

Anticuerpos específicos CD47/PD-L1

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a la biotecnología, en particular a anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y a su uso. Más particularmente, la presente invención se refiere a anticuerpos que se unen específicamente a CD47 y PD-L1. La invención también se refiere a un ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, un vector de expresión, un método para preparar dicho anticuerpo y el uso de dichos anticuerpos y composiciones en terapias contra el cáncer.

Antecedentes de la Invención

La transmisión de dos señales distintas a las células T ha sido ampliamente utilizada para la activación linfocítica de los linfocitos T en reposo mediante células presentadoras de antígeno (*antigen-presenting cells* - APC). Este modelo contempla totalmente la discriminación de la tolerancia autoinmune de la tolerancia no autoinmune. La señal primaria, o señal específica de antígeno, se transmite a través del receptor de células T (*T-cell receptor* - TCR) luego del reconocimiento de un péptido antigénico extraño presentado en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (*major histocompatibility-complex* - MHC). La segunda señal o señal coestimuladora es enviada a las células T por moléculas coestimulantes expresadas en células presentadoras de antígeno (*antigen-presenting cells* - APC), e induce a las células T a estimular la expansión clonal, la secreción de citoquinas y la función efectora. En ausencia de coestimulación, las células T pueden volverse refractarias a la estimulación de antígenos, activan una respuesta inmunitaria efectiva, que puede además producir el agotamiento o la tolerancia a antígenos extraños.

En el modelo de dos señales, las células T reciben ambas señales: señales coestimuladoras secundarias positivas y negativas. La regulación de tales señales positivas y negativas es fundamental para maximizar las respuestas inmunitarias protectoras del huésped, mientras se mantiene la tolerancia inmunitaria y se evita la autoinmunidad. Las señales secundarias negativas parecen necesarias para inducir la tolerancia de las células T, mientras que las señales positivas estimulan la activación de las células T. Si bien el modelo simple de dos señales aún proporciona una explicación válida para los linfocitos “naive”, una respuesta inmunitaria es un proceso dinámico, y también se pueden proporcionar señales coestimuladoras a las células T expuestas al antígeno. El mecanismo de coestimulación es de interés terapéutico porque la manipulación de las señales coestimuladoras ha demostrado que proporciona un medio para potenciar o concluir una respuesta inmunitaria. Recientemente, se ha descubierto que la disfunción de las células T o la anergia se producen simultáneamente con una expresión inducida y sostenida de un receptor inhibitor, el polipéptido de muerte programada 1 (PD-1). Como resultado, el enfoque terapéutico hacia PD-1 y otras moléculas que transmiten una señal a través de la interacción con PD-1, como el ligando de muerte programada 1 (PD-L1) o el ligando de muerte programada 2 (PD-L2) es un área de intenso interés.

PD-L1 está sobreexpresado en una serie de tumores malignos y a menudo se lo asocia con un pronóstico desfavorable. Curiosamente, la mayoría de los linfocitos T invasivos de tumores expresan predominantemente PD-1, en contraste con los linfocitos T en tejidos normales y linfocitos T de sangre periférica, lo que indica que la regulación positiva de PD-1 en las células T reactivas al tumor puede contribuir a una respuesta inmunológica dañada. Esto puede deberse a la explotación de la vía de señalización de PD-L1 mediada por células tumorales que expresan PD-L1 que interactúan con las células T que expresan PD-1 para producir la atenuación de la activación de las células T y la evasión de la vigilancia inmunológica. Por lo tanto, la inhibición de la interacción PD-L1/PD-1 puede mejorar la muerte de tumores mediada por células CD8 +T.

La focalización terapéutica de PD-1 y otras moléculas que transmiten una señal a través de la interacción con PD-1, como ser PD-L1 y PD-L2, es un área de gran interés. Se ha sugerido a la inhibición de las señales de PD-L1 como un medio para aumentar la inmunidad de las células T (por ejemplo, la inmunidad antitumoral) para identificar una enfermedad maligna e infección, incluidas las infecciones tanto agudas como crónicas. Los inhibidores que bloquean la interacción PD-L1/PD-1 son conocidos, entre otros, por los documentos W02001014557, W02002086083, W02007005874, W02010036959, W02010077634 y WO2011066389. Sin embargo, aún no se ha comercializado ningún agente terapéutico óptimo que se dirija a esta vía, y esta es una importante necesidad médica no satisfecha.

