de la salud global. A pesar del progreso en el tratamiento del cáncer, sigue existiendo una necesidad médica no cubierta en lo que se refiere a terapias más eficaces y menos tóxicas, especialmente para aquellos pacientes con enfermedad avanzada o cánceres que son resistentes a agentes terapéuticos ya existentes.

Se conoce bien el papel del sistema inmunitario, en particular la citotoxicidad mediada por linfocitos T, para el control de tumores. Cada vez hay más pruebas de que los linfocitos T controlan la supervivencia y el crecimiento tumoral en pacientes con cáncer, tanto en los estadios tempranos como tardíos de la enfermedad. Sin embargo, las respuestas de linfocitos T específicos de tumores son difíciles de establecer y mantener en los pacientes con cáncer.

Las rutas de los linfocitos T que están recibiendo una atención significativa hasta la fecha incluyen la señalización a través del antígeno 4 de linfocitos T

citotóxicos (CTLA-4, CD152) y del ligando 1 de muerte programada (PD-L1, también conocido como B7-H1 o CD274). Sin embargo, recientemente el ligando de CD40 (CD40L) ha suscitado interés como un mediador del control tumoral.

5 CD40L es un miembro de la familia de moléculas TNF que se expresa principalmente en linfocitos T activados (incluidos los subtipos Th0, Th1 y Th2) y forma homotrímeros al igual que otros miembros de esta familia. Además, también se ha descubierto que CD40L se expresa en mastocitos, y
10 basófilos y eosinófilos activados. CD40L se une a su receptor CD40 en células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés), lo cual produce muchos efectos dependiendo del tipo de célula diana. En general, CD40L desempeña la función de una molécula coestimuladora e induce la activación
15 en APC junto con la estimulación de los receptores de los linfocitos T por parte de las moléculas MHC sobre las APC.

A pesar de los significativos avances logrados durante la última década en el desarrollo de estrategias para combatir el cáncer y otras enfermedades, los pacientes con
20 enfermedad avanzada, refractaria y metastásica tienen opciones clínicas limitadas. La quimioterapia, la irradiación y la quimioterapia con altas dosis han pasado a limitar la dosis. Sigue habiendo una necesidad sustancial no satisfecha de nuevos métodos y agentes terapéuticos menos
25 tóxicos que tengan una mejor eficacia terapéutica, un beneficio clínico más prolongado y perfiles de seguridad mejorados, en particular para aquellos pacientes con enfermedad avanzada o cánceres que son resistentes a los agentes terapéuticos existentes.

RESUMEN DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención proporciona una proteína de fusión (por ejemplo, una proteína de fusión CD40L-Fc) que incluye una fusión monocatenaria de tres subunidades de ligandos de CD40 (CD40L), o sus fragmentos, (scCD40L) ligadas covalentemente entre sí mediante conectores peptídicos; y un monómero de Fc, donde el scCD40L está ligado covalentemente al monómero de Fc mediante un conector peptídico.

En otro aspecto, la invención proporciona un dímero de dos proteínas de fusión (por ejemplo, una proteína de fusión CD40L-Fc), incluyendo cada proteína de fusión una fusión monocatenaria de tres subunidades de ligandos de CD40 (CD40L), o sus fragmentos, (scCD40L) ligadas covalentemente entre sí mediante conectores peptídicos; y un monómero de Fc, donde el scCD40L está ligado covalentemente al monómero de Fc mediante un conector peptídico, y donde el dímero se forma mediante interacción de los monómeros de Fc.

En un aspecto específico, la invención proporciona una proteína de fusión que contiene una fusión monocatenaria que incluye, del extremo N al extremo C, una primera subunidad de CD40L que tiene la secuencia de aminoácidos:

NPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIY
AQVTFCSNREASSQAPFIASLWLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFEL
QPGASVFNVTDPSPQVSHGTGFTSFGLLKL (SEQ ID NO: 1)

que se liga covalentemente a un primer conector peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos:

GGGGSGGGS (SEQ ID NO: 2)

que se liga covalentemente a una segunda subunidad de CD40L que tiene la secuencia de aminoácidos:

QIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQ
VTFCSNREASSQAPFIASLWLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQP
GASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLLKL (SEQ ID NO: 3)

que se liga covalentemente a un segundo conector
5 peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos:

GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 2)

que se liga covalentemente a una tercera subunidad de
CD40L que tiene la secuencia de aminoácidos:

QIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQ
10 VTFCSNREASSQAPFIASLWLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQP
GASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLLKL (SEQ ID NO: 3)

que se liga covalentemente a un tercer conector
peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos:

GGGGSGGGSGGGG (SEQ ID NO: 4)

15 que se liga covalentemente a un polipéptido de Fc.

En otro aspecto, la invención proporciona un método
para activar un polipéptido de CD40, que conlleva poner en
contacto el polipéptido de CD40 con una proteína de fusión
aislada de acuerdo con cualquier aspecto definido en la
20 presente (por ejemplo, una proteína de fusión CD40L-Fc).

En otro aspecto, la invención proporciona un método
para mejorar una respuesta inmunitaria antitumoral en un
sujeto que conlleva administrar al sujeto una proteína de
fusión aislada de acuerdo con cualquier aspecto definido en
25 la presente (por ejemplo, una proteína de fusión CD40L-Fc).

En otro aspecto, la invención proporciona un método
para tratar a un sujeto que padece cáncer que conlleva
administrar al sujeto una proteína de fusión aislada de
acuerdo con cualquier aspecto definido en la presente (por
30 ejemplo, una proteína de fusión CD40L-Fc) y opcionalmente
uno o más inhibidores de puntos de control inmunitario.

En otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de acuerdo con cualquier aspecto definido en la presente (por ejemplo, una proteína de fusión CD40L-Fc).

En un aspecto relacionado, la invención proporciona un vector que contiene el polinucleótido de acuerdo con cualquier aspecto definido en la presente.

En otro aspecto relacionado, la invención proporciona una célula hospedadora que contiene el vector de acuerdo con cualquier aspecto definido en la presente, incluida una célula hospedadora que expresa la proteína de fusión aislada de acuerdo con cualquier aspecto definido en la presente (por ejemplo, una proteína de fusión CD40L-Fc).

En otro aspecto, la invención proporciona un método para generar la proteína de fusión de acuerdo con cualquier aspecto definido en la presente (por ejemplo, una proteína de fusión CD40L-Fc), que conlleva cultivar la célula hospedadora de acuerdo con cualquier aspecto definido en la presente; y aislar la proteína de fusión.

En otro aspecto, la invención proporciona un kit que comprende una proteína de fusión aislada (por ejemplo, una proteína de fusión CD40L-Fc), un polinucleótido, el vector, o la célula hospedadora de cualquier aspecto definido en la presente.

En diversas realizaciones de cualquier aspecto definido en la presente, la proteína de fusión (por ejemplo, la proteína de fusión CD40L-Fc) se une a CD40 y lo activa (por ejemplo, un agonista de CD40). En varias realizaciones, el scCD40L se pliega en un homotrímero de CD40L. En varias realizaciones, la proteína de fusión aislada (por ejemplo,

la proteína de fusión CD40L-Fc) es un dímero. En varias realizaciones, la proporción de las subunidades de CD40L respecto al monómero de Fc es 3:1. En varias realizaciones, la proteína de fusión aislada tiene menos de aproximadamente un 10% de agregación durante al menos 3 días a aproximadamente 21 °C o más. En varias realizaciones, la proteína de fusión aislada tiene menos de aproximadamente un 1% de agregación durante al menos 7 días o más a aproximadamente 21 °C.

En ciertas realizaciones, la proteína de fusión aislada tiene menos de aproximadamente un 10% de agregación durante al menos 3 días o más a aproximadamente 45 °C.

En varias realizaciones de cualquier aspecto definido en la presente, la proteína de fusión CD40L-Fc o la subunidad de CD40L incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 85% de identidad de la secuencia de aminoácidos con

QIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQ
VTFCNREASSQAPFIASLWLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQP
GASVFNVTDPSPQVSHGTGFTSFGLLKL (SEQ ID NO: 3).

En varias realizaciones de cualquier aspecto definido en la presente, una o más subunidades de CD40L tienen un residuo de Trp en la posición 74 (por ejemplo, correspondiente a una sustitución C→W en la posición 194 del CD40L unido a la membrana completo). En varias realizaciones de cualquier aspecto definido en la presente, una o más subunidades de CD40L tienen una secuencia de CD40L humano.

En varias realizaciones de cualquier aspecto definido en la presente, el scCD40L está ligado al extremo N o al extremo C del monómero de Fc. En ciertas realizaciones, el monómero de Fc contiene una región bisagra. En varias

realizaciones de cualquier aspecto definido en la presente, el monómero de Fc comprende una secuencia de Fc humano (por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de IgG4).

En varias realizaciones de cualquier aspecto definido en la presente, los conectores peptídicos ligados covalentemente a las subunidades de CD40L, o sus fragmentos, contienen de aproximadamente 9 a aproximadamente 20 aminoácidos.

En ciertas realizaciones, los conectores peptídicos ligados covalentemente a las subunidades de CD40L, o sus fragmentos, contienen de aproximadamente 9 a aproximadamente 15 aminoácidos. En realizaciones particulares, los conectores peptídicos ligados covalentemente a las subunidades de CD40L, o sus fragmentos, contienen aproximadamente 9 aminoácidos.

En varias realizaciones de cualquier aspecto definido en la presente, los conectores peptídicos contienen uno o más residuos de los aminoácidos glicina (Gly) o serina (Ser). En varias realizaciones, el conector entre las subunidades de CD40L es $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ (SEQ ID NO: 5), donde n es un número entero positivo seleccionado entre 2, 3 y 4; $(\text{Gly}_3\text{Ser})_n$ (SEQ ID NO: 6), donde n se selecciona entre 3, 4 y 5; $\text{Gly}(\text{Gly}_3\text{Ser})_n$ (SEQ ID NO: 7), donde n se selecciona entre 2, 3 y 4; o $\text{Gly}(\text{Gly}_2\text{Ser})_n$ (SEQ ID NO: 8), donde n se selecciona entre 3, 4, 5 y 6. En realizaciones particulares, el conector es GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 4) o GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 2).

En varias realizaciones de cualquier aspecto definido en la presente, la proteína de fusión (por ejemplo, la proteína de fusión CD40L-Fc) contiene la secuencia de aminoácidos:

NPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIY
AQVTFCSNREASSQAPFIASLWLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFEL
QPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKLGGGSGGGGSQIAAHVISEASSKTTSVLQW
AEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLWLKSPG
5 RFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGL
LKLGGGSGGGGSQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQ
LYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLWLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLG
GVFELQPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKLGGGSGGGGSQIAAHVISEASSKTT
PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
10 AKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSGF
FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 9;
scCD40L-IgG4P-FP6; MEDI5083);

NPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIY
15 AQVTFCSNREASSQAPFIASLWLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFEL
QPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKLGGGSGGGGSQIAAHVISEASSKT
TSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASL
WLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQSQVSHGTG
FTSFGLLKLGGGSGGGGSQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTL
20 ENKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLWLKSPGRFERILLRAANTHSS
AKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKLGGGSGGGGSQ
GGSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
25 TTPVLDSGSGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK
(SEQ ID NO: 10; scCD40L-IgG4P-FP7); o

DPQIAAHVSEANSNAASVLQWAKKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKREGLYYVY
TQVTFCSNREPSSQRPFIIVGLWLKPSSGSERILLKAANTHSSSQCEQQSVHLGGVFEL
QAGASVFNVTTEASQVIHRVGFSSFGLLKLGGGSGGSQIAAHVSEANSNAASVLQWAK
30 KGYTMSNNLVTLENGKQLTVKREGLYYVYTQVTFCSNREPSSQRPFIIVGLWLKPSSGS
ERILLKAANTHSSSQCEQQSVHLGGVFELQAGASVFNVTTEASQVIHRVGFSSFGLLK

5 LGGGSGGSQIAAHVVSEANSNAASVLQWAKKGYTMTKSNLVMLENGKQLTVKREGLYYV
YTQVTFCNREPSSQRPFIIVGLWLKPSSGSRILLKAANTHSSSQLCEQQSVHLGGVFE
LQAGASVFNVTESQVIHRVGFSSFGLLKLGGGGSGGGGSGGGGSVPRDCGCKPCICT
VPEVSSVFIFPPKPKDVLTTITLTPKVTCVVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTPR
EEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTI
PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKL
NVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK (SEQ ID NO: 11; el
sustituto murino Fc de IgG1 D265A de ratón, similar a FP5).

10 En varias realizaciones de cualquier aspecto definido
en la presente, la proteína de fusión (por ejemplo, la
proteína de fusión CD40L-Fc) se une a hasta seis polipéptidos
de CD40. En varias realizaciones, el polipéptido de CD40
está en una célula. En varias realizaciones, la célula
expresa un polipéptido de CD40. En ciertas realizaciones, la
15 célula es una célula presentadora de antígenos, macrófago,
linfocito B o célula dendrítica. En varias realizaciones, la
célula está en un sujeto. En ciertas realizaciones, el sujeto
padece cáncer.

20 En varias realizaciones de cualquier aspecto definido
en la presente, el uno o más inhibidores de puntos de control
inmunitario comprenden un antagonista de PD-L1 o CTLA-4. En
varias realizaciones, el antagonista de PD-L1 o CTLA-4 es un
anticuerpo. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-
L1 es durvalumab. En ciertas realizaciones, el anticuerpo
25 anti-CTLA-4 es tremelimumab. En varias realizaciones de
cualquier aspecto definido en la presente, se potencia una
respuesta inmunitaria y/o una respuesta anticancerosa. En
varias realizaciones de cualquier aspecto definido en la
presente, se reduce la inmunosupresión de un microentorno
30 tumoral.

Definiciones

A menos que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el significado que le asigna comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan al experto en la técnica una definición general de muchos de los términos utilizados en esta invención: Singleton *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2^a ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5^a Ed., R. Rieger *et al.* (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale y Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Tal como se utilizan en la presente, los siguientes términos tienen los significados que se les atribuye a continuación, a menos que se especifique algo distinto.

La expresión "actividad antitumoral" se refiere a cualquier actividad biológica que reduce o estabiliza la proliferación o supervivencia de una célula tumoral. En una realización, la actividad antitumoral es una respuesta inmunitaria antitumoral.

La expresión "agente inmunomodulador" se refiere a un agente que potencia una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta inmunitaria antitumoral). Los agentes inmunomoduladores ilustrativos de la invención incluyen anticuerpos, tales como un anticuerpo anti-CTLA-4, un anticuerpo anti-PD-L1, y sus fragmentos, así como también proteínas, tales como una proteína de fusión CD40L-Fc, o sus fragmentos.

La expresión "polipéptido de CD40L" se refiere a un polipéptido o fragmento suyo que tiene al menos aproximadamente un 85% de identidad de aminoácidos con el N.º de acceso NCBI NP_000065 y que tiene actividad de unión

a CD40. El término "CD40L" se refiere tanto al CD40L completo como a los fragmentos solubles, por ejemplo, formas de dominio extracelular de CD40L generadas por proteólisis y a formas monoméricas de CD40L así como también formas oligoméricas, por ejemplo, CD40L trimérico. Las secuencias de aminoácidos de las formas solubles y unidas a membrana del CD40L humano se muestran a continuación:

CD40L sp|P29965|CD40L_HUMANO - Forma unida a la membrana (SEQ ID NO: 12)

10 Dominio citoplasmático = 1-20; región de la proteína de la membrana de tipo II de anclaje-señal = 21-46; forma soluble = 113-261

MIETYNQTSPPSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIE
DERNLH

15 EDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQ
KGDQNP

QIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQ
VTFCSN

REASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPG
20 ASVFDN

VTDPQVSHGTGFTSFGLLKL

CD40L- Forma soluble (SEQ ID NO: 13)

MQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQ
GLYYIY

25 AQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLG
GVFELQ

PGASVFDNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL

La expresión "molécula de ácido nucleico CD40L" se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido de
30 CD40L. Se proporciona una secuencia de una molécula de ácido

nucleico de CD40L ilustrativa en el N.º de acceso NCBI NM_000074.