CD47 es una glicoproteína de superficie celular que se une a SIRP α (alias SHPS-1) y SIRP γ en las células correspondientes. Esta interacción conduce a una regulación negativa de la función de las células inmunitarias o puede mediar la adhesión y migración celular. Se sugirió el uso de CD47 como fármaco biológico en el tratamiento de trastornos autoinmunes (documento WO1999/040940). En contraste, hay muy poca evidencia de un uso potencial de los ligandos CD47, como SIRP α para propósitos terapéuticos similares. Una explicación es la expresión ubicua de CD47 que evitaría el uso de polipéptidos de unión a CD47 como posibles fármacos. Los datos mostrados por Yu et al (J Invest Dermatol, 126:797-807 (2006)) sugieren que una proteína de fusión que consiste en los dominios extracelulares de SIRP α fusionados con un dominio Fc de inmunoglobulina puede evitar la migración de las células dendríticas derivadas de la piel (CD) al ganglios linfáticos drenantes en ratones, y por lo tanto atenuar (al menos parcialmente) la respuesta de hipersensibilidad al contacto en ratones. La migración y la función de las CD son esenciales para las respuestas inmunitarias o inflamatorias. En condiciones de enfermedad, estas respuestas exacerbadas de las CD pueden conducir a la perpetuación de la enfermedad. Interferir con la migración de CD patógenas de los tejidos a los órganos linfoides sería una oportunidad atractiva para detener el ciclo vicioso que conduce las enfermedades autoinmunes o inflamatorias.

CD47, también conocida como proteína asociada a la integrina (*integrin-associated protein* - IAP), antígeno del cáncer de ovario OA3, antígeno relacionado con Rh y MER6, es un receptor transmembrana que abarca múltiples áreas y pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas. Se ha observado la expresión y/o actividad de CD47 en varias enfermedades y trastornos. En consecuencia, existe una necesidad de terapias dirigidas a CD47. Además, debido a la expresión de CD47 en las plaquetas, también existe la necesidad de terapias dirigidas a CD47 (por ejemplo, anticuerpos) que no causen niveles significativos de agotamiento de plaquetas, hemaglutinación, agotamiento de glóbulos rojos y/o anemia cuando se las administra a un sujeto.

Los anticuerpos conocidos que inhiben la interacción entre CD47 y un ligando SIRP α han sido descritos en las siguientes solicitudes de patente: WO2014123580, WO2013119714, WO2015191861, WO2011143624, WO/2014/093678, WO2017053423.

También se conocen varias fuentes que describen anticuerpos multiespecíficos, por ejemplo, el documento WO/2014/087248 describe un anticuerpo biespecífico que es específico para CD47 y CD19, y el documento WO2016023001 describe un anticuerpo biespecífico que es específico para CD47 y PD1. Sin embargo, no se ha descrito ninguna posibilidad de producción y uso eficiente de un anticuerpo multiespecífico que se una específicamente a CD47 y PD-L1.

De lo anterior se desprende que existe la necesidad de crear nuevos anticuerpos que se unan efectivamente a CD47 y PD-L1.

Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere a moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos dirigidos a la unión a CD47 y PD-L1. Dichos anticuerpos pueden usarse para tratar una enfermedad o trastorno mediado por CD47 y PD-L1.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a CD47 y PD-L1 y comprende un sitio de unión para CD47, y al menos un sitio de unión para PD-L1.

En algunas realizaciones, un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En algunas realizaciones, un anticuerpo de la presente invención incluye uno o dos sitios de unión para PD-L1.

En algunas realizaciones, un sitio de unión para CD47 de un anticuerpo de la presente invención inhibe la interacción entre el receptor CD47 y el ligando SIRP α , y/o un sitio de unión para PD-L1 inhibe la interacción de PD-L1 con el receptor PD-1.