La expresión "polipéptido de CD40" se refiere a un polipéptido o fragmento suyo que tiene al menos
5 aproximadamente un 85% de identidad de aminoácidos con el N.º de acceso NCBI NP_001241 y que tiene actividad de unión a CD40L. A continuación se proporciona una secuencia de aminoácidos de CD40 ilustrativa (SEQ ID NO: 14):

```
10 MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEF
TETECLE
PCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWHCTSE
ACESCV
LHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVV
QQAGTN
15 KTDVVCGPQDRLRALVVIPIIFGILFAILLVLVFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQ
EINFPD
DLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ
```

La expresión "molécula de ácido nucleico CD40" se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido de
20 CD40. Se proporciona una secuencia de una molécula de ácido nucleico de CD40 ilustrativa en el N.º de acceso NCBI NM_001250.

La expresión "polipéptido de PD-L1" se refiere a un polipéptido o fragmento suyo que tiene al menos
25 aproximadamente un 85% de identidad de aminoácidos con el N.º de acceso NCBI NP_001254635 y que tiene actividad de unión a PD-1 y CD80. A continuación se proporciona una secuencia de aminoácidos de PD-L1 ilustrativa (SEQ ID NO: 15):

```
30 MRIFAVFIFMTYWHLNAPYNKINQRILVVDPVTSEHELTCAEGYPKAEVIWT
SSDHQV
```

LSGKTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPE
LPLAHP

PNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLE
ET

5 La expresión "molécula de ácido nucleico PD-L1" se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido de PD-L1. Se proporciona una secuencia de una molécula de ácido nucleico de PD-L1 ilustrativa en el N.º de acceso NCBI NM_001267706.

10 La expresión "anticuerpo anti-PD-L1" se refiere a un anticuerpo que se une selectivamente a un polipéptido de PD-L1. Se describen anticuerpos anti-PD-L1 ilustrativos, por ejemplo, en los documentos US20130034559 / US8779108 y US20140356353, que se incorporan a la presente a modo de
15 referencia. Durvalumab (MEDI4736) es un anticuerpo anti-PD-L1 ilustrativo. Otros anticuerpos anti-PD-L1 incluyen BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb) y MPDL3280A (Roche).

VL de Durvalumab (SEQ ID NO: 16)

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASS
20 RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIK

VH de Durvalumab (SEQ ID NO: 17)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQD
GSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQ
GTLVTVSS

25 **CDR1 de VH de Durvalumab (SEQ ID NO: 18)**

GFTFSRYWMS

CDR2 de VH de Durvalumab (SEQ ID NO: 19)

NIKQDGSEKYYVDSVKG

CDR3 de VH de Durvalumab (SEQ ID NO: 20)

30 EGGWFGELAFDY

CDR1 de VL de Durvalumab (SEQ ID NO: 21)

RASQRVSSSYLA

CDR2 de VL de Durvalumab (SEQ ID NO: 22)

DASSRAT

CDR3 de VL de Durvalumab (SEQ ID NO: 23)

5 QQYGSLPWT

La expresión "polipéptido de PD-1" se refiere a un polipéptido o fragmento suyo que tiene al menos aproximadamente un 85% de identidad de aminoácidos con el N.º de acceso NCBI NP_005009 y que tiene actividad de unión a PD-L1. A continuación se proporciona una secuencia de aminoácidos de PD-1 ilustrativa (SEQ ID NO: 24):

10 MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTS

ESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR
15 RNDSGT

YLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVGVV
GGLLGS

LVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKT
PEPPVP

20 CVPEQTEYATIVFPSPGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL

La expresión "molécula de ácido nucleico PD-1" se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido de PD-1. Se proporciona una secuencia de una molécula de ácido nucleico de PD-1 ilustrativa en el N.º de acceso NCBI
25 NM_005018.

La expresión "polipéptido de CTLA-4" se refiere a un polipéptido que tiene al menos un 85% de identidad de la secuencia de aminoácidos con el N.º de acceso GenBank AAL07473.1 o un fragmento suyo que tiene actividad inhibidora de linfocitos T. A continuación se proporciona una secuencia de aminoácidos de CTLA-4 ilustrativa (SEQ ID NO: 25):

30

gi|15778586|gb|AAL07473.1|AF414120_1 CTLA-4 [Homo sapiens]

MACLGFRHKAQLNLATRTWPCTLLFLLFIPVFCKAMHVAQPAVVLAASSRGIA
SFVCEYASPGKATEVR

5 VTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDT
GLYICKVELMYPPPY

LGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRS
PLTTGVYVKMPPEPE

CEKQFQPYFIPIN

10 La expresión "molécula de ácido nucleico CTLA-4" se
refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido de
CTLA-4. Se proporciona una molécula de ácido nucleico de
CTLA-4 ilustrativa en el N.º de acceso GenBank AF414120.1.

La expresión "anticuerpo anti-CTLA-4" se refiere a un
15 anticuerpo que se une selectivamente a un polipéptido de
CTLA-4. Se describen anticuerpos anti-CTLA-4 ilustrativos,
por ejemplo, en las Patentes de EE. UU. N.ºs 6 682 736;
7 109 003; 7 123 281; 7 411 057; 7 824 679; 8 143 379;
7 807 797; y 8 491 895 (Tremelimumab es 11.2.1 en ella), que
20 se incorporan a la presente a modo de referencia.
Tremelimumab es un anticuerpo anti-CTLA-4 ilustrativo. Se
proporcionan las secuencias de Tremelimumab a continuación.

Tremelimumab Patente de EE. UU. N.º 6 682 736

VL de Tremelimumab (SEQ ID NO: 26)

25 PSSLSASVGDRVTITCRASQSINSYLDWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTPFTFGPGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV

VH de Tremelimumab (SEQ ID NO: 27)

GVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKYYADS
30 VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPRGATLYYYYYGMDVWGQGTITV
VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH

CDR1 de VH de Tremelimumab (SEQ ID NO: 28)

GFTFSSYGMH

CDR2 de VH de Tremelimumab (SEQ ID NO: 29)

VIWYDGSNKYYADSV

5 **CDR3 de VH de Tremelimumab (SEQ ID NO: 30)**

DPRGATLYYYYYGMDV

CDR1 de VL de Tremelimumab (SEQ ID NO: 31)

RASQSINSYLD

CDR2 de VL de Tremelimumab (SEQ ID NO: 32)

10 AASSLQS

CDR3 de VL de Tremelimumab (SEQ ID NO: 33)

QQYYSTPFT

El término "anticuerpo", tal como se utiliza en esta divulgación, se refiere a una inmunoglobulina o un fragmento o derivado suyo, y engloba a cualquier polipéptido que comprende un sitio de unión al antígeno, independientemente de si se produce *in vitro* o *in vivo*. El término incluye, sin carácter limitante, anticuerpos policlonales, monoclonales, monoespecíficos, poliespecíficos, no específicos, humanizados, monocatenarios, quiméricos, sintéticos, recombinantes, híbridos, mutados e injertados. A menos que esté modificado por el término "intacto", tal como en "anticuerpos intactos", a efectos de esta divulgación el término "anticuerpo" también incluye fragmentos de anticuerpos tales como Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, dAb y otros fragmentos de anticuerpos que mantienen la función de unión al antígeno, es decir, la capacidad de unirse, por ejemplo, a CTLA-4 o PD-L1, específicamente. Normalmente, los fragmentos de este tipo comprenderían un dominio de unión al antígeno.

15
20
25
30

Las expresiones "dominio de unión al antígeno", "fragmento de unión al antígeno" y "fragmento de unión" se refieren a una parte de una molécula de anticuerpo que comprende los aminoácidos responsables de la unión
5 específica entre el anticuerpo y el antígeno. En algunos casos, cuando un antígeno es grande, el dominio de unión al antígeno puede unirse únicamente a una parte del antígeno. Una porción de la molécula antigénica que es responsable de las interacciones específicas con el dominio de unión al
10 antígeno se denomina "epítopo" o "determinante antigénico". Un dominio de unión al antígeno comprende normalmente una región variable de la cadena ligera del anticuerpo (V_L) y una región variable de la cadena pesada del anticuerpo (V_H), sin embargo, no es necesario que comprenda ambas. Por
15 ejemplo, un denominado fragmento de anticuerpo F_d está constituido únicamente por un dominio V_H , pero todavía conserva parte de la función de unión al antígeno del anticuerpo intacto.

Los fragmentos de unión al antígeno de un anticuerpo se
20 pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión incluyen F_{ab} , F_{ab}' , $F(ab')_2$, F_v y anticuerpos monocatenarios. Se entiende que un anticuerpo que no es un anticuerpo "biespecífico" o
25 "bifuncional" tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos. La digestión de anticuerpos con la enzima, papaína, da como resultado dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, conocidos también como fragmentos " F_{ab} ", y un fragmento " F_c ", que no tiene actividad de unión al
30 antígeno pero que es capaz de cristalizar. La digestión de los anticuerpos con la enzima, pepsina, da como resultado el

fragmento F(ab')₂ en el cual las dos ramas de la molécula de anticuerpo permanecen unidas y comprenden dos sitios de unión al antígeno. El fragmento F(ab')₂ tiene la capacidad de reticular el antígeno. El término "Fv" cuando se utiliza en la presente se refiere al fragmento mínimo de un anticuerpo que mantiene los sitios de reconocimiento del antígeno y de unión al antígeno. El término "Fab" cuando se utiliza en la presente se refiere a un fragmento de un anticuerpo que comprende el dominio constante de la cadena ligera y el dominio CHI de la cadena pesada.

El término "mAb" se refiere a un anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos de la invención comprenden, sin carácter limitante, anticuerpos nativos enteros, anticuerpos biespecíficos; anticuerpos quiméricos; Fab, Fab', fragmentos de la región V monocatenarios (scFv), polipéptidos de fusión y anticuerpos no convencionales.

En esta divulgación, los términos y expresiones "comprende", "que comprende", "que contiene" y "que tiene" y similares pueden tener el significado atribuido a ellos en la Ley de Patentes de EE. UU. y pueden significar "incluye", "que incluye" y similares; "que está constituido esencialmente por" o "constituido esencialmente", asimismo, tienen el significado atribuido en la Ley de Patentes de EE. UU. y la expresión es abierta, lo que permite la presencia de más de lo que se indica siempre que no se cambien las características básicas o novedosas de lo que se indica mediante la presencia de más de lo que se indica, pero excluye realizaciones de la técnica anterior.

Tal como se utilizan en la presente, los términos "determinación", "evaluación", "ensayo", "medición" y "detección" se refieren tanto a determinaciones

cuantitativas como cualitativas y, como tal, el término "determinación" se utiliza en la presente indistintamente con "ensayo" "medición" y similares. Cuando se pretende una determinación cuantitativa, se utiliza la frase

5 "determinación de una cantidad" de un analito y similares. Cuando se pretende una determinación cualitativa y/o cuantitativa, se utiliza las expresión "determinación de un nivel" de un analito o "detección" de un analito.

La expresión "dominio Fc", tal como se utiliza en la

10 presente, se refiere a una porción de una región constante de un anticuerpo. Tradicionalmente, la expresión "dominio Fc" se refiere a un producto de la escisión por acción de una proteasa (por ejemplo, papaína) que abarca las regiones apareadas CH2, CH3 y la región bisagra de un anticuerpo. En

15 el contexto de esta divulgación, la expresión "dominio Fc" o "Fc" se refiere a cualquier polipéptido (o ácido nucleico que codifica dicho polipéptido), independientemente del medio de producción, que incluye la totalidad o una porción de las regiones CH2, CH3 y bisagra de un polipéptido

20 inmunoglobulínico.

La expresión "polipéptido de fusión" o "proteína de fusión" se refiere a un polipéptido que comprende dos o más polipéptidos diferentes o sus fragmentos activos que no están presentes de manera natural en el mismo polipéptido. En

25 diversas realizaciones, los dos o más polipéptidos diferentes están ligados operablemente entre sí de manera covalente, por ejemplo, ligados o fusionados químicamente en fase mediante un enlace peptídico o un conector peptídico.

Los términos "idéntico" o "identidad" porcentual en el

30 contexto de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son

iguales o que tienen un porcentaje especificado de residuos de nucleótidos o aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y alinean (introduciendo huecos, si es necesario) para una correspondencia máxima, sin considerar ninguna de las sustituciones conservadoras de aminoácidos como parte de la identidad secuencial. La identidad porcentual se puede medir utilizando software o algoritmos de comparación de secuencias, o mediante inspección visual. En la técnica se conocen varios algoritmos y software que se pueden utilizar para obtener alineaciones de secuencias de aminoácidos o nucleótidos (remítase, por ejemplo, a Karlin *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:2264-2268, tal como se modifica en Karlin *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:5873-5877, y se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST (Altschul *et al.*, 1991, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402). En ciertas realizaciones, se puede utilizar Gapped BLAST, como se describe en Altschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. BLAST-2, WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, 1996, *Methods in Enzymology*, 266:460-480), ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, California) o Megalign (DNASTAR).

El término "aislado" se refiere a una molécula que está sustancialmente exenta de otros elementos presentes en su entorno natural. Por ejemplo, una proteína aislada está sustancialmente exenta de material celular u otras proteínas procedentes de la fuente tisular o celular de la que se deriva. El término "aislado" también se refiere a preparados donde la proteína aislada está lo suficientemente pura para administrarse como una composición farmacéutica, o al menos un 70-80% (p/p) pura, más preferentemente, al menos un 80-90% (p/p) pura, aún más preferentemente un 90-95% pura; y,

de la manera más preferente, al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o un 100% (p/p) pura.

El término "referencia" se refiere a un patrón de comparación.

5 La expresión "se une específicamente" se refiere a un agente (por ejemplo, CD40L) que reconoce y se une a una molécula (por ejemplo, un polipéptido de CD40), pero que no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica. Por ejemplo,
10 dos moléculas que se unen específicamente forman un complejo que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. La unión específica se caracteriza por una afinidad elevada y una capacidad entre baja y moderada lo que la distingue de la unión no específica que normalmente tiene una afinidad
15 baja con una capacidad entre moderada y elevada.

El término "sujeto" se refiere a un mamífero incluido, sin carácter limitante, un mamífero humano o no humano, tal como un animal bovino, equino, canino, ovino o felino.

Se entiende que los intervalos proporcionados en la
20 presente son abreviaciones de todos los valores dentro del intervalo. Por ejemplo, se entiende que un intervalo de 1 a 50 incluye cualquier número, combinación de números, o subintervalo del grupo constituido por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,
25 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50.

Tal como se utilizan en la presente, los términos y la expresión "tratar", "que trata", "tratamiento" y similares se refieren a reducir o aliviar un trastorno y/o los síntomas
30 relacionados con este. Se apreciará que, aunque no se excluya, tratar un trastorno o afección no requiere que el

trastorno, afección o síntomas relacionados con este sean eliminados por completo.

Salvo que se indique específicamente o sea obvio a partir del contexto, tal como se utiliza en la presente, se entiende que el término "o" es inclusivo. Salvo que se indique específicamente o sea obvio a partir del contexto, tal como se utilizan en la presente, se entiende que los términos "un", "uno/a", y "el/la" son singulares o plurales.

Además, "y/o" cuando se utiliza en la presente se debe tomar como la divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Así pues, se pretende que el término "y/o", tal como se utiliza en una frase tal como "A y/o B" de la presente, incluya "A y B", "A o B", "A" (solo) y "B" (solo). De modo similar, se pretende que el término "y/o", tal como se utiliza en una frase tal como "A, B y/o C", incluya cada una de las siguientes realizaciones: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

Salvo que se indique específicamente o sea obvio a partir del contexto, se debe entender que el término "aproximadamente", tal como se utiliza en la presente, es un intervalo de tolerancia normal en la técnica, por ejemplo, dentro de 2 desviaciones estándares de la media. Se puede entender que "aproximadamente" se refiere a estar dentro de un 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05% o un 0.01% del valor establecido. A menos que sea evidente a partir del contexto, todos los valores numéricos proporcionados en la presente se encuentran modificados por el término "aproximadamente".

La mención de una lista de grupos químicos en cualquier definición de una variable de la presente incluye las definiciones de esa variable como cualquier grupo único o combinación de grupos enumerados. La mención de una
5 realización para una variable o aspecto de la presente incluye esa realización como cualquier realización única o en combinación con cualesquiera otras realizaciones o sus porciones.

Cualesquiera composiciones o métodos proporcionados en
10 la presente se pueden combinar con una o más de cualquiera de las otras composiciones y métodos proporcionados en la presente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 muestra una representación esquemática de las
15 proteínas de fusión CD40L-Fc de la invención que comprenden secuencias de aminoácidos humanas. Tal como se muestra, MEDI5083 CD40L-FP comprende una fusión monocatenaria de 3 x subunidades de CD40L + Fc de IgG4P (148kDa), regiones conectoras 9-GlySer y el residuo 194 (Cys no emparejada)
20 mutado para el desarrollo. Conector entre las subunidades. SEQ ID NO: 2.

La FIG. 2 es una serie de cromatogramas representativos de cromatografía de alta resolución de exclusión por tamaño (HPSEC) que muestran los datos de estabilidad para scCD40L-
25 IgG4P-FP7, proteína de fusión CD40L-Fc, que comprende una sustitución C194W (respecto a la secuencia de aminoácidos de CD40L unida a la membrana completa) a 45 °C en el día 1 (superior izquierda), día 3 (superior derecha) y día 7 (inferior izquierda).

La FIG. 3 es un gráfico que muestra la bioactividad de la muestra de estabilidad de MEDI5083, según se mide con el ensayo de NFκB Luciferasa.

La FIG. 4 es un gráfico que muestra la evaluación de la bioactividad de CD40L-FP7 referenciada respecto a MEDI5083 y un control de isotipo de IgG4P humano en el modelo celular HuCD40 293 HEK NFκB c3.

La FIG. 5 es un gráfico que muestra la evaluación de la bioactividad de CD40L-FP7 referenciada respecto a MEDI5083 y un control de isotipo de IgG4P humano en el modelo celular de linfocitos T Ramos-Blue NFκB/AP-1.

La FIG. 6 es un gráfico que muestra que MEDI5083 estimuló la proliferación de linfocitos B primarios humanos.

La FIG. 7 es un conjunto de gráficos que muestran que MEDI5083 activó y maduró células dendríticas que proceden de monocitos humanos (MoDC, por sus siglas en inglés). Se mostró la activación mediante incrementos en los marcadores CD80 (superior izquierda), CD83 (superior centro) y CD86 (superior derecha). Se mostró la maduración mediante incrementos en los marcadores HLA-ABC (inferior izquierda) y HLA-DR (inferior centro).

La FIG. 8 es un conjunto de gráficos que muestran que MEDI5083 indujo una respuesta de citocinas/quimiocinas Th1 en células dendríticas que proceden de monocitos humanos (MoDC). Se muestran los incrementos en la secreción de IL12p70 (superior izquierda), IFNγ (superior centro), TNF-α (superior, derecha), IL-8 (inferior centro) e IL-10 (inferior derecha). No se observó incremento en la secreción de IL-1β (inferior izquierda).

La FIG. 9 es un conjunto de histogramas de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, por sus siglas

en inglés) que muestra que MEDI5083 impulsó la proliferación de linfocitos T mediante la activación y maduración de mDC en una manera dependiente de la dosis. Se monitorizó la proliferación *in vitro* de linfocitos humanos CD4+ (fila superior) y CD8+ (fila central) mediante citometría de flujo con dilución con el éster succinimidílico del diacetato de carboxifluoresceína (CFSE, por sus siglas en inglés).

La FIG. 10 es un conjunto de gráficos que muestran que MEDI5083 desplazó las proporciones de macrófagos supresores (M2):estimuladores (M1) hacia un fenotipo inmunoestimulador.

La FIG. 11 es un conjunto de gráficos que muestra la polarización de macrófagos M1/M2 que proceden de monocitos humanos.

La FIG. 12 es un gráfico que muestra que MEDI5083 es sumamente específico para CD40 humana.

La FIG. 13 es una serie de gráficos que muestran que la CD40L-FP sustituta de ratón tuvo una actividad antitumoral significativa en un modelo tumoral poco reactivo. En la izquierda se representan gráficamente los volúmenes tumorales promedio de cada grupo de tratamiento y en los gráficos de la derecha se representan gráficamente las respuestas de los ratones individuales.

La FIG. 14 es un gráfico que muestra la actividad antitumoral de CD40L-FP sustituta de ratón combinada con α -PD-L1 en un modelo tumoral B16-F10.

La FIG. 15 es una serie de gráficos que muestran la actividad antitumoral de CD40L-FP sustituta de ratón combinada con α -PD-L1 en un modelo tumoral B16-F10. Las respuestas de los ratones individuales se representan gráficamente en los gráficos.

La FIG. 16 es un gráfico que muestra la actividad antitumoral de CD40L-FP sustituta de ratón combinada con α -CTLA-4 en un modelo tumoral B16-F10.

La FIG. 17 es una serie de gráficos que muestran la actividad antitumoral de CD40L-FP sustituta de ratón combinada con α -CTLA-4 en un modelo tumoral B16-F10. Las respuestas de los ratones individuales se representan gráficamente en los gráficos.

La FIG. 18 es un gráfico que muestra que la CD40L-FP sustituta de ratón combinada con α -PD-L1 detuvo el crecimiento tumoral en un modelo tumoral B16-F10.

La FIG. 19 es una serie de gráficos que muestran la actividad antitumoral de CD40L-FP sustituta de ratón combinada con uno o más de α -PD-L1 y α -CTLA4.

La FIG. 20 es un gráfico que muestra la actividad antitumoral de CD40L-FP sustituta de ratón combinada con α -PD-1 en un modelo tumoral B16-F10.

La FIG. 21 es una serie de gráficos que muestran la actividad antitumoral de CD40L-FP sustituta de ratón combinada con α -PD-1 en un modelo tumoral B16-F10. Las respuestas de los ratones individuales se representan gráficamente en los gráficos.

La FIG. 22 es una serie de gráficos que muestran que la CD40L-FP sustituta de ratón indujo secreción de citocinas/quimiocinas séricas en un modelo tumoral B16-F10. Se observó incremento en los niveles de IFN γ (superior izquierda), TNF- α (superior derecha), IL12 (inferior izquierda) y KC/GRO (inferior derecha) 24 horas después de la 2.^a dosis (T1).

La FIG. 23 es una serie de gráficos que muestran que la CD40L-FP sustituta de ratón indujo secreción de

citocinas/quimiocinas séricas en un modelo tumoral B16-F10. Se observó incremento en los niveles de IFN γ (superior izquierda), TNF- α (superior derecha), IL12 (inferior izquierda) y KC/GRO (inferior derecha) 24 horas después de la 4.^a dosis (T2).

La FIG. 24 es una serie de gráficos que muestran que la CD40L-FP sustituta de ratón incrementó la activación de linfocitos T CD8⁺ y la expresión de PD-L1 intratumorales en ratones.

La FIG. 25 son gráficos que muestran que la CD40L-FP sustituta de ratón impulsó la activación de linfocitos B y maduración de células mieloides esplénicas en ratones.

La FIG. 26 es una serie de gráficos que muestran que la CD40L-FP sustituta de ratón indujo secreción de citocinas TH1 y quimiocinas CXCL-1 en ratones.

La FIG. 27 es una serie de gráficos que muestran los modelos farmacocinéticos y farmacodinámicos (PK-PD) para describir la activación y tráfico de linfocitos B después de una única dosis de MEDI5083 en monos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención presenta proteínas de fusión que comprenden tres subunidades del ligando de CD40 (CD40L) y un polipéptido de Fc (CD40L-Fc). En un aspecto, la proteína de fusión CD40L-Fc comprende una fusión monocatenaria de tres subunidades de ligandos de CD40 (CD40L) y un monómero de Fc ligado mediante conectores peptídicos. Se ha observado que los conectores peptídicos que tienen una longitud de 9 aminoácidos o más entre las subunidades de CD40L mantuvieron la estabilidad y/o no provocaron la agregación de tales proteínas de fusión. Esto contrasta con otros ligandos de la familia de TNF, que tienen tendencia a agregarse cuando están

ligados mediante conectores peptídicos con una longitud de más de 8 aminoácidos. Por lo tanto, la invención se basa al menos en parte en estos descubrimientos.

La presente invención también presenta composiciones y métodos que son útiles para tratar el cáncer que comprenden una proteína de fusión CD40L-Fc (por ejemplo, MEDI5083). En varias realizaciones, la proteína de fusión CD40L-Fc (por ejemplo, MEDI5083) se administra combinada con un inhibidor de puntos de control inmunitario, incluidos uno o más de un anticuerpo anti-CTLA-4 y/o un anticuerpo anti-PD-L1. Tal como se indica en la presente más adelante, el tratamiento con esos agentes redujo el volumen tumoral y/o retrasó el crecimiento tumoral en un modelo tumoral en ratones.

Proteínas de fusión CD40L-Fc

La invención proporciona proteínas de fusión CD40L-Fc que comprenden una fusión monocatenaria de tres subunidades de ligandos de CD40 (CD40L), o sus fragmentos, (scCD40L) ligadas covalentemente entre sí mediante conectores peptídicos y un monómero de Fc que está ligado covalentemente al scCD40L mediante un conector peptídico. En diversos aspectos, las tres subunidades de CD40L de la proteína de fusión se disponen de manera que el conector peptídico conecte el extremo C de una subunidad de CD40L con el extremo N de otra subunidad de CD40L. Por lo tanto, la proteína de fusión de la invención comprende una porción, del extremo N al extremo C, que comprende el extremo C de una primera subunidad de CD40L conectada al extremo N de una segunda subunidad de CD40L mediante un conector peptídico y el extremo C de la segunda subunidad de CD40L conectado al extremo N de una tercera subunidad de CD40L. En varias realizaciones, la fusión monocatenaria de las tres

subunidades de CD40L se conecta al polipéptido de Fc mediante un conector peptídico en el extremo C o extremo N. Es decir, el extremo N del extremo N del polipéptido de Fc se conecta al extremo C de la tercera subunidad de CD40L de la fusión monocatenaria de las tres subunidades de CD40L o el extremo C del polipéptido Fc se conecta al extremo N de la primera subunidad de CD40L de la fusión monocatenaria de las tres subunidades de CD40L.

CD40L (conocido también como CD154, ligando CD40, gp39 o TBAM) es una glicoproteína de membrana de tipo II de 33 kDa (Swiss-ProtAcc-No P29965). Además, existen formas solubles de CD40L inferiores a 18 kDa (también conocidas como sCD40L o CD40L soluble). Estas formas solubles de CD40L se generan mediante el procesamiento proteolítico de la proteína unida a la membrana, pero la actividad celular de las especies solubles es débil en ausencia de oligomerización de orden superior (por ejemplo, trimerización). CD40L se une y activa CD40. En varias realizaciones, una proteína de fusión CD40L-Fc comprende una región de tres subunidades de CD40L que se autoensambla en un trímero de CD40L. En un aspecto, la proteína de fusión CD40L-Fc se ensambla en una forma multimérica, capaz de unirse a CD40 y estimular al menos una actividad mediada por CD40. En varias realizaciones, una subunidad de CD40L tiene una secuencia de aminoácidos de CD40L humano. Homólogos de CD40L adicionales incluyen los de ratón, gallina, Rhesus, cinomolgo, rata y conejo. Las combinaciones de las subunidades de CD40L en la proteína de fusión CD40L-Fc pueden ser homoméricas o heteroméricas. En algunas realizaciones, las secuencias de aminoácidos de todas las subunidades de CD40L en la proteína de fusión CD40L-Fc son idénticas. En otras realizaciones,

las secuencias de aminoácidos de al menos dos de las subunidades de CD40L en la proteína de fusión CD40L-Fc son diferentes.

La proteína de fusión CD40L-Fc de la invención comprende
5 un trímero de CD40L fusionado a un dominio o fragmento de un anticuerpo (por ejemplo, una IgG), incluido, sin carácter limitante, un dominio Fc. En una realización específica, la proteína de fusión CD40L-Fc de la invención comprende un
10 trímero de CD40L fusionado a un dominio Fc. En algunas realizaciones, la proteína de fusión CD40L-Fc de la invención dimeriza mediante el dominio Fc. En ciertas realizaciones, el dominio Fc tiene la secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de IgG4P. Fc de IgG4P es un dominio cristalizabile gamma de un fragmento de IgG4 (Fcγ) que contiene una sustitución
15 de serina a prolina en la región bisagra en la posición 228 (de acuerdo con la numeración EU). La sustitución de serina a prolina en Fc de IgG4P promueve la estabilidad, confiere una formación de enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas completa y/o previene la recombinación del dímero mediante
20 el "intercambio de medio anticuerpo" (Nirula *et al.* (2011) *Curr. Opin. Rheumatol.* 23(1):119-124; .Aalberse *et al.* (2009) *Clin. Exp. Allergy* 39(4):469-477). En realizaciones particulares, la secuencia de aminoácidos del dominio Fc de IgG4P es una secuencia humana. En la técnica se sabe que las
25 variantes de la región Fc (por ejemplo, sustituciones y/o adiciones y/o deleciones de aminoácidos) mejoran o reducen la función efectora del anticuerpo. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, las proteínas de fusión CD40L-Fc de la invención comprenden un dominio Fc con una o más alteraciones
30 practicadas en la región Fc para cambiar propiedades funcionales de la proteína de fusión CD40L-Fc. En ciertas

realizaciones, las proteínas de fusión CD40L-Fc de la invención comprenden un dominio Fc con una o más alteraciones practicadas en la región Fc con el fin de reducir o eliminar al menos una función efectora mediada por FcγR.

5 En varios aspectos, la presente divulgación proporciona una proteína de fusión CD40L-Fc con un Fc de IgG4 que comprende al menos una modificación en una o más posiciones seleccionadas a partir del grupo constituido por 228 y 235 tal como se numera según el índice EU tal como se expone en
10 Kabat. En otro aspecto específico más, la región Fc es una región Fc de IgG4 y los aminoácidos variantes son uno o más de 228P, 235E y 235Y tal como se numera según el índice EU tal como se expone en Kabat.

 Las subunidades de CD40L y el polipéptido de Fc en las
15 proteínas de fusión CD40L-Fc de la invención están conectados mediante conectores polipeptídicos, donde cada conector se fusiona con al menos dos polipéptidos o subunidades. Las combinaciones de conectores en la proteína de fusión CD40L-Fc pueden ser homoméricas o heteroméricas. En algunas
20 realizaciones, las secuencias de aminoácidos de todos los conectores peptídicos presentes en una proteína de fusión CD40L-Fc de la invención son idénticas. En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos de al menos dos de los conectores peptídicos presentes en una proteína de
25 fusión CD40L-Fc de la invención son diferentes. El polipéptido conector debe tener una longitud, que sea adecuada para ligar dos o más subunidades monoméricas, de forma que asuman la conformación correcta entre sí para que retengan así la actividad deseada. En la bibliografía hay
30 constancia del uso de conectores peptídicos tanto artificiales como de origen natural para conectar

polipéptidos en polipéptidos de fusión ligados novedosos. Por consiguiente, los conectores que fusionan dos o más subunidades monoméricas son conectores naturales, conectores artificiales o combinaciones de estos.

5 Tal como se describe en la presente, se ha observado que los conectores peptídicos que tienen una longitud de 9 aminoácidos o más entre las subunidades de CD40L mantuvieron la estabilidad y/o no provocaron la agregación de tales proteínas de fusión. Por lo tanto, el conector polipeptídico
10 comprende de 9 a aproximadamente 20 residuos aminoacídicos, de 9 a aproximadamente 15 residuos aminoacídicos o 9 residuos aminoacídicos. Los residuos aminoacídicos seleccionados para su inclusión en el conector polipeptídico deben exhibir propiedades que no interfieran de forma significativa con la
15 actividad o función de la proteína de fusión CD40L-Fc de la invención. Por lo tanto, un conector polipeptídico no debe exhibir en general una carga que sea incompatible con la actividad o función de la proteína de fusión CD40L-Fc de la invención, ni interferir con el plegamiento interno, ni
20 formar enlaces u otras interacciones con residuos aminoacídicos en una o más subunidades monoméricas que impidieran seriamente la unión.

En varias realizaciones, un conector polipeptídico posee flexibilidad conformacional. Los conectores flexibles
25 adecuados incluyen los que tienen una combinación de residuos de Gly y Ser, donde la proporción de Gly respecto a Ser es ≥ 1 . En algunas realizaciones, una secuencia del conector polipeptídico comprende una secuencia de aminoácidos (G-G-G-G-X)_n (SEQ ID NO: 34) donde X es alanina (A), serina (S),
30 glicina (G), isoleucina (I), leucina (L) o valina (V) y n es un número entero positivo. En ciertas realizaciones, una

secuencia del conector polipeptídico comprende una secuencia de aminoácidos (G-G-G-S)_n (SEQ ID NO: 6), (G-G-G-G-S)_n (SEQ ID NO: 5), G(G-G-G-S)_n (SEQ ID NO: 7), (G-G-G-G-G)_n (SEQ ID NO: 35) o (G-G-G-G-A)_n (SEQ ID NO: 36), donde n es un número entero positivo. En algunas realizaciones, un conector polipeptídico es un polipéptido natural o artificial que intrínsecamente carece de estructura (remítase, por ejemplo, a Schellenberger *et al.*, *Nature Biotechnol.* 27:1186-1190, 2009; remítase también a Sickmeier *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 35:D786-93, 2007).