En algunas realizaciones, un sitio de unión para CD47 de un anticuerpo de la presente invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2, CDR3, **en donde CDR1** es una secuencia que es al menos un 80% homóloga a la secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NO:1-4, es decir, CDR1 es una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NO:1-4 o una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NO:1 - 4 con 1 o 2 sustituciones, **en donde CDR2** es una secuencia que es al menos un 80% homóloga a la secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NO: 6 - 15, es decir, CDR2 es una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NO: 6 - 15 o una secuencia seleccionada del grupo que comprende SEC. ID NOs:6 - 15 con 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones, **en donde CDR3** es una secuencia que es al menos 80% homóloga a la secuencia seleccionada del grupo que comprende SEC. ID NOs: 17 - 20, es decir, CDR3 es una secuencia seleccionada del grupo que comprende SEC. ID NOs: 17 - 20 o una secuencia Se seleccionó del grupo que comprende las SEC. ID NO:17 - 20 con 1, 2 o 3 sustituciones.

En algunas realizaciones, un sitio de unión para CD47 de un anticuerpo de la presente invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2, CDR3, **en donde CDR1** es una secuencia seleccionada del grupo que comprende SEC. ID NOs: 1 - 4, **en donde CDR2** es una
5 secuencia seleccionada del grupo que comprende SEC. ID NOs:6 - 15, **en donde CDR3** es una secuencia seleccionada del grupo que comprende SEC. ID NOs: 17 - 20.

En algunas realizaciones, un sitio de unión para CD47 de un anticuerpo de la presente invención comprende un dominio variable de cadena pesada de la
10 reivindicación 4, y un dominio variable de cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2, CDR3, **en donde CDR1** es una secuencia que es al menos 80% homólogo a una secuencia seleccionada del grupo que comprende SEC. ID NOs: 22-34, es decir, CDR1 es una secuencia seleccionada del grupo que comprende SEC. ID NOs: 22 - 34 o una secuencia seleccionada del grupo que comprende SEC. ID
15 NOs: 22 - 34 con 1 o 2 sustituciones, **en donde CDR2** es una secuencia que es al menos 80% homóloga a la secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs:36 - 48, es decir, CDR2 es una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs:36 - 48 o una secuencia seleccionada del grupo que comprende SEC. ID NOs:36 - 48 con 1, 2 o 3 sustituciones, **en donde CDR3** es una
20 secuencia que es al menos 80% homóloga a la secuencia seleccionada del grupo que comprende SEC. ID NOs:50 - 64, es decir, CDR3 es la secuencia de las SEC. ID NO: 50 - 64 o una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NO: 50 - 64 con 1 o 2 sustituciones.

En algunas realizaciones, un sitio de unión para CD47 de un anticuerpo de la
25 presente invención comprende un dominio variable de cadena pesada de la reivindicación 4, y un dominio variable de cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2, CDR3, **en donde CDR1** es una secuencia seleccionada del grupo que comprende SEC. ID NOs: 22 - 34, **CDR2** es una secuencia seleccionada del grupo

que comprende SEC. ID NOs: 36 - 48, **CDR3** es una secuencia seleccionada del grupo que comprende SEC. ID Nos :50 - 64.

En algunas realizaciones, un sitio de unión para CD47 de un anticuerpo de la presente invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende secuencias que son al menos un 90% homólogas a las secuencias seleccionadas del grupo que comprende las SEC. ID NO: 66 - 88, y un dominio variable de cadena ligera que comprende secuencias que son al menos un 90% homólogas a las secuencias seleccionadas del grupo que comprende las SEC. ID NO:89 - 106.

En algunas realizaciones, un sitio de unión para PD-L1 de un anticuerpo de la presente invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende secuencias que son al menos 80% homólogas a las siguientes secuencias:SEC. ID NO: 5, SEC. ID NO:16 y la SEC. ID NO: 21, es decir, comprende secuencias de aminoácidos de las SEC. ID NO: 5, 16 y 21 o la SEC. ID NO: 5 con 1 sustitución, la SEC. ID NO:16 con 1, 2 o 3 sustituciones, la SEC. ID NO:21 con 1, 2 o 3 sustituciones, y un dominio variable de cadena ligera que comprende secuencias que son al menos 80% homólogas a las siguientes secuencias: SEC. ID NO: 35, SEC. ID NO: 49 y SEC. ID NO: 65, es decir, comprende amino secuencias ácidas de SEC. ID NOs:35, 49 y 65 o SEC. ID NO: 35 con 1, 2 o 3 sustituciones, SEC. ID NO: 49 con 1 sustitución, SEC. ID NO: 65 con 1 o 2 sustituciones.

En algunas realizaciones, un sitio de unión para PD-L1 de un anticuerpo de la presente invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende las siguientes secuencias: SEC. ID NO: 5, SEC. ID NO:16 y SEC. ID NO:21, y dominio variable de cadena ligera que comprende las siguientes secuencias: SEC. ID NO: 35, SEC. ID NO: 49 y SEC. ID NO: 65.

En algunas realizaciones, un sitio de unión para CD47 de un anticuerpo de la presente invención es Fab, scFv, scFab o monodominios VH o VHH aislados.

En algunas realizaciones, un sitio de unión para PD-L1 de un anticuerpo de la presente invención es Fab, scFv, scFab o monodominios VH o VHH aislados.

En algunas realizaciones, un anticuerpo de la presente invención se caracteriza porque estimula la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, la fagocitosis
5 mediada por macrófagos y/o la citotoxicidad mediada por células T hacia células cubiertas con antígenos CD47 y/o PD-L1.

En algunas realizaciones, un anticuerpo de la presente invención se caracteriza porque comprende una porción Fc que comprende al menos una mutación o modificación que aumenta la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo
10 (ADCC), en comparación con el mismo anticuerpo sin mutación o modificación.

En algunas realizaciones, se pretende que un anticuerpo de la presente invención se use como un medicamento para el tratamiento del cáncer.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos anteriores.

15 En algunas realizaciones, un ácido nucleico de la presente invención es ADN.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende el ácido nucleico anterior.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir una célula huésped para preparar cualquiera de los anticuerpos anteriores, que
20 comprende la transformación de una célula con un vector de acuerdo con la presente invención.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una célula huésped que se usa para preparar cualquiera de los anticuerpos anteriores, comprendiendo dicha célula huésped el ácido nucleico anterior.

25 En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir cualquiera de los anticuerpos anteriores, que comprende cultivar una célula huésped en un medio de crecimiento en condiciones suficientes para producir dicho

anticuerpo, si es necesario, seguido de aislamiento y purificación del anticuerpo obtenido.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica usada para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno mediado por PD-L1 y CD47, que comprende cualquiera de los anticuerpos anteriores, en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En algunas realizaciones, se pretende que una composición farmacéutica de la invención se use para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno mediado por PD-L1 y CD47, seleccionándose dicha enfermedad o trastorno del grupo que comprende: (HNSCC) carcinoma escamocelular de cabeza y cuello, cáncer cervical, cáncer de origen primario desconocido, glioblastoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga, TNBC (cáncer de mama triple negativo), CCR (cáncer colorrectal), melanoma, CPCNP (cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de riñón, cáncer de ovario, MSI CRC (cáncer colorrectal con inestabilidad de microsatélite), leucemia (leucemia aguda o leucemia mieloblástica), linfoma, mieloma múltiple, cáncer de mama, cáncer de próstata, sarcoma, carcinoma hepatocelular, linfoma de Hodgkin, leucemia linfoblástica aguda de células T y células B, cáncer de pulmón de células pequeñas, leucemia mieloblástica aguda, linfoma de células B no Hodgkin refractario, linfoma folicular, linfoma de células B de zona marginal, linfoma difuso de células B grandes, cáncer pancreático, cáncer de ovario, y síndrome mielodisplásico de mayor riesgo.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para tratar una enfermedad o trastorno mediado por PD-L1 y CD47, que comprende administrar cualquiera de los anticuerpos anteriores, o una composición farmacéutica de la presente invención a un sujeto que necesita tal tratamiento, en una cantidad terapéuticamente eficaz.