En ciertas realizaciones, el conector entre las subunidades de CD40L es (Gly₄Ser)_n (SEQ ID NO: 5), donde n es un número entero positivo seleccionado entre 2, 3 y 4; (Gly₃Ser)_n (SEQ ID NO: 6), donde n se selecciona entre 3, 4 y 5; Gly(Gly₃Ser)_n (SEQ ID NO: 7), donde n se selecciona entre 2, 3 y 4; o Gly(Gly₂Ser)_n (SEQ ID NO: 8), donde n se selecciona entre 3, 4, 5 y 6. En realizaciones particulares, el conector es GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 4) o GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 2).

En ciertas realizaciones, la proteína de fusión CD40L Fc contiene una fusión monocatenaria que incluye, del extremo N al extremo C, una primera subunidad de CD40L que tiene la secuencia de aminoácidos:

NPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIY
AQVTFCSNREASSQAPFIASLWLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFEL
QPGASVFNVTDPSPQVSHGTGFTSFGLLKL (SEQ ID NO: 1)

que se liga covalentemente a un primer conector peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos:

GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 2)

que se liga covalentemente a una segunda subunidad de CD40L que tiene la secuencia de aminoácidos:

QIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQ
VTFCNREASSQAPFIASLWLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQP
GASVFNVTDPSPQVSHGTGFTSFGLLKL (SEQ ID NO: 3)

que se liga covalentemente a un segundo conector
5 peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos:

GGGSGGGS (SEQ ID NO: 2)

que se liga covalentemente a una tercera subunidad de
CD40L que tiene la secuencia de aminoácidos:

QIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQ
10 VTFCNREASSQAPFIASLWLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQP
GASVFNVTDPSPQVSHGTGFTSFGLLKL (SEQ ID NO: 3)

que se liga covalentemente a un tercer conector
peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos:

GGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 4)

15 que se liga covalentemente a un polipéptido de Fc.

En realizaciones particulares, la proteína de fusión
CD40L Fc comprende o está constituida por una de las
siguientes secuencias de aminoácidos:

NPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIY
20 AQVTFCNREASSQAPFIASLWLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFEL
QPGASVFNVTDPSPQVSHGTGFTSFGLLKLGGGSGGGSQIAAHVISEASSKTTSVLQW
AEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCNREASSQAPFIASLWLKSPG
RFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPSPQVSHGTGFTSFGL
LKLGGGSGGGSQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQG
25 LYIYAQVTFCNREASSQAPFIASLWLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLG
GVFELQPGASVFNVTDPSPQVSHGTGFTSFGLLKLGGGSGGGSSESKYGPPCP
PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPRE
PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF
30 FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK; (SEQ ID NO: 9;
scCD40L-IgG4P-FP6; MEDI5083);

NPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIY
 AQVTFCSNREASSQAPFIASLWLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFEL
 QPGASVFNVTDPSPQVSHGTGFTSFGLLKLGGGSGGGGSGGGGSQIAAHVISEASSKT
 TSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASL
 5 WLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPSPQVSHGTG
 FTSFGLLKLGGGSGGGGSGGGGSQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTL
 ENKGQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLWLKSPGRFERILLRAANTHSS
 AKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPSPQVSHGTGFTSFGLLKLGGGSGGGGSGG
 GGSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQ
 10 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVQLHQLDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK;
 (SEQ ID NO: 10; scCD40L-IgG4P-FP7); o

DPQIAAHVVSEANSNAASVLQWAKKGYTMSNNLVMLENGKQLTVKREGLYYVY
 15 TQVTFCSNREPSSQRPFIVGLWLKPSSGSERILLKAANTHSSSQLCEQQSVHLGGVFEL
 QAGASVFNVTESQVIHRVGFSSFGLLKLGGGSGGGGSQIAAHVVSEANSNAASVLQWAK
 KGYTMSNNLVMLENGKQLTVKREGLYYVYTQVTFCSNREPSSQRPFIVGLWLKPSSGS
 ERILLKAANTHSSSQLCEQQSVHLGGVFELQAGASVFNVTESQVIHRVGFSSFGLLKL
 LGGGSGGSQIAAHVVSEANSNAASVLQWAKKGYTMSNNLVMLENGKQLTVKREGLYYV
 20 YTQVTFCSNREPSSQRPFIVGLWLKPSSGSERILLKAANTHSSSQLCEQQSVHLGGVFE
 LQAGASVFNVTESQVIHRVGFSSFGLLKLGGGSGGGGSGGGGSVPRDCGCKPCICT
 VPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCTVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPR
 EEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTI
 PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKL
 25 NVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK (SEQ ID NO: 11; el
 sustituto murino Fc de IgG1 D265A de ratón, similar a FP5).

Terapia antitumoral

En la presente se proporcionan métodos para tratar el
 cáncer, que comprenden la administración de la proteína de
 30 fusión CD40L-Fc (por ejemplo, MEDI5083) sola o combinada con
 un inhibidor de puntos de control inmunitario (por ejemplo,

un anticuerpo anti-CTLA4, anticuerpo anti-PD-L1 y/o anticuerpo anti-PD-1 o fragmentos de unión al antígeno de estos). Tal como se muestra en la presente, la administración de la proteína de fusión CD40L-Fc (por ejemplo, MEDI5083) sola o combinada con un anticuerpo anti-CTLA4, anticuerpo anti-PD-L1 y/o anticuerpo anti-PD-1 dio como resultado una reducción en el volumen tumoral en un modelo tumoral en ratones. En ciertos aspectos, a un paciente que presenta un tumor sólido se le administra la proteína de fusión CD40L-Fc (por ejemplo, MEDI5083) sola o combinada con un anticuerpo anti-CTLA4, anticuerpo anti-PD-L1 y/o anticuerpo anti-PD-1.

El tratamiento con la terapia para el cáncer incluye una proteína de fusión CD40L-Fc (por ejemplo, MEDI5083) sola o combinada con un anticuerpo anti-CTLA4, anticuerpo anti-PD-L1 y/o anticuerpo anti-PD-1 e incluye, por ejemplo, reducir la velocidad de evolución del cáncer, retrasar o estabilizar el crecimiento tumoral, reducción tumoral y/o regresión tumoral. En algunos aspectos la reducción o el retraso del crecimiento tumoral puede ser estadísticamente significativo. Se puede medir una reducción en el crecimiento tumoral mediante comparación con el crecimiento inicial del tumor del paciente, respecto a un crecimiento tumoral esperado, respecto a un crecimiento tumoral esperado basándose en una gran población de pacientes o respecto al crecimiento tumoral de una población de control. En otras realizaciones, los métodos de la invención aumentan la supervivencia.

La respuesta clínica a la administración de una terapia contra el cáncer se puede evaluar utilizando técnicas de diagnóstico conocidas por los médicos, incluidos sin carácter limitante exploración mediante obtención de

imágenes por resonancia magnética (MRI, por sus siglas en inglés), obtención de imágenes radiográficas por rayos x, exploración tomográfica computarizada (CT, por sus siglas en inglés), análisis por citometría de flujo o clasificador de
5 células activadas por fluorescencia (FACS) o citometría de flujo, histología, patología macroscópica y química sanguínea, incluidos sin carácter limitante cambios detectables por ELISA, RIA y cromatografía.

Rutas moduladoras de linfocitos T

10 Cada vez hay más pruebas de que los linfocitos T controlan el crecimiento y la supervivencia tumoral en pacientes con cáncer, tanto en los estadios tempranos como tardíos de la enfermedad. Sin embargo, las respuestas de linfocitos T específicos de tumores son difíciles de
15 establecer y mantener en los pacientes con cáncer.

Las rutas moduladoras de linfocitos T que están recibiendo una atención significativa señalizan a través del antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4, CD152) y del
20 ligando 1 de muerte programada (PD-L1, también conocido como B7H-1 o CD274).

CTLA-4 se expresa en linfocitos T activados y sirve como coinhibidor para mantener controlada las respuestas de linfocitos T después de la activación de linfocitos T mediada por CD28. Se cree que CTLA-4 regula la amplitud de la
25 activación temprana de los linfocitos T no expuestos previamente al antígeno y de memoria después del acoplamiento del TCR y que forma parte de una ruta inhibidora central que afecta tanto a la inmunidad antitumoral como a la autoinmunidad. CTLA-4 se expresa en los linfocitos T y la
30 expresión de sus ligandos, CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2), está en gran medida restringida a células presentadoras de

antígenos, linfocitos T y otras células mediadoras inmunitarias. Se ha señalado que los anticuerpos antagonistas anti-CTLA-4 que bloquean la ruta de señalización de CTLA-4 potencian la activación de linfocitos T. Uno de estos anticuerpos, ipilimumab, fue aprobado por la FDA en 2011 para el tratamiento del melanoma metastásico. Otro anticuerpo anti-CTLA-4, tremelimumab, se probó en ensayos de fase III para el tratamiento del melanoma avanzado, pero no aumentó significativamente la supervivencia global de los pacientes en comparación con el tratamiento de referencia (temozolomida o dacarbazina) en ese momento.

PD-L1 también forma parte de un sistema complejo de receptores y ligandos que están implicados en el control de la activación de linfocitos T. En tejidos normales, PD-L1 se expresa en linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas, macrófagos, células madre mesenquimatosas, mastocitos derivados de médula ósea así como diversas células no hematopoyéticas. Su función normal es regular el equilibrio entre la activación de linfocitos T y la tolerancia mediante la interacción con sus dos receptores: muerte programada 1 (también conocido como PD-1 o CD279) y CD80 (también conocido como B7-1 o B7.1). PD-L1 también es expresado por tumores y actúa en múltiples sitios para ayudar a los tumores a evitar la detección y eliminación por el sistema inmunitario del hospedador. PD-L1 se expresa en una gran variedad de cánceres con una frecuencia elevada. En algunos cánceres, se ha asociado la expresión de PD-L1 con una supervivencia reducida y con un pronóstico desfavorable. Los anticuerpos que bloquean la interacción entre PD-L1 y sus receptores (por ejemplo, PD-1) son capaces de aliviar los efectos

inmunosupresores dependientes de PD-L1 y potencian la actividad citotóxica de los linfocitos T antitumorales *in vitro*.

CD40L es un miembro de la familia de moléculas TNF que se expresa principalmente en linfocitos T activados (incluidos los subtipos Th0, Th1 y Th2) y forma homotrímeros al igual que otros miembros de esta familia. Además, también se ha descubierto que CD40L se expresa en mastocitos, y basófilos y eosinófilos activados. CD40L se une al receptor de CD40 en células presentadoras de antígeno (APC), lo cual produce muchos efectos dependiendo del tipo de célula diana. En general, CD40L desempeña la función de una molécula coestimuladora e induce la activación en APC junto con la estimulación de los receptores de los linfocitos T por parte de las moléculas MHC sobre las APC.

La señalización a través del receptor CD40 por parte de CD40L inicia la cascada de eventos que provocan la activación de las células portadoras de CD40 y la sensibilización óptima de los linfocitos T. Más específicamente, la interacción análoga entre CD40L y CD40 fomenta la diferenciación de los linfocitos B en células secretoras de anticuerpos y linfocitos B de memoria (Burkly, en Adv. Exp. Med. Bio., Vol. 489., D. M. Monroe, U. Hedner, M. R. Hoffman, C. Negrier, G. F. Savidge y G. C. I. White, eds. Klower Academic/Plenum Publishers, 2001, pág. 135). Además, la interacción entre CD40L y el CD40 fomenta la inmunidad mediada por células mediante la activación de macrófagos y células dendríticas, y la generación de linfocitos citolíticos naturales y linfocitos T citotóxicos (remítase a Burkly, citado anteriormente).

Proteínas de fusión Fc monocatenarias

Las proteínas de fusión CD40L Fc monocatenarias de la invención demostraron estabilidad y bioactividad. Tal como se describe en la presente, la estabilidad y actividad de CD40L se debió al menos en parte a la longitud de los conectores utilizados en las proteínas de fusión CD40L Fc de la invención. Esto fue sorprendente e inesperado, ya que se habían generado otras proteínas de fusión Fc con un ligando TNF, pero tendían a agregarse cuando se utilizaban conectores peptídicos con una longitud de más de 8 aminoácidos. Las proteínas de fusión CD40L Fc de la invención también proporcionan otras características y ventajas de las proteínas Fc monocatenarias.

Se sabe que los miembros de tipo citocinas solubles de origen natural de la familia de ligandos TNF muestran su bioactividad como homotrímeros. Sin embargo, los complejos triméricos de los ligandos TNF tienden a desnaturalizarse mediante la disociación de sus monómeros y son difíciles de preparar a partir de las unidades monoméricas recombinantes. Para prevenir la disociación de los homotrímeros en monómeros se ligan covalentemente entre sí al menos tres monómeros de un ligando TNF a través de sus extremos C y extremos N mediante conectores peptídicos para formar una molécula "monocatenaria (sc, por sus siglas en inglés)". Por lo tanto, la totalidad de la molécula (al menos tres monómeros de un miembro de la familia de ligandos TNF con los dos conectores peptídicos) está constituida por una única hebra proteica, de manera que ya no se puede producir la disociación en los monómeros.

Además, la fusión del ligando TNF a un dominio Fc, como en las proteínas de fusión monocatenarias de la invención,

se puede utilizar para obtener trímeros de dimerización. La dimerización de los dominios solubles se consigue mediante el ensamblaje de dos dominios Fc mediante puentes disulfuro. El enriquecimiento local de ligandos TNF monocatenarios en
5 células o células adyacentes tiene el potencial de aumentar la bioactividad de estas proteínas de fusión.

Anticuerpos anti-PD-L1

Durvalumab (MEDI4736) en un anticuerpo anti-PD-L1 ilustrativo que es selectivo para PD-L1 y bloquea la unión
10 de PD-L1 a los receptores PD-1 y CD80. Durvalumab puede aliviar la supresión mediada por PD-L1 de la activación de linfocitos T humanos *in vitro* e inhibe el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto mediante un mecanismo dependiente de linfocitos T.

15 La información referente a durvalumab (o sus fragmentos) para su uso en los métodos proporcionados en la presente se puede consultar en la Patente de EE. UU. N.º 8 779 108, cuya divulgación se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad. El dominio del fragmento
20 cristalizable (Fc) de durvalumab contiene una triple mutación en el dominio constante de la cadena pesada de IgG1 que reduce la unión al componente C1q del complemento y a los receptores de Fcγ responsables de mediar la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, por
25 sus siglas en inglés).

Durvalumab y sus fragmentos de unión al antígeno para su uso en los métodos proporcionados en la presente comprenden una cadena pesada y una cadena ligera o una región
variable de la cadena pesada y una región variable de la
30 cadena ligera. En un aspecto específico, durvalumab o un fragmento de unión al antígeno suyo para su uso en los

métodos proporcionados en la presente comprende una región variable de la cadena ligera y una región variable de la cadena pesada. En un aspecto específico, durvalumab o un fragmento de unión al antígeno suyo para su uso en los métodos proporcionados en la presente comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, donde la región variable de la cadena pesada comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 definidas por Kabat mostradas anteriormente en la presente, y donde la región variable de la cadena ligera comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 definidas por Kabat mostradas anteriormente en la presente. Los expertos en la técnica serán capaces de identificar fácilmente las CDR definidas por Chothia, definidas por Abm o de otro tipo conocidas por los expertos en la técnica. En un aspecto específico, durvalumab o un fragmento de unión al antígeno suyo para su uso en los métodos proporcionados en la presente comprende las secuencias CDR de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable del anticuerpo 2.14H9OPT tal como se divulga en la Patente de EE. UU. N.º 8 779 108, que se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad.

Anticuerpos anti-CTLA-4

Los anticuerpos que se unen específicamente a CTLA-4 e inhiben la actividad de CTLA-4 son útiles para potenciar una respuesta inmunitaria antitumoral. La información referente a tremelimumab (o sus fragmentos de unión al antígeno) para su uso en los métodos proporcionados en la presente se puede consultar en el documento US 6 682 736 (donde se cita como 11.2.1), cuya divulgación se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad. Tremelimumab (también conocido como CP-675,206, CP-675, CP-675206 y ticilimumab)

es un anticuerpo monoclonal de IgG₂ humano que es sumamente selectivo para CTLA-4 y bloquea la unión de CTLA-4 a CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2). Se ha demostrado que da como resultado una activación inmunitaria *in vitro* y algunos pacientes
5 tratados con tremelimumab han mostrado regresión tumoral.