En algunas realizaciones del método para el tratamiento de acuerdo con la presente invención, una enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que

comprende:(HNSCC) carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer cervical, cáncer de origen primario desconocido, glioblastoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga, TNBC (cáncer de mama triple negativo), CRC (cáncer colorrectal), carcinoma hepatocelular, melanoma, NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de riñón, cáncer de ovario, MSI CRC (cáncer colorrectal con inestabilidad de microsátélite), leucemia (leucemia aguda o leucemia mieloblástica), linfoma, mieloma múltiple, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, sarcoma, carcinoma hepatocelular, glioblastoma, linfoma de Hodgkin, leucemia linfoblástica aguda de células T y B, leucemia mieloblástica aguda linfoma de células B no Hodgkin refractario, linfoma folicular, linfoma de células B de zona marginal, linfoma difuso de células B grandes, cáncer de páncreas, cáncer de ovario y síndrome mielodisplásico del más alto riesgo.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para inhibir la actividad biológica de PD-L1 y/o CD47 en un sujeto que necesita tal inhibición, que comprende administrar una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos anteriores.

En un aspecto, la presente invención se refiere al uso de cualquiera de los anticuerpos anteriores o la composición farmacéutica anterior para el tratamiento de un sujeto que necesita tal tratamiento, de una enfermedad o trastorno mediado por PD-L1 y CD47.

En algunas realizaciones del uso de un anticuerpo de acuerdo con la presente invención, una enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que comprende:(HNSCC) carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer cervical, cáncer de origen primario desconocido, glioblastoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga, TNBC (cáncer de mama triple negativo), CRC (cáncer colorrectal), carcinoma hepatocelular, melanoma, NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de riñón, cáncer de ovario, MSI CRC (cáncer colorrectal con inestabilidad de microsátélite), leucemia (leucemia aguda o leucemia mieloblástica), linfoma, mieloma múltiple, cáncer de mama, cáncer de próstata,

cáncer de vejiga, sarcoma, carcinoma hepatocelular, glioblastoma, linfoma de Hodgkin, leucemia linfoblástica aguda de células T y B, leucemia mieloblástica aguda linfoma de células B no Hodgkin refractario, linfoma folicular, linfoma de células B de zona marginal, linfoma difuso de células B grandes, cáncer de páncreas, 5 cáncer de ovario y síndrome mielodisplásico del más alto riesgo.

Breve descripción de los dibujos.

Fig. 1 Mapa del plásmido utilizado para la producción transitoria de CD47-Fc humano en cultivo de células de mamífero CHO-K1.

Fig. 2. SDS-PAGE no reductor del producto CD47-Fc humano

10 Fig. 3. SDS-PAGE reductor del producto de control anti-CD47 anticuerpo B6H12

Fig. 4. SDS-PAGE no reductor del producto de control anti-CD47 anticuerpo B6H12.

15 Fig. 5. Diagrama de ELISA de fagos policlonales que llevan fragmentos de anticuerpos VHH que interactúan específicamente con el antígeno CD47 humano.

Fig. 6. Diagrama de la estructura del dominio de los anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/anti-CD47, donde A se basa en los fragmentos scFv anti-CD47 y B se basa en los fragmentos VHH anti-CD47. La porción de unión a PD-L1 se representa como un fragmento Fab.

20 Fig. 7. SDS-PAGE no reductor de productos de anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/anti-CD47 basados en fragmentos scFv anti-CD47.

Fig. 8. Reducción de SDS-PAGE de productos de anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/anti-CD47 basados en fragmentos de VHH anti-CD47.

25 Fig. 9. Efecto citotóxico como una función de la concentración de anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/anti-CD47 en cuestión.

Fig. 10. Efecto citotóxico como una función de la concentración de anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/anti-CD47 en cuestión.

Fig. 11. Eficacia de la fagocitosis de líneas celulares MDA-MB-231 por macrófagos humanos en presencia de anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/anti-
5 CD47.

Fig. 12. Nivel de fluorescencia como una función de la concentración de anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/anti-CD47 en cuestión.

Fig. 13. Nivel de fluorescencia como una función de la concentración de anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/anti-CD47 en cuestión.

10 Fig. 14. Nivel de fluorescencia como una función de la concentración de anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/anti-CD47 en cuestión.

Fig. 15. Nivel de fluorescencia como una función de la concentración de anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/anti-CD47 en cuestión.