Tremelimumab para su uso en los métodos proporcionados en la presente comprende una cadena pesada y una cadena ligera o una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera. En un aspecto específico,
10 tremelimumab o un fragmento de unión al antígeno suyo para su uso en los métodos proporcionados en la presente comprende una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos mostradas anteriormente en la presente y una región variable de la cadena pesada que
15 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada anteriormente en la presente. En un aspecto específico, tremelimumab o un fragmento de unión al antígeno suyo para su uso en los métodos proporcionados en la presente comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la
20 cadena ligera, donde la región variable de la cadena pesada comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 definidas por Kabat mostradas anteriormente en la presente, y donde la región variable de la cadena ligera comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 definidas por Kabat mostradas
25 anteriormente en la presente. Los expertos en la técnica serán capaces de identificar fácilmente las CDR definidas por Chothia, definidas por Abm o de otro tipo conocidas por los expertos en la técnica. En un aspecto específico, tremelimumab o un fragmento de unión al antígeno suyo para
30 su uso en los métodos proporcionados en la presente comprende las secuencias de CDR de la cadena pesada variable y de la

cadena ligera variable del anticuerpo 11.2.1 tal como se divulga en el documento US 6 682 736, que se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad.

Se describen otros anticuerpos anti-CTLA-4, por ejemplo, en el documento US 20070243184. En una realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 es Ipilimumab, también denominado MDX-010; BMS-734016.

Anticuerpos

Los anticuerpos que se unen selectivamente a CTLA-4 y PD-L1, e inhiben la unión o activación de CTLA-4 y PD-L1 son útiles en los métodos de la invención.

En general, se pueden generar anticuerpos, por ejemplo, utilizando técnicas de hibridoma tradicionales (Kohler y Milstein (1975) *Nature*, 256: 495-499), métodos de ADN recombinante (Pat. de EE. UU. N.º 4 816 567) o presentación en fagos realizada con colecciones de anticuerpos (Clackson *et al.* (1991) *Nature*, 352: 624-628; Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597). Para otras técnicas de producción de anticuerpos, remítase también a Antibodies: A Laboratory Manual, eds. Harlow *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. La invención no se limita a ninguna fuente, especie de origen o método de producción particular.

Los anticuerpos intactos, también conocidos como inmunoglobulinas, son normalmente proteínas glicosiladas tetraméricas compuestas por dos cadenas ligeras (L) de aproximadamente 25 kDa cada una y dos cadenas pesadas (H) de aproximadamente 50 kDa cada una. En los anticuerpos se observan dos tipos de cadena ligera, designadas como cadena λ y cadena κ . Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a cinco clases principales: A, D, E, G y

M, y varias de estas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

Las estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien en la técnica. Para un artículo de revisión de la estructura de un anticuerpo, remítase a Harlow *et al.*, citado anteriormente. Resumiendo, cada cadena ligera se compone de un dominio variable N-terminal (VL) y un dominio constante (CL). Cada cadena pesada se compone de un dominio variable N-terminal (VH), tres o cuatro dominios constantes (CH) y una región bisagra. El dominio CH más proximal a VH se designa como CH1. Los dominios VH y VL están constituidos por cuatro regiones de secuencia relativamente conservada denominadas regiones de armazón (FR1, FR2, FR3 y FR4), que forman un esqueleto para tres regiones de secuencia hipervariable denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Las CDR contienen la mayoría de los residuos responsables de interacciones específicas con el antígeno. Las tres CDR se denominan CDR1, CDR2 y CDR3. Los componentes de CDR en la cadena pesada se denominan H1, H2 y H3, mientras que los componentes de CDR en la cadena ligera se denominan, en consecuencia, L1, L2 y L3. CDR3 y, particularmente H3, son la mayor fuente de diversidad molecular dentro del dominio de unión al antígeno. H3, por ejemplo, puede ser de tan solo dos residuos aminoacídicos o de más de 26.

El fragmento Fab (fragmento de unión al antígeno) está constituido por los dominios VH-CH1 y VL-CL ligados covalentemente por un enlace disulfuro entre las regiones constantes. Para superar la tendencia de los dominios VH y VL ligados de manera no covalente en el Fv a disociarse

cuando se expresan conjuntamente en una célula hospedadora, se puede construir un denominado fragmento Fv monocatenario (scFv). En un scFv, un polipéptido flexible y adecuadamente largo liga el extremo C del VH al extremo N del VL o bien el extremo C del VL al extremo N del VH. De la manera más común, se utiliza un péptido de 15 residuos (Gly4Ser)₃ como conector, pero también se conocen otros conectores en la técnica.

La diversidad de anticuerpos es el resultado del ensamblaje combinatorio de múltiples genes de la línea germinal que codifican regiones variables y una variedad de eventos somáticos. Los eventos somáticos incluyen recombinación de segmentos génicos variables con segmentos génicos de diversidad (D) y unión (J) para generar una región VH completa y la recombinación de segmentos génicos variables y de unión para generar una región VL completa. El propio procedimiento de recombinación es impreciso, y da como resultado la pérdida o adición de aminoácidos en las uniones V(D)J. Estos mecanismos de diversidad se producen en los linfocitos B en desarrollo antes de la exposición al antígeno. Tras la estimulación antigénica, los genes de anticuerpos expresados en linfocitos B experimentan mutación somática.

Basándose en el número estimado de segmentos génicos de la línea germinal, la recombinación aleatoria de estos segmentos y el apareamiento VH-VL aleatorio, pudieron producirse hasta 1.6×10^7 anticuerpos diferentes (Fundamental Immunology, 3.^a ed., ed. Paul, Raven Press, Nueva York, N.Y., 1993). Cuando se tienen en cuenta otros procesos que contribuyen a la diversidad de anticuerpos (tales como la mutación somática), se cree que podrían generarse

potencialmente más de 1×10^{10} anticuerpos diferentes (Immunoglobulin Genes, 2.^a ed., eds. Jonio *et al.*, Academic Press, San Diego, Calif., 1995). Debido a los muchos procesos implicados en la diversidad de anticuerpos, es altamente improbable que los anticuerpos generados independientemente tengan secuencias de aminoácidos idénticas o incluso sustancialmente similares en las CDR.

En la presente se proporcionan las secuencias de las CDR de los anticuerpos anti-CTLA-4 y anti-PD-L1 ilustrativos. La estructura para portar una CDR será generalmente una cadena pesada o ligera de anticuerpo o una porción suya, en la que la CDR se sitúa en una ubicación correspondiente a la CDR de la VH y VL de origen natural. Las estructuras y ubicaciones de dominios variables de inmunoglobulinas se pueden determinar, por ejemplo, tal como se describe en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, N.º 91-3242, National Institutes of Health Publications, Bethesda, Md., 1991.

Los anticuerpos de la invención (por ejemplo, anti-CTLA-4 y anti-PD-L1) pueden comprender opcionalmente regiones constantes de anticuerpos o sus partes. Por ejemplo, un dominio VL puede tener unido, en su extremo C, dominios constantes de la cadena ligera de anticuerpos incluidas cadenas C κ o C λ humanas. De manera similar, un dominio de unión al antígeno específico basado en un dominio VH puede tener unida toda o parte de una cadena pesada de inmunoglobulina derivada de un isotipo de anticuerpo, por ejemplo, IgG, IgA, IgE e IgM y cualquiera de las subclases isotópicas, que incluyen, sin carácter limitante, IgG1 e IgG4.

Un experto en la técnica reconocerá que los anticuerpos de esta invención se pueden utilizar para detectar, medir e inhibir proteínas que difieren algo de CTLA-4 y PD-L1. Se espera que los anticuerpos conserven la especificidad de unión siempre que la proteína diana comprenda una secuencia que sea idéntica en al menos aproximadamente un 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más a cualquier secuencia de al menos 100, 80, 60, 40 o 20 de aminoácidos contiguos descritos en la presente. El porcentaje de identidad se determina mediante algoritmos de alineación estándar tales como, por ejemplo, Basic Local Alignment Tool (BLAST) descrito en Altshul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410, el algoritmo de Needleman *et al.* (1970) *J. Mol. Biol.*, 48: 444-453, o el algoritmo de Meyers *et al.* (1988) *Comput. Appl. Biosci.*, 4: 11-17.

Además de los análisis de homología de secuencia, se pueden llevar a cabo un cartografiado de epítomos (remítase, por ejemplo, a Epitope Mapping Protocols, ed. Morris, Humana Press, 1996) y análisis de la estructura secundaria y terciaria para identificar estructuras 3D específicas que asumen los anticuerpos divulgados y sus complejos con antígenos. Tales métodos incluyen, sin carácter limitante, cristalografía por rayos X (Engstom (1974) *Biochem. Exp. Biol.*, 11:7-13) y modelización computarizada de representaciones visuales de los anticuerpos divulgados en la presente (Fletterick *et al.* (1986) Computer Graphics and Molecular Modeling, en Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.).

Derivados

Los polipéptidos (por ejemplo, CD40L) y anticuerpos de la invención (por ejemplo, anti-CTLA-4 y anti-PD-L1) pueden incluir variantes de estas secuencias que conservan la capacidad de unirse de manera específica a sus dianas. Tales variantes pueden ser obtenidas a partir de la secuencia de estos polipéptidos o anticuerpos por un experto utilizando técnicas de uso común en la técnica. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en las FR y/o en las CDR. Mientras que los cambios en las FR se diseñan habitualmente para mejorar la estabilidad e inmunogenicidad del anticuerpo, los cambios en las CDR se diseñan normalmente para aumentar la afinidad del anticuerpo por su diana. Las variantes de FR también incluyen alotipos de inmunoglobulinas de origen natural. Tales cambios que aumentan la afinidad se pueden determinar empíricamente mediante técnicas habituales que conllevan alterar la CDR y estudiar la afinidad del anticuerpo por su diana. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones conservadoras de aminoácidos en cualquiera de las CDR divulgadas. Se pueden realizar diversas alteraciones según los métodos descritos en Antibody Engineering, 2.^a ed., Oxford University Press, ed. Borrebaeck, 1995. Estas incluyen, sin carácter limitante, secuencias de nucleótidos que se alteran mediante la sustitución de diferentes codones que codifican un residuo aminoacídico equivalente desde un punto de vista funcional en la secuencia, para producir de esta manera un cambio "silencioso". Por ejemplo, los aminoácidos no polares incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina,

serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos con carga positiva (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos con carga negativa (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.

Se pueden producir derivados y análogos de polipéptidos y/o anticuerpos de la invención mediante diversas técnicas muy conocidas en la materia, incluidos métodos de síntesis y recombinantes (Maniatis (1990) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., y Bodansky *et al.* (1995) *The Practice of Peptide Synthesis*, 2.^a ed., Springer Verlag, Berlín, Alemania).

En una realización, un método para preparar un dominio VH que es una variante de la secuencia de aminoácidos de un dominio VH de la invención comprende un paso de añadir, eliminar, sustituir o insertar uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del dominio VH divulgado en la presente, combinar opcionalmente el dominio VH obtenido de esta manera con uno o más dominios VL, y estudiar el dominio VH o la combinación o combinaciones de VH/VL para detectar una unión específica al antígeno. Se puede emplear un método análogo en el que una o más variantes de la secuencia de un dominio VL divulgadas en la presente se combinan con uno o más dominios VH.

También se divulgan técnicas combinatorias o de reordenamiento análogas en Stemmer (*Nature* (1994) 370: 389-391), que describe la técnica en relación con un gen de β -lactamasa pero observa que el enfoque se puede utilizar para la generación de anticuerpos.

En realizaciones adicionales, se pueden generar regiones VH o VL novedosas que portan una o más secuencias que se obtienen de las secuencias divulgadas en la presente utilizando mutagénesis aleatoria de uno o más genes de VH y/o VL seleccionados. Se describe una técnica de este tipo, PCR propensa a errores, en Gram *et al.* (*Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* (1992) 89: 3576-3580).

Otro método que se puede utilizar es la mutagénesis dirigida a las CDR de los genes VH o VL. Se divulgan técnicas de este tipo en Barbas *et al.* (*Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* (1994) 91: 3809-3813) y Schier *et al.* (*J. Mol. Biol.* (1996) 263: 551-567).

De manera similar, se pueden injertar una o más, o las tres CDR en un repertorio de dominios VH o VL, que se examinan a continuación para detectar un fragmento de unión al antígeno específico para CTLA-4 o PD-L1.

Una porción de un dominio variable de inmunoglobulina comprenderá al menos una de las CDR sustancialmente tal como se exponen en la presente y, opcionalmente, regiones de armazón intermedias de los fragmentos scFv tal como se exponen en la presente. La porción puede incluir al menos aproximadamente un 50% de cualquiera de FR1 y FR4, o ambas, donde el 50% es un 50% del extremo C de FR1 y un 50% del extremo N de FR4. Los residuos adicionales en el extremo N o el extremo C de la parte sustancial del dominio variable pueden ser aquellos que normalmente no se asocian con regiones del dominio variable de origen natural. Por ejemplo, la construcción de anticuerpos por técnicas de ADN recombinante puede dar como resultado la introducción de residuos del extremo N o C codificados por conectores introducidos para facilitar la clonación u otros pasos de

manipulación. Otros pasos de manipulación incluyen la introducción de conectores para unir dominios variables a secuencias proteicas adicionales que incluyen regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina, otros dominios variables (por ejemplo, en la producción de diacuerpos), o marcas proteináceas tal como se analiza en mayor detalle a continuación.

Un experto reconocerá que los anticuerpos de la invención pueden comprender fragmentos de unión al antígeno que contienen únicamente una única CDR del dominio VL o VH. Se puede utilizar uno cualquiera de los dominios de unión específica monocatenarios para detectar dominios complementarios capaces de formar un fragmento de unión al antígeno específico de dos dominios que sea capaz, por ejemplo, de unirse a CTLA-4 y PD-L1.

Los anticuerpos de la invención (por ejemplo, anti-CTLA-4 y/o anti-PD-L1) descritos en la presente se pueden ligar a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (albúmina, otro anticuerpo, etc.). Por ejemplo, los anticuerpos se pueden ligar mediante reticulación química o mediante métodos recombinantes. Los anticuerpos también se pueden ligar a uno de varios polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, en la manera expuesta en las Pat. de EE. UU. N.^{os} 4 640 835; 4 496 689; 4 301 144; 4 670 417; 4 791 192; o 4 179 337. Los anticuerpos se pueden modificar químicamente mediante conjugación covalente a un polímero, por ejemplo, para incrementar su semivida de circulación. También se muestran polímeros y métodos ilustrativos para unirlos en las Pat. de EE. UU. N.^{os} 4 766 106; 4 179 337; 4 495 285 y 4 609 546.

Los anticuerpos divulgados también se pueden alterar para que tengan un patrón de glicosilación que difiera del patrón nativo. Por ejemplo, se pueden eliminar uno o más restos de carbohidratos y/o añadir uno o más sitios de glicosilación al anticuerpo original. La adición de sitios de glicosilación a los anticuerpos divulgados en la presente se puede lograr alterando la secuencia de aminoácidos para que contenga secuencias consenso de sitios de glicosilación conocidas en la técnica. Otro medio de aumentar el número de restos de carbohidratos en los anticuerpos es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos a los residuos aminoacídicos del anticuerpo. Tales métodos se describen en el documento WO 87/05330 y en Aplin *et al.* (1981) *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 22: 259-306. La eliminación de cualquier resto de carbohidratos de los anticuerpos se puede lograr química o enzimáticamente, por ejemplo, tal como se describe en Hakimuddin *et al.* (1987) *Arch. Biochem. Biophys.*, 259: 52; y Edge *et al.* (1981) *Anal. Biochem.*, 118: 131 y en Thotakura *et al.* (1987) *Meth. Enzymol.*, 138: 350.

Los anticuerpos también se pueden etiquetar con una marca detectable o funcional. Las marcas detectables incluyen radiomarcas tales como ¹³¹I o ⁹⁹Tc, que también se pueden unir a anticuerpos utilizando química convencional. Las marcas detectables también incluyen marcas enzimáticas tales como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. Las marcas detectables incluyen además restos químicos tales como biotina, que se pueden detectar por medio de la unión a un resto detectable análogo específico, por ejemplo, avidina marcada.