Fig. 16. Actividad anti-PD-L1 de anticuerpos biespecíficos anti-PD-
15 L1/CD47. El eje vertical muestra la relación de luminiscencia en los pocillos que contienen los anticuerpos anti-CD47/PD-L1 en cuestión y la luminiscencia en los pocillos sin los anticuerpos en cuestión.

Fig. 17. Perfil de filtración en gel que muestra el nivel de homogeneidad de agregación de anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/anti-CD47.

20 **Descripción de la invención**

Definiciones y métodos generales.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica entiende comúnmente.

25 Además, a menos que el contexto lo requiera, los términos en singular incluirán pluralidades y los términos en plural incluirán el singular. Típicamente, la

clasificación y los métodos de cultivo celular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética, química analítica, química de síntesis orgánica, química médica y farmacéutica, así como la hibridación y química de proteínas y ácidos nucleicos descritos aquí son bien conocidos y ampliamente utilizados por los expertos en la técnica. Las reacciones enzimáticas y los métodos de purificación se realizan de acuerdo con las instrucciones del fabricante, como es común en la técnica, o como se describe en el presente documento.

Definiciones relacionadas con los anticuerpos

PD-L1 (ligando de muerte programada 1) también conocido como grupo de diferenciación 274 (CD274) u B7 homólogo 1 (B7-H1) es una proteína transmembrana de tipo 1 de 40 kDa. PD-L1 consta de 3 dominios, a saber: dominio extracelular, representado por los dominios Ig de tipo V y C (220), dominio transmembrana (21) y dominio intracelular (31). Juega un papel importante en la supresión del sistema inmunológico durante el embarazo, durante el trasplante de tejidos extraños y en ciertas enfermedades, como la hepatitis. En condiciones normales, durante una respuesta a los autoantígenos, se acumula una cierta cantidad de células efectoras CD8 + T específicas del antígeno en los ganglios linfáticos y el bazo, para prevenir un proceso autoinmunológico, se forman complejos PD-1/PD-L1 o B7-1/PD-L1, lo que produce la transmisión de una señal inhibitoria que reduce la proliferación de dichas células T CD8 + en los ganglios linfáticos. Por lo tanto, la interacción PD-1/PD-L es uno de los factores clave en el desarrollo de la tolerancia inmunológica.

CD47, es un receptor transmembrana que abarca múltiples áreas y pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas, interactúa con SIRP α (proteína reguladora de señal α) en macrófagos, lo que suprime la fagocitosis. Las células cancerosas, en las que esta vía está activa, evitan la fagocitosis. Por lo tanto, es común en varias enfermedades cancerosas apuntar a CD47. Los anticuerpos anti-CD47 pueden tener, o pueden no tener, la capacidad de bloquear la interacción entre CD47 y SIRP α .

El término "molécula de unión" incluye a anticuerpos e inmunoglobulinas.

El término "anticuerpo" o "inmunoglobulina" o "anticuerpo monoclonal" o "anticuerpo biespecífico" o "anticuerpo multiespecífico" (Ig), como se usa en este documento, incluye un anticuerpo completo/de longitud completa y cualquier
5 fragmento de unión a antígeno (es decir "porción de unión a antígeno"). Además, por ejemplo, los términos "anticuerpo" o "inmunoglobulina" o "anticuerpo monoclonal" incluyen cualquier combinación de fragmentos de unión a antígeno, que tienen una o más valencias y una o más especificidades, y regiones constantes de inmunoglobulinas, y puede haber un significado análogo de los términos
10 "anticuerpo biespecífico" o "anticuerpo multiespecífico". Además, por ejemplo, los términos "anticuerpo" o "inmunoglobulina" o "anticuerpo monoclonal" incluyen cualquier combinación de fragmentos de unión a antígeno y regiones constantes de inmunoglobulinas, unidas de forma covalente o no covalente a cualquier polipéptido de cualquier naturaleza. Además, el término "anticuerpo", por ejemplo, se refiere a
15 una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción de unión a antígeno. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada aquí como VH) y una región constante de cadena pesada. Se conocen cinco tipos de cadenas pesadas de Ig de mamíferos indicadas por letras griegas: α , δ , ϵ , γ y μ . El
20 tipo de una cadena pesada presente define la clase de un anticuerpo; estas cadenas se encuentran en los anticuerpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente. Las distintas cadenas pesadas difieren en tamaño y composición; α y γ contienen aproximadamente 450 aminoácidos, mientras que μ y ϵ tienen aproximadamente 550 aminoácidos. Cada cadena pesada tiene dos regiones, la región constante y la región
25 variable. La región constante es idéntica en todos los anticuerpos del mismo isotipo, pero difiere en los anticuerpos de diferentes isotipos. Las cadenas pesadas γ , α y δ tienen una región constante compuesta por tres dominios constantes CH1, CH2 y CH3 (en una línea), y una región bisagra para mayor flexibilidad (Woof J., Burton D., Nat Rev Immunol 4, 2004, cc.89-99); las cadenas pesadas μ y ϵ tienen una región