Los anticuerpos, en los que las secuencias de CDR difieren solo de manera insustancial de las expuestas en la

presente están englobados en el alcance de esta invención. Normalmente, se sustituye un aminoácido por un aminoácido relacionado que tiene características similares de carga, hidrofobicidad o estereoquímica. Tales sustituciones estarían dentro de las competencias habituales de un experto. A diferencia de las CDR, se pueden realizar cambios más sustanciales en las FR sin afectar de manera adversa a las propiedades de unión de un anticuerpo. Los cambios en las FR incluyen, sin carácter limitante, humanizar un derivado no humano o modificar ciertos residuos de armazón que son importantes para el contacto con el antígeno o para estabilizar el sitio de unión, por ejemplo, cambiar la clase o subclase de la región constante, cambiar residuos aminoacídicos específicos que podrían alterar la función efectora tal como la unión al receptor de Fc, por ejemplo, tal como se describe en las Pat. de EE. UU. N.ºs 5 624 821 y 5 648 260 y Lund *et al.* (1991) *J. Immun.* 147: 2657-2662 y Morgan *et al.* (1995) *Immunology* 86: 319-324, o cambiar la especie de la que se obtiene la región constante.

Un experto en la técnica apreciará que las modificaciones descritas anteriormente no son completamente exhaustivas, y que muchas otras modificaciones serían obvias para un experto tras la lectura del contenido de la presente divulgación.

Coterapia

El tratamiento de un paciente con un tumor sólido utilizando una combinación de la invención, tal como una proteína de fusión CD40L-Fc sola o combinada con un inhibidor de puntos de control inmunitario (por ejemplo, un anticuerpo anti-CTLA4, anticuerpo anti-PD-L1 y/o anticuerpo anti-PD-1 o sus fragmentos de unión al antígeno), tal como se

proporciona en la presente puede dar como resultado un efecto aditivo o sinérgico. Tal como se utiliza en la presente, el término "sinérgico" se refiere a una combinación de terapias (por ejemplo, una combinación de una proteína de fusión CD40L-Fc, anticuerpo anti-CTLA-4 y anticuerpo anti-PD-L1).

En algunas realizaciones, un efecto sinérgico de una combinación de terapias (por ejemplo, una combinación de una proteína de fusión CD40L-Fc, anticuerpo anti-CTLA-4 y anticuerpo anti-PD-L1) puede permitir utilizar dosificaciones inferiores de uno o más de los agentes terapéuticos y/o una administración menos frecuente de dichos agentes terapéuticos a un paciente con un tumor sólido. Por ejemplo, la capacidad de utilizar dosificaciones inferiores de agentes terapéuticos y/o de administrar dichas terapias con menor frecuencia tiene el potencial de reducir la toxicidad asociada con la administración de dichas terapias a un sujeto sin reducir la eficacia de dichas terapias en el tratamiento de un tumor sólido.

En la coterapia, una combinación de una proteína de fusión CD40L-Fc, anticuerpo anti-CTLA-4 y anticuerpo anti-PD-L1 se puede administrar conjuntamente en una administración en una o más administraciones separadas. Además, un efecto sinérgico puede dar como resultado una mejora de la eficacia de los agentes terapéuticos en la gestión, tratamiento o mejora de un tumor sólido. El efecto sinérgico de una combinación de agentes terapéuticos puede evitar o reducir los efectos secundarios adversos o no deseados asociados con el uso de cualquiera de las terapias individuales.

Producción de proteínas de fusión CD40L-Fc

La expresión recombinante de una proteína de fusión CD40L-Fc de la invención requiere la construcción de un vector de expresión que contenga un polinucleótido que codifique la proteína de fusión CD40L-Fc. Una vez que se ha
5 obtenido un polinucleótido que codifica una proteína de fusión CD40L-Fc, el vector para la producción de la proteína de fusión CD40L-Fc se puede producir mediante tecnología de ADN recombinante utilizando técnicas muy conocidas en la técnica. Por lo tanto, se proporcionan métodos para preparar
10 una proteína expresando un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión CD40L-Fc. Se pueden utilizar métodos con los que están muy familiarizados los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contengan secuencias que codifican
15 los polipéptidos de CD40L o Fc y señales de control traduccional y transcripcional adecuadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Por lo tanto, la invención proporciona vectores replicables que
20 comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión CD40L-Fc de la invención, ligada operablemente a un promotor.

El vector de expresión se transfiere a una célula hospedadora mediante técnicas convencionales y las células
25 transfectadas se cultivan posteriormente mediante técnicas convencionales para producir una proteína de fusión CD40L-Fc de la invención. Por lo tanto, la invención incluye células hospedadoras que contienen un polinucleótido que codifica una proteína de fusión CD40L-Fc de la invención,
30 ligado operablemente a un promotor heterólogo. Las células hospedadoras adecuadas incluyen, sin carácter limitante,

microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*).

Se pueden utilizar varios sistemas de vectores de expresión en hospedadores para expresar la proteína de fusión CD40L-Fc de la invención. Tales sistemas de expresión en hospedadores representan vehículos mediante los cuales las secuencias codificantes de interés se pueden producir y purificar posteriormente, pero también representan células que, cuando se transforman o transfectan con las secuencias nucleotídicas codificantes adecuadas, pueden expresar una proteína de fusión CD40L-Fc de la invención *in situ*. Estos incluyen, sin carácter limitante, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformados con vectores de expresión recombinante de ADN de bacteriófago, ADN plasmídico o ADN de cósmido que contienen secuencias que codifican la proteína de fusión CD40L-Fc o sistemas celulares de mamíferos (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, NSO y 3T3). Una vez que se ha producido una proteína de fusión CD40L-Fc de la invención por expresión recombinante, esta se puede purificar mediante cualquier método conocido en la técnica para purificar una proteína.

Estudio de las propiedades y actividades de la proteína de fusión CD40L-Fc

La estabilidad de las subunidades monoméricas de CD40L-Fc de la invención, aisladas o como parte de un multímero, se puede medir fácilmente mediante técnicas muy conocidas en la técnica, tales como la desnaturalización térmica (T_m) y caotrópica (tal como el tratamiento con sales de guanidina o urea), el tratamiento con proteasas (tal como el tratamiento con termolisina) u otra metodología aceptada en la técnica para determinar la estabilidad de una proteína.

Se puede consultar una revisión exhaustiva de técnicas empleadas para medir la estabilidad de una proteína, por ejemplo, en "Current Protocols in Molecular Biology" y "Current Protocols in Protein Science" de John Wiley and Sons. 2007.

La afinidad de unión y otras propiedades de unión de una proteína de fusión CD40L-Fc a CD40 se pueden determinar mediante diversos métodos de ensayo *in vitro* conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, métodos de equilibrio (por ejemplo, enzoinmunoensayo (ELISA) o análisis cinético (por ejemplo, análisis por BIACORE®), y otros métodos tales como ensayos de unión indirecta, ensayos de unión competitiva, electroforesis en gel y cromatografía (por ejemplo, filtración en gel). Estos y otros métodos pueden utilizar una marca en uno o más de los componentes que se estén examinando y/o emplear diversos métodos de detección que incluyen, sin carácter limitante, marcas cromógenas, fluorescentes, luminiscentes o isotópicas. Se puede consultar una descripción detallada de las propiedades cinéticas y las afinidades de unión en Paul, W.E., ed., Fundamental Immunology, 4.^a Ed., Lippincott-Raven, Filadelfia (1999).

En la presente se describen métodos *in vitro* e *in vivo* adicionales para determinar la función o actividad de las proteínas de fusión CD40L-Fc. Se pueden utilizar estos ensayos para determinar una o más de una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una o más de la función y memoria de los linfocitos T, activación o proliferación de los linfocitos B, maduración o activación de las células dendríticas, respuesta de citocinas o quimiocinas Th1, polarización de macrófagos M1/M2 que proceden de monocitos,

presentación de antígenos y/o inmunosupresión de un microentorno tumoral). En la técnica existe constancia de varios modelos en animales *in vivo* para estudiar la actividad anticancerosa o antitumoral, incluido, por ejemplo, el
5 modelo en ratones del tumor B16-F10. También son muy conocidos métodos adicionales para estudiar las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas.

Kits

La invención proporciona kits para potenciar la
10 actividad antitumoral. En varias realizaciones, el kit incluye una proteína de fusión CD40L-Fc (por ejemplo, MEDI5083). El kit puede comprender composiciones terapéuticas adicionales que incluyen, por ejemplo, un anticuerpo anti-CTLA-4 (por ejemplo, tremelimumab),
15 anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, durvalumab) y/o un anticuerpo anti-PD-1.

En algunas realizaciones, el kit comprende un recipiente estéril que contiene una composición terapéutica; tales recipientes pueden ser cajas, ampollas, frascos,
20 viales, tubos, bolsas, sobres, envases alveolados u otras formas adecuadas de recipiente conocidas en la técnica. Dichos recipientes pueden estar hechos de plástico, vidrio, papel laminado, lámina metálica u otros materiales adecuados para alojar medicamentos.

25 Si se desea, el kit comprende además instrucciones para administrar las combinaciones terapéuticas de la invención. En realizaciones particulares, las instrucciones incluyen al menos uno de los siguientes: descripción del agente terapéutico; programa de dosificación y administración para
30 potenciar la actividad antitumoral; precauciones; advertencias; indicaciones; contraindicaciones; información

de sobredosis; reacciones adversas; farmacología animal; estudios clínicos; y/o referencias. Las instrucciones pueden estar impresas directamente en el envase (de haber uno) o como una etiqueta aplicada en el envase o como una hoja por separado, folleto, tarjeta o carpeta que se suministran en el envase o con él.

La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (que incluyen técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que se encuentran dentro del ámbito del experto en la técnica. Dichas técnicas se explican por completo en la bibliografía, tal como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney, 1987); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller y Calos, 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991). Estas técnicas se pueden aplicar a la producción de los polinucleótidos y polipéptidos de la invención y, como tales, pueden ser tenidas en cuenta en la preparación y puesta en práctica de la invención. En las secciones que siguen se analizarán técnicas particularmente útiles para realizaciones particulares.

Los siguientes ejemplos se facilitan con el fin de proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo preparar y utilizar los métodos de ensayo, cribado y terapéuticos de la invención, y no se

pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran como su invención.

EJEMPLOS

A continuación, la invención se describe haciendo
5 referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son únicamente ilustrativos y no se debe interpretar de ningún modo que la invención se limite a estos ejemplos, sino que se debe interpretar que engloba todas y cada una de las variaciones que sean evidentes como resultado de la
10 información que se proporciona en la presente.

Ejemplo 1. Generación de CD40L-Fc y estudio de estabilidad

CD40L desempeña la función de una molécula coestimuladora y se une al receptor CD40 en las células
15 presentadoras de antígeno (APC), lo que da lugar a muchos efectos dependiendo del tipo de célula diana, incluidas la activación de linfocitos B y presentación de respuestas inmunitarias con anticuerpos antitumorales, activación de macrófagos y células dendríticas y la generación de
20 linfocitos citolíticos naturales y linfocitos T citotóxicos.

Se construyeron proteínas de fusión que comprendían una fusión monocatenaria de tres subunidades del ligando CD40 (CD40L) y un monómero de Fc (Fc de IgG4P) ligados mediante conectores peptídicos (CD40L-Fc) (FIG. 1). Las proteínas de
25 fusión CD40L-Fc incluyeron scCD40L-IgG4P-FP6 (MEDI5083), scCD40L-IgG4P-FP7 y un sustituto murino (Fc de IgG1 D265A de ratón, similar a FP5). Se estudiaron las propiedades físicas de los constructos CD40L-Fc y se observó que eran similares (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de constructos CD40L-Fc

Construeto	Secuencia del conector entre las unidades	% no agregado de la proteína A	PM a partir de la dispersión de luz (kDa)	Rendimiento final (mg/L)
FP7 C194W	GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 4)	90	157	155
FP6 C194W	GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 2)	87	157	78
FP5 natural	GGSGGS (SEQ ID NO: 37)	85	143	101

Se generaron los datos de estabilidad de acuerdo con el siguiente protocolo. Las muestras se concentraron hasta 5 mg/mL en PBS, y se incubaron a temperatura ambiente y 45 °C. Las muestras se estudiaron mediante cromatografía de alta resolución de exclusión por tamaño (HPSEC) en diferentes puntos temporales (por ejemplo, día 1, 3, 7, etc.). En la FIG. 2 se muestran cromatogramas de HPSEC representativos para FP7 C194W. Los datos de estabilidad para los constructos CD40L-Fc mostraron un cambio mínimo con el tiempo a temperatura ambiente durante hasta 7 días y una mayor agregación con el tiempo a 45 °C (Tabla 2).

Tabla 2. Datos de estabilidad para los constructos CD40L-Fc

	Constructo	Día 1 TA	Día 3 TA	Día 7 TA	Día 1 45 °C	Día 3 45 °C	Día 7 45 °C
5	C194W FP7	100	100	100	96	93	81
	C194W FP6	100	100	99	96	93	86
	FP5 natural	100	99	100	96	82	76

Se estudiaron las muestras de FP6 en un programa de estabilidad para determinar la bioactividad en el sistema indicador CD40 humana NFκB Luciferasa HEK293, tal como se describe en la presente. La bioactividad de la muestra de estabilidad de MEDI5083, según se mide mediante el ensayo de NFκB Luciferasa, fue comparable a la muestra de control, tanto en la forma general como en los parámetros de la curva y especialmente en el valor de CI₅₀, con una calificación en el intervalo anticipado de 100-200 pM (FIG. 3).

Ejemplo 2. CD40L-FP7, la proteína de fusión CD40L-Fc, tiene bioactividad CD40L

La proteína de fusión FP6 CD40L (MEDI5083) ejerce actividad biológica mediante la unión y señalización a través de CD40 humana unida a la superficie en las células del sistema inmunitario tales como linfocitos B y células dendríticas. Para determinar la actividad mediada por CD40 de la proteína de fusión de CD40L con FP7, se utilizaron los sistemas indicadores de linfocitos B Ramos-Blue NFκB/AP-1 y la línea celular HEK293 CD40 NFκB-Luc.

Se han desarrollado ensayos sustitutos rápidos y simples utilizando una célula HEK humana transfectada con CD40 humana y un sistema indicador NFκB-Luciferasa o célula Ramos-Blue transfectada con un sistema indicador NFκB/AP-1.

En este estudio, se evaluó la actividad de la proteína de fusión FP7 CD40L (MedImmune) respecto a MEDI5083 (MedImmune) y un control de isotipo (isotipo de IgG4 humana; MedImmune). Se prepararon FP7 CD40L y MEDI5083 de acuerdo con los esquemas de dilución del fármaco 2X y 1X. Para el fármaco 2X, se utilizó el siguiente esquema de dilución: 200nM, 66.7nM, 22.2nM, 7.4nM, 2.5nM, 823pM, 274pM, 92pM, 31pM, 10pM, 3.4pM y 0pM. Para el fármaco 1X, se utilizó el siguiente esquema de dilución: 100nM, 33.4nM, 11.1nM, 3.7nM, 1.3nM, 412pM, 137pM, 46pM, 15pM, 5pM, 1.7pM y 0pM.

Materiales y métodos

Protocolo del ensayo de bioactividad de Hu CD40 HEK

Se mantuvieron células Hu CD40 293 HEK NFκB c3 en DMEM (GIBCO) más un 10% de FBS inactivado térmicamente (HI-FBS; GIBCO) y Pen Strep (GIBCO). Las células fueron adherentes y tendieron a formar acumulaciones o islas de células según se incrementó la confluencia. Las células se dividieron cuando se aproximaron a un 75% de confluencia. Para recolectar las células, se aspiró el medio, se añadió un 0.25% de Tripsina-EDTA (5mL; GIBCO) y la capa de células se recubrió con balanceo. Se retiró la tripsina, se añadió medio (10 mL) y las células se retiraron por agitación. Se ajustó la cantidad de células recolectadas a 5×10^5 células/mL en DMEM más un 2% de HI-FBS, se añadieron (100 μ L) a los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo plano Poli D-L Lisina Biocoat (5×10^4 celulasas/pocillo; Corning) y se colocaron en una incubadora a 37 °C durante 24 horas. Después de la incubación, se aspiró el medio de la placa. Se añadieron con cuidado cien (100) μ L de fármaco 1X a cada pocillo (por ejemplo, que descendiera por el lateral del pocillo) y se intentó minimizar el desprendimiento de las células. Las células se volvieron a

colocar en la incubadora a 37 °C durante 24 horas. Se preparó el reactivo de luciferasa (Sustrato para el ensayo de luciferasa Bright-Glo; Promega), se permitió que se equilibrara hasta la temperatura ambiente y se añadió (100
5 µL) a cada pocillo. Las células y los reactivos se mezclaron bien para garantizar una lisis celular completa y se leyeron inmediatamente en un lector de placas de tipo luminómetro Evision-02 de PerkinElmer.

Protocolo de ensayo de bioactividad Ramos-Blue

10 Se mantuvieron linfocitos B indicadores Ramos-Blue NFκB/AP-1 (Invivogen) en medio IMDM GlutaMAX (GIBCO) más un 10% de HI-FBS (GIBCO), Pen Strep (GIBCO) y Zeocin (100 µg/mL; InvivoGen). Las células fueron no adherentes y los cultivos se iniciaron con una cantidad de 5×10^5 células/mL y se
15 mantuvieron por debajo de 6×10^6 /mL. En el día 1, las células se dividieron en medio IMDM GlutaMAX más un 10% de HI-FBS y pen/strep (sin Zeocin). Las células se recolectaron, se ajustaron a 4×10^6 células/mL, y se añadieron (100 µL) a los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo plano (4×10^5
20 células/pocillo; Falcon). Se añadieron cien (100) µL de fármaco 2X en medio sin Zeocin a cada pocillo y las células se colocaron en una incubadora a 37 °C durante 24 horas. Se transfirió el sobrenadante de las células Ramos-Blue (40 µL) a los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo plano.
25 Se preparó el reactivo AP-1 QUANTI-Blue (una bolsita disuelta en 100 mL de agua estéril; Invivogen) y se añadió el reactivo AP-1 QUANTI-Blue (160 µL) a cada pocillo. La placa que contenía las células del reactivo AP-1 QUANTI-Blue se colocó en una incubadora a 37 °C durante hasta 1 hora y se leyó en
30 un espectrofotómetro SpectraMax M5 a 655 nm.

CD40L-FP7 mostró una actividad biológica equivalente a MEDI5083 en ambos ensayos con líneas celulares indicadoras (FIGS. 4 y 5 y Tablas 3 y 4). Las subunidades de CD40L en la proteína de fusión CD40L-FP7 se ligan mediante un conector peptídico de 9 aminoácidos GlySer. Sorprendentemente, a pesar de tener un conector con una longitud mayor (>8 aminoácidos) respecto a otras proteínas de fusión de ligando TNF monocatenario-Fc, la longitud del conector de 9 aminoácidos no redujo la actividad de CD40L y no hubo agregación de la proteína de fusión CD40L-FP7. El control de isotipo de IgG4P humana NIP-228 no mostró actividad respecto al fondo en ningún ensayo indicador. Para el ensayo indicador Ramos-Blue, la incubación con el medio de detección QUANTI-Blue AP-1 durante 60 min (FIG. 5) y 30 min mostró curvas similares. Sin embargo, la incubación con medio de detección QUANTI-Blue AP-1 durante 60 min dio como resultado un intervalo dinámico mayor que con 30 min. En otro experimento, MEDI5083 estimuló la proliferación de linfocitos B primarios humanos (FIG. 6). Por lo tanto, estos experimentos mostraron que MEDI5083 tenía bioactividad y puede activar la inmunidad adaptativa.

Tabla 3. Evaluación de la biodisponibilidad de CD40L-FP7 referenciada respecto a MEDI5083 y un control de isotipo de IgG4P humana: modelo de células HuCD40 293 HEK NFκB c3

Valores del mejor ajuste	Descripción de la muestra de prueba		
	MEDI5083	CD40L-FP7	HuIgG4P
Inferior	71966	67530	75990
Superior	167096	162767	71170
LogCE50	-0.6775	-0.3582	~ 0.3561
Pendiente de Hill	2.397	1.424	~ -60.20
CE50 (nM)	0.2102	0.4383	~ 2.270
Amplitud	95130	95237	-4820
R Cuadrado	0.9850	0.9695	0.2588

Tabla 4. Evaluación de la biodisponibilidad de CD40L-FP7 referenciada respecto a MEDI5083 y un control de isotipo de IgG4P humana: modelo de linfocitos B Ramos-Blue NFκB/AP-1

Valores del mejor ajuste	Descripción de la muestra de prueba		
	MEDI5083	CD40L-FP7	HulgG4P
Inferior	0.08990	0.06519	0.07544
Superior	1.667	1.618	~ 27.19
LogCE50	-1.146	-0.9699	~ 2.317
Pendiente de Hill	1.023	0.9531	~ 12.20
CE50 (nM)	0.07153	0.1072	~ 207.5
Amplitud	1.577	1.553	~ 27.11
R Cuadrado	0.9810	0.9965	0.1639

Ejemplo 3. MEDI5083, proteína de fusión CD40L-Fc, activó células dendríticas que proceden de monocitos humanos (MoDCs)

MEDI5083 ejerce actividad biológica a través del receptor CD40 en las células del sistema inmunitario tales como las células dendríticas, linfocitos B y macrófagos. Se ha demostrado que los activadores de CD40L incrementan los marcadores de activación de la superficie celular y la secreción de citocinas inflamatorias en las células dendríticas que se pueden detectar mediante FACS y ELISA, respectivamente. Se diseñó este estudio para determinar si el pretratamiento de MoDC con MEDI5083 potenciaba la respuesta en MoDC humanas.

Materiales y métodos

Inicio y cultivo de MoDC

Los monocitos humanos (por ejemplo, frescos) se cultivaron en RPMI (medio RPMI 1640 + Glut; GIBCO) + un 10% de FBS inactivado térmicamente (HI-FBS; GIBCO) (= cRPMI) complementado con GM-CSF e IL-4 (ambos 100 ng/mL; R&D Systems) durante 6 días, volviendo a sembrar con citocinas

cada 48 horas. Después de 6 días, las células dendríticas que proceden de monocitos (MoDC) (caracterizadas por pérdida de adherencia y la aparición de extrusiones en la membrana celular) se contaron y se ajustaron a 1×10^6 /mL en cRPMI. En el día 6, se realizó la caracterización mediante FACS (MACSQUANT Pippen) en una alícuota de 1×10^6 mL de cada donante.

Tratamiento farmacológico y activación de MoDC

Para cada donante, se añadieron MoDC (100 μ L) en cRPMI a los pocillos de placas de 96 pocillos (1×10^5 células por pocillo). Se generaron soluciones madre del fármaco (4X) de MEDI5083 (dilución 1:3) en cRPMI para obtener una concentración final de FP6 comprendida entre 100 nM y 15 pM. Para el fármaco 4X, se utilizó el siguiente esquema de dilución: 200nM, 100nM, 33.3nM, 11.1nM, 3.7nM, 1.2nM, 400pM, 140pM, 46pM, 15pM, 0pM. Se utilizó el control del isotipo (100 nM) para el caso sin fármaco (0 pM). Adicionalmente, para la concentración fija de fármaco que se añadió en los pocillos de combinación, se generaron soluciones madre del fármaco 4X en cRPMI para obtener una concentración final 4 nM de MEDI5083. Se añadieron fármaco 4X (50 μ L) y 50 μ L de cRPMI a los pocillos de tratamiento con un único fármaco. Después de 24 horas, se recolectaron los sobrenadantes (130 μ L), se transfirieron a placas marcadas de 96 pocillos y se congelaron para el análisis posterior de citocinas (IFN- γ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, TNF- α). Se procesaron las células mediante FACS.

Protocolo de tinción FACS extracelular: panel fenotípico/funcional

Después de 24 horas, las células MoDC se han adherido a la placa. Añadir DPBS sin Ca/Mg (DPBS; GIBCO) (200 μ L) a

los pocillos y centrifugar a 1500 rpm durante 5 min para lavar. Se añadió TrypLE Express precalentado (100 µL; GIBCO) y las células se pusieron a 37 °C durante 15 min. Se añadió tampón FACS (DPBS complementado con un 5% de HI-FBS y un 0.1% de azida sódica (SIGMA)) y las células se lavaron dos veces. Las células se resuspendieron en 30 µL de IgG humana, 10 µg/mL, y se incubaron a TA durante 10 min. Durante este tiempo, se añadieron MoDC a la placa de compensación y se añadió el anticuerpo apropiado. Se añadieron la mezcla maestra del anticuerpo en tampón FACS + azida (100 µL) y controles FMO (siglas en inglés de fluorescencia menos uno) y las células se incubaron a 4 °C durante 20 min. Se utilizaron anticuerpos para los marcadores de la superficie celular CD14, CD40, CD206, CD163, CD68, CD80, HLA-DR, CD274 (PD-L1). Las células se lavaron dos veces con tampón FACS, a continuación se resuspendieron en tampón FACS (100 µL) y se adquirieron las muestras en un citómetro de flujo. Los datos se analizaron en Flow Jo v9.

MEDI5083 indujo niveles elevados de los marcadores de la superficie celular HLA-ABC, HLA-DR, CD80 y CD86, que se asocian con la presentación de antígenos, y CD83, un antígeno de activación (remítase a la FIG. 7 y Tabla 5).

Tabla 5. Valores de CE50

Marcador	CE50 (nM)
CD80	0.813
CD83	0.234
CD86	0.447
HLA-ABC	0.988
HLA-DR	0.473

También se observaron niveles elevados de marcadores de la superficie celular adicionales, incluidos CD40 y PD-L1, que son antígenos de activación, y el receptor CCR7 para la migración a los ganglios linfáticos de CCL19 y CCL21. La expresión de todos los marcadores de la superficie celular de MoDC se incrementó en una manera sensible a la dosis, estancándose entre 3.7 y 11.1 nM, aunque pareció que CD40 expresado experimentó una reducción regulada con una concentración elevada. Por lo tanto, MEDI5083 fue capaz de activar y madurar las células dendríticas que proceden de monocitos humanos (MoDC). Estos experimentos demuestran que MEDI5083 puede activar la inmunidad innata.

MEDI5083 indujo un aumento dependiente de la dosis en la secreción de IL-12p70, IFN- γ , TNF- α e IL-10 (FIG. 8). La secreción de IL-8 se indujo inicialmente pero se inhibió con dosis de 3.7 μ M y superiores. No se observó impacto en IL-1 β para MEDI5083. En otro experimento, la activación y maduración de mDC por MEDI5083 impulsó la proliferación de linfocitos T en una manera dependiente de la dosis (FIG. 9). Por lo tanto, MEDI5083 fue capaz de inducir una respuesta de citocinas/quimiocinas Th1 en MoDC humanas e impulsar la proliferación de linfocitos T. Estos experimentos muestran que MEDI5083 tiene el potencial de conectar las respuestas inmunitarias innata y adaptativa.

Ejemplo 4. MEDI5083, proteína de fusión CD40L-Fc, activó la polarización de macrófagos humanos.

Los monocitos son extremadamente plásticos y pueden ser macrófagos diferenciados con un fenotipo M1 proinflamatorio o un fenotipo M2 supresor/de curación de heridas *in vitro*. Los macrófagos M1 son PDL1elev/CD80elev/CD40elev/HLA-DRelev/CD206bajo/CD163bajo/CD14bajo mientras que los

macrófagos M2 son PDL1bajo/CD80bajo/CD40bajo/HLA-DRbajo/CD206elev/CD163elev/CD14elev. Además, los macrófagos M1 producen las citocinas inflamatorias TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-23 mientras que los macrófagos M2 producen las citocinas supresoras IL-10 y TGF- β . En un entorno tumoral, los macrófagos M2 pueden suprimir la respuesta inmunitaria a los antígenos cancerosos. El cambio de la polarización hacia un fenotipo M1 podría anular este efecto y permitir la regresión del tumor. Este experimento se diseñó para evaluar el efecto de MEDI5083, una proteína de fusión CD40L humano/IgG4 humana, en macrófagos polarizados M1 y M2.

Materiales y métodos

Protocolo de manipulación y polarización de monocitos (Mia *et al.* (2014) *Scan J Immunol* 79: p305-314).

Se obtuvieron monocitos humanos frescos (Allcells) de 2 donantes (D1: 8367; D2: 8375) para su uso en el experimento. Se realizó un recuento de células y se retiró una alícuota celular (1×10^6) para la línea base de FACS D0/monocitos en reposo. Las células restantes se dividieron en dos alícuotas iguales, las células se sedimentaron por centrifugación (1500 rpm, 5 min), la mitad se resuspendió en medio M1 (RPMI (medio RPMI 1640 + Glut; GIBCO) complementado con un 10% de FBS inactivado térmicamente (HI-FBS; GIBCO), Pen Strep (GIBCO) (=cRPMI) y 50 ng/mL GM-CSF (R&D Systems)) y la mitad se resuspendió en medio M2 (cRPMI más 50 ng/mL M-CSF (R&D Systems)). Las alícuotas (2 mL) se transfirieron a los pocillos de placas de 6 pocillos y las placas se incubaron a 37 °C durante 6 días, añadiendo citocinas frescas cada 2 días. Se retiró un paso de unión en medio exento de suero del protocolo publicado. Cada vez que se añadieron citocinas se observó y registró la morfología celular.

Después de 6 días, los macrófagos experimentaron polarización hacia M1 o M2. La adición de un estímulo de activación dio como resultado la característica secreción de citocinas y aumento regulado de los marcadores de la superficie celular. Para este estudio, la activación se realizó de tres maneras:

(a) Activación estándar (50 ng/mL de LPS (LPS de *E. coli* 0111:B4; SIGMA) + 20 ng/mL de IFN- γ (R&D Systems) a la placa M1 y 20 ng/mL de IL-4 (R&D Systems) + 20 ng/mL de IL-10 (R&D Systems) a la placa M2) añadida en el día 6, con análisis por clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y recolección del sobrenadante después de 24 horas.

(b) Activación estándar más adición simultánea de MEDI5083 (4nM; MedImmune) o control del isotipo (4nM; MedImmune) añadida en el día 6, con análisis FACS y recolección del sobrenadante después de 24 horas.

(c) Activación estándar añadida en el día 6, MEDI5083 (4nM; MedImmune) o control del isotipo (4nM; MedImmune) añadido después de 24 horas (día 7) con análisis FACS y recolección del sobrenadante después de 24 horas más.

En el momento de la recolección, se retiró el sobrenadante (500 μ L) y se congeló para un análisis posterior de citocinas mediante MSD (placa 10-plex para TH1/TH2 humanos IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IFN- γ y TGF- β).

El medio restante se aspiró y las placas se lavaron una vez con DPBS (DPBS sin Ca/Mg; GIBCO) y se añadió tampón de disociación TrypLE Express precalentado (0.5mL; GIBCO) a cada pocillo. Las células se colocaron en una incubadora a 37 °C durante 20 min, se golpearon las placas para desalojar

los macrófagos, se añadió cRPMI (2 mL) y se aspiró vigorosamente utilizando una pipeta de 5 mL para recolectar las células. Tras el procedimiento, se comprobó en un microscopio la retirada de las células de los pocillos. Las células se sedimentaron mediante centrifugación, se ajustaron a 1×10^6 células/mL en cRPMI y se procesaron para FACS.

Protocolo de tinción FACS extracelular (4C)

Se añadieron células (2×10^5) a los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo redondeado y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Se añadió tampón FACS (200 μ L) (DPBS (DPBS sin Ca/Mg; GIBCO) complementado con un 5% de HI-FBS (GIBCO) y un 0.1% de azida de sodio (SIGMA)) y las células se lavaron una vez. Las células se resuspendieron en 50 μ L de solución de bloqueo del receptor Fc TruStain FcX 1:4 (BioLegend) y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. Se añadió a los pocillos la mezcla maestra para el conjunto de anticuerpos (100 μ L) y las células se incubaron a 4 °C durante 20 min. Se utilizaron anticuerpos para los marcadores superficiales celulares CD14, CD40, CD206, CD163, CD68, CD80, HLA-DR, CD274 (PD-L1). Las células se lavaron dos veces con tampón FACS, se resuspendieron en tampón FACS (100 μ L) y se adquirieron las muestras en un citómetro de flujo MACSQuant. Los datos se analizaron en Flow Jo v9.

Después de 6 días en GM-CSF, los macrófagos se denominaron M0-M1. La activación durante 24 horas con IFN- γ y LPS da lugar a una polarización completa hacia M1. Asimismo, después de 6 días en M-CSF, los macrófagos se denominan M0-M2 y la activación durante 24 horas con IL-4 e IL-10 da lugar a una polarización completa hacia M2. Es importante que 6 días después (antes de la activación) cuando

se visualizan en el microscopio, los macrófagos M0-M1 tuvieron la morfología clásica aplanada, con aspecto de crepe y los macrófagos M0-M2 tuvieron la morfología clásica de células adherentes, de tipo husillo. En los macrófagos M2, la inclusión de MEDI5083 (4nM) en la fase de activación de 24 h incrementó los marcadores M1 y disminuyó los marcadores M2 haciendo que la polarización se desplazara desde M2 y hacia M1 (FIG. 10, barras rayadas; FIG. 11). Por lo tanto, estos experimentos mostraron que MEDI5083 fue capaz de revertir la inmunosupresión.

Ejemplo 5. MEDI5083, la proteína de fusión CD40L-Fc se une específicamente a CD40

El modo de acción de FP6 (MEDI5083) se produce principalmente mediante la activación de las células presentadoras de antígeno que expresan CD40 (células dendríticas, linfocitos B, monocitos y macrófagos). FP6 no se une a otras proteínas de la subfamilia del receptor de TNF tales como GITR, TRAIL y OX40 y es específica de la especie (no funciona en un modelo en ratones).

Se desarrolló un ELISA sencillo para evaluar la especificidad por CD40 humana de FP6 (MEDI5083). Un intento anterior de desarrollar un protocolo con ELISA sencillo demostró que era necesario utilizar un reactivo secundario anti-IgG4 humana más específico para sortear la unión no específica al componente Fc de las proteínas de fusión receptor/Fc utilizado para controlar la especificidad del ensayo. Además, se determinaron concentraciones inferiores eficaces del receptor y reactivo primario. En el presente estudio, se evaluó un reactivo secundario más específico.

Materiales y métodos

Ensayo de unión al receptor de TNF

Se recubrieron placas con receptores para quimeras Fc recombinantes, excepto para TRAIL, que no tiene componente Fc, (50 µL de 5 µg/mL) (1 hora, 37 °C), seguido por un paso de lavado (3x con PBS + 0.05% de Tween). Los receptores recombinantes incluyeron: rhCD40 (Fc de hIgG1); rmCD40 (Fc de hIgG1); rhGITR (Fc de hIgG1); rhTRAIL; rhOX40 (Fc de hIgG1) (R&D Systems). Se utilizaron receptores recombinantes solos (no primarios) como un control para controlar la unión directa al reactivo secundario Fc-HRP. Las placas se bloquearon con un 4% de leche en PBS (1 hora, 37 °C) seguido por un paso de lavado (2x con PBS). Las placas se incubaron con reactivo primario (50 µL de 20 nM) en un 1% de BSA en PBS, por ejemplo, recién hecho, (1 hora, 37 °C), seguido por un paso de lavado (4x con PBS + 0.05% de Tween). Los reactivos primarios incluyeron FP6 (Fc de hIgG4) y el anticuerpo IgG4 humana, que se utilizó como un control del isotipo. Las placas se incubaron con un reactivo secundario, anti-Fc conjugado con HRP (100 µL de 1:25 000) en un 4% de leche en PBS, seguido por un paso de lavado (4x con PBS + 0.05% de Tween). Para preparar anti-Fc conjugado con HRP, se obtuvo un patrón 1:4 de anti-IgG4 humana de ratón (H+L) (n.º de cat. Thermo MA1-34437) en un 4% de leche, se diluyó 1:5000, y se utilizó una cantidad de 0.5 mg/mL a 1:25 000. Se añadió una solución de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) (100 µL/pocillo). La solución de TMB se obtuvo añadiendo volúmenes iguales de una solución A y solución B TA (kit de reactivos de sustrato TMB; n.º de cat. BD OptEIA 3 555214) no más de 15 minutos antes de la adición. Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos y se protegieron de la luz. Los pocillos con actividad HRP se volvieron azules. Se añadió la solución de parada (ácido sulfúrico 2

N; 100 µL) y los pocillos que se estaban volviendo azules se volvieron amarillo brillante. Las placas se leyeron a 450 nm en un lector de placas.

El ensayo ELISA FP6 (MEDI5083) funcionó bien con una
5 especificidad elevada por CD40 humana (FIG. 12). La baja
señal de fondo generada a partir de los otros miembros de la
familia del receptor de TNF humano tales como GITR, TRAIL y
OX40 indica que FP6 demostró una especificidad elevada por
CD40 humana respecto a otros miembros de la familia del
10 receptor de TNF humano tales como GITR, TRAIL y OX40. Por lo
tanto, se desarrolló un ELISA sencillo para la evaluación de
la especificidad de FP6 por CD40 humana.

El componente clave en este ensayo ELISA es el reactivo
secundario anti-IgG4 humana sumamente específico. Los
15 intentos anteriores para generar un ELISA específico de FP6
utilizaron un reactivo secundario anti-IgG humana con una
reactividad más amplia que se unía a la región Fc humana de
las proteínas de fusión del receptor Fc utilizadas como diana
para FP6, lo que dio lugar a señales de falsos positivos.

20 Un resumen de los experimentos descritos en la presente
indica que MEDI5083 se une específicamente a CD40 y activa
componentes clave de la respuesta inmunitaria *in vitro* (Tabla
6) .

25

30

Tabla 6. MEDI5083 se une específicamente a CD40 y activa componentes clave de la respuesta inmunitaria

Ensayos <i>in vitro</i>	Potencia
KinExA humano (K_D)	ND
CD40 humana NF κ B (n=10)	CE ₅₀ : 0.1 nM
Proliferación de linfocitos B humanos (n=3)	CE ₅₀ : 0.2 nM
Maduración/activación de células DC humanas (n=3)	Sí
Producción de citocinas polarizantes Th-1 por parte de MoDC	Sí
Polarización M2→M1 de monocitos/MF humanos	Sí
Reactividad cruzada con la familia de TNF (OX40, GITR, TRAIL)	Ninguna observada

Ejemplo 6. MuCD40L-FP, un sustituto de ratón de MEDI5083, tuvo actividad antitumoral en un modelo tumoral en ratones.

Para estudiar el efecto de las proteínas de fusión CD40L-Fc *in vivo* en ratones, se construyó un sustituto murino de MEDI5083, MuCD40L-FP. Al igual que MEDI5083, MuCD40L-FP comprende, del extremo N al C, una fusión monocaténaria de 3x subunidades de CD40L conectadas mediante conectores peptídicos que está conectada a un polipéptido de Fc. Sin embargo, en lugar de las subunidades de CD40L humano e IgG4P humana en MEDI5083, MuCD40L-FP comprende subunidades de CD40L de ratón y una Fc de IgG1 de ratón. Además, en MuCD40L-FP, los conectores entre subunidades entre las subunidades

de CD40L de ratón es GGGSGGS (SEQ ID NO: 37) en comparación con GGGSGGGS (SEQ ID NO: 2).

Se estudió el sustituto de ratón CD40L FP en el modelo en ratones singénicos B16-F10. MuCD40L-FP redujo el volumen tumoral y/o retrasó el crecimiento tumoral en el modelo en ratones B16-F10, en comparación con los controles no tratados y de isotipo (FIG. 13). Además, los ratones tratados con MuCD40L-FP no tuvieron una pérdida de peso significativa u otros efectos observables. Por lo tanto, MuCD40L-FP mostró una actividad antitumoral significativa en un modelo tumoral poco reactivo.

Se estudió el sustituto de ratón CD40L FP combinado con anti-PD-L1 en el modelo en ratones singénicos B16-F10. MuCD40L-FP combinada con anti-PD-L1 disminuyó el volumen tumoral y/o retrasó el crecimiento tumoral en ratones individuales en el modelo en ratones B16-F10 en comparación con anti-PD-L1 solo y controles no tratados y de isotipo. (FIGS. 14 y 15).

Se estudió el sustituto de ratón CD40L FP combinado con anti-CTLA-4 en el modelo en ratones singénicos B16-F10. MuCD40L-FP combinada con anti-CTLA-4 disminuyó el volumen tumoral y/o retrasó el crecimiento tumoral en ratones individuales en el modelo en ratones B16-F10 en comparación con anti-CTLA-4 solo y controles no tratados y de isotipo. (FIGS. 16 y 17).

Se estudió el sustituto de ratón CD40L FP combinado con anti-PD-L1 y anti-CTLA-4 en el modelo en ratones singénicos B16-F10. MuCD40L-FP combinada con anti-PD-L1 y anti-CTLA-4 disminuyó el volumen tumoral y/o retrasó el crecimiento tumoral en ratones individuales en el modelo en ratones B16-F10, en comparación con la combinación de anti-PD-L1 y anti-

CTLA-4 o MuCD40L-FP con anti-PD-L1 o anti-CTLA-4 (FIGS. 18 y 19).

Se estudió el sustituto de ratón CD40L FP combinado con anti-PD-1 en el modelo en ratones singénicos B16-F10. MuCD40L-FP combinada con anti-PD-1 disminuyó el volumen tumoral y/o retrasó el crecimiento tumoral en ratones individuales en el modelo en ratones B16-F10 en comparación con anti-PD-1 solo y controles no tratados y de isotipo. (FIGS. 20 y 21).

Además, se recogió suero de ratones que portaban un tumor B16-F10 tratados con muCD40L-FP, anti-PDL-1, anti-CTLA-4, o anti-PD1 solos, o muCD40L-FP combinada con anti-PDL-1, anti-PD-1, anti-CTLA-4 o anti-PDL-1 y anti-CTLA4. Se midieron los niveles de citocinas en suero 24 horas después del 2.º y 4.º tratamiento con un kit de ensayo multiplex de Meso Scale Discovery. El tratamiento con muCD40L-FP sola o combinada con anti-PDL-1, anti-PD-1, anti-CTLA-4 o anti-PDL-1 y anti-CTLA4 indujo niveles elevados de citocinas TH1 IFN γ , TNF α , IL12 y KC/GRO T1, en comparación con anti-PD-L1, anti-CTLA-4 y anti-PD-1 solos y los controles de isotipo y no tratados 24 h después del 2.º tratamiento (FIG. 22) y 24 horas después del 4.º tratamiento (FIG. 23). Sin embargo, no se observaron cambios en IL-1B, IL-2, IL-4, IL-5 o IL-10 24 h después del 2.º tratamiento o 24 h después del 4.º tratamiento (datos que no se muestran).

Por lo tanto, MuCD40L-FP combinada con anti-PD-L1, anti-PD-1, anti-CTLA-4 solo o combinado con anti-PD-L1 o anti-PD1, mostró una actividad antitumoral significativa en un modelo tumoral poco reactivo. Estos datos demuestran la utilidad de MEDI5083 combinado con inhibidores de puntos de control inmunitario.

Ejemplo 7. MuCD40L-FP, un sustituto de ratón de MEDI5083, activó respuestas inmunitarias en ratones

Para entender el efecto del sustituto de ratón MuCD40L-FP, se estudiaron las respuestas inmunitarias en los ratones B16-F10. MuCD40L-FP aumentó la activación de linfocitos T CD8⁺ y la expresión de PD-L1 intratumorales en ratones, en comparación con los controles no tratados y de isotipo (FIG. 24). Los ratones a los que se les administró MuCD40L-FP experimentaron un aumento de linfocitos T CD8⁺ totales y un aumento en los porcentajes de linfocitos T CD8⁺, IFN γ ⁺; CD8⁺, GrazB⁺; y PD-L1⁺ en comparación con los ratones de control. En el bazo, MuCD40L-FP impulsó la maduración de células mieloides y la activación de linfocitos B en ratones B16-F10, en comparación con controles no tratados y de isotipo (FIG. 25). MuCD40L-FP también indujo la secreción de citocinas TH1 y quimiocinas CXCL-1 en ratones B16-F10 (FIG. 26). Los ratones a los que se les administró MuCD40L-FP experimentaron un aumento de la secreción de IFN γ , TNF α , IL-12 y CXCL1 en comparación con los ratones de control.

Ejemplo 8. Estudios farmacocinéticos (PK) y farmacodinámicos (PD) de MEDI5083 en monos.

Para entender el efecto de MEDI5083 en primates, se realizaron estudios farmacocinéticos (PK) y farmacodinámicos (PD) en monos. Se utilizó una dosis de partida de 0.3 mg/kg en función de datos publicados con un mAb agonista contra CD40 (Vonderheide *et al.* 2001), para el cual MEDI5083 tiene el mismo mecanismo de acción. La MTD para el mAb anti-CD40 publicada fue de 0.2 mg/kg. La MTD equivalente en cinomolgo será 3 veces la MTD en seres humanos; 0.6 mg/kg. Se predijo que una dosis de 0.3 mg/kg o inferior sería una dosis de partida segura en macacos cinomolgos. Un estudio

toxicológico PK/PD de dosis única mostró ausencia de toxicidad con cualquiera de las dosis estudiadas (Tabla 7).

Tabla 7. Estudio toxicológico PK/PD de dosis única (no GLP)

5	Grupo	mg/kg	Ruta	Dosis	Animales
	1	Vehículo	IV y SC	1	3M
	2	0.3	IV	1	3M
	3	3.0	IV	1	3M
	4	30.0	IV	1	3M
10	5	30.0	SC	1	3M

Las rutas de administración se escogieron porque eran coherentes con la ruta propuesta de administración en seres humanos y se espera que proporcionen niveles séricos adecuados y que estén asociados con el efecto farmacodinámico.

Se recogió sangre (0.5-1.0 mL) 4 horas después de la administración de la dosis. Se analizó la sangre con anticuerpos monoclonales específicos para detectar linfocitos B (incluidos los linfocitos B activados), linfocitos T (linfocitos T auxiliares y linfocitos T citotóxicos), linfocitos citolíticos naturales (NK-) y células dendríticas. Se obtuvieron los números de células relativos (porcentaje) y el recuento total de linfocitos en el mismo día. Se computaron los números absolutos de las subpoblaciones a partir de los números relativos y totales. Las muestras de sangre también se utilizaron para inmunotinción Ki67. Se utilizó el suero para el análisis de citocinas, análisis y evaluación farmacocinéticos, y estudios anti-fármaco-anticuerpo (ADA, por sus siglas en inglés).

Se generaron modelos PK-PD para describir la activación y tráfico de linfocitos B después de una única dosis de MEDI5083 en monos (FIG. 27). Los resultados PK del estudio se enumeran de la siguiente manera: $CL = 405 \text{ mL/día/kg}$; $V_c = 137 \text{ mL/kg}$; $V_p = 122 \text{ mL/kg}$; $V_{\text{máx}} = 496 \text{ } \mu\text{g/día}$; $V_{\text{máx}} = 496 \text{ } \mu\text{g/día}$; y $K_m = 0.026 \text{ } \mu\text{g/mL}$. Los resultados PD del estudio se enumeran de la siguiente manera: $R_0 = 1$; $S_{\text{máx}} = 6.32 \text{ /día}$; $K_{\text{fuera}} = 8.13 \text{ /día}$; y $CE_{50} = 0.08 \text{ } \mu\text{g/mL}$. MEDI5083 mostró una PK no lineal, con semivida sérica en sujetos comprendida entre 2.7 y 18 h. Resulta interesante que cuando MEDI5038 se administró SC tuvo una semivida mayor que cuando se administró IV (30 mg/kg: IV $T_{1/2}$: 6 h; SC $T_{1/2}$: 18 h). La CE_{50} para la activación de los linfocitos B fue de $0.08 \text{ } \mu\text{g/mL}$ (~50 pM), que fue coherente con la CE_{50} *in vitro*. MEDI5038 mostró un efecto PD prolongado, ya que la semivida para el tráfico de linfocitos B fue 36 h en comparación con una semivida para la activación de linfocitos B de 2 h. MEDI5038 también activó la proliferación de linfocitos T (Ki67 linfocito T de memoria $CD8^+$) en monos (PD observada a 30 mg/kg SC, 7 días).

20 **Otras realizaciones**

A partir de la descripción anterior resultará evidente que se pueden realizar variaciones y modificaciones a la invención descrita en la presente para adaptarla a varios usos y condiciones. Tales realizaciones también se encuentran dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

La mención de una lista de elementos en cualquier definición de una variable en la presente incluye las definiciones de esa variable como un único elemento o una combinación (o subcombinación) de los elementos enumerados. La mención de una realización en la presente incluye a esa

realización como una realización única o combinada con cualquier otra realización o partes de ella.

Todas las patentes y publicaciones mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan a la presente a modo de
5 referencia en la misma medida que si se indicara específica e individualmente que cada patente y publicación independiente se incorpora a modo de referencia.

10

15

20

25

30