constante compuesta por cuatro dominios constantes CH1, CH2, CH3 y CH4. En los mamíferos, se conocen solo dos tipos de cadenas ligeras indicadas por lambda (λ) y kappa (κ). Cada cadena ligera consta de una región variable de cadena ligera (abreviada aquí como VL) y una región constante de cadena ligera. La longitud aproximada de una cadena ligera es de 211 a 217 aminoácidos. Preferiblemente, la cadena ligera es una cadena ligera kappa (κ), y el dominio constante CL es preferiblemente C kappa (κ).

Los "anticuerpos" según la invención pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, preferiblemente IgG), o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2, preferiblemente IgG1).

Las regiones VL y VH se pueden subdividir en regiones de hiper-variabilidad denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas entre regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores huésped, incluidas varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema del complemento clásico.

El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo o "fragmento de unión a antígeno" (o simplemente "porción de anticuerpo" o "fragmento de anticuerpo"), como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión que se incluyen dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) fragmento de Fab monovalente, fragmento que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH 1; (ii) fragmento F(ab')₂,

un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (v) fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que
5 consiste en un dominio VH/VHH; y (vi) región determinante de complementariedad extraída (CDR). Además, dos regiones del fragmento Fv, VL y VH, están codificadas por genes separados, se pueden unir usando métodos recombinantes que usan un enlazador sintético que les permite recibir una cadena de proteína única en la que las regiones VL y VH están emparejadas para formar moléculas monovalentes
10 (conocidas como Fv de cadena simple (scFv); ver, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; и Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Se supone que dichas moléculas de cadena sencilla también se incluyen dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por los
15 expertos en la técnica, y los fragmentos se seleccionan de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Preferiblemente, la CDR de la porción de unión al antígeno o la porción de unión al antígeno del anticuerpo completo de la invención deriva de una biblioteca de ratón, llama o donante humano o sustancialmente de origen humano con ciertos
20 residuos de aminoácidos alterados, por ejemplo, sustituidos con diferentes residuos de aminoácidos en para optimizar las propiedades de los anticuerpos específicos, por ejemplo, KD, koff, IC50, EC50, ED50. Preferiblemente, las regiones marco de los anticuerpos de la invención son de origen humano o sustancialmente de origen humano (al menos 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99% de origen humano).

25 En otras realizaciones, la porción de unión a antígeno de la invención puede derivarse de otras especies no humanas que incluyen ratón, llama, conejo, rata o hámster, pero no se limita a éstas. Alternativamente, la región de unión a antígeno puede derivarse de la especie humana.

El término "dominio variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren enormemente en secuencia entre los anticuerpos. El dominio V media en la unión del antígeno y determina la especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no
5 está distribuida uniformemente en el intervalo de 110 aminoácidos de los dominios variables. En cambio, las regiones V consisten en fragmentos invariantes llamados regiones marco (FR) de 15-30 aminoácidos separados por regiones más cortas de variabilidad extrema llamadas "regiones hipervariables" o CDR. Los dominios variables de las cadenas ligera y pesada nativas comprenden cuatro FR, que adoptan
10 en gran parte una configuración de hoja beta, conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que se conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de la hoja beta. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en las proximidades de las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los
15 anticuerpos. Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben varias funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

El término "región hipervariable", como se usa en el presente documento, se
20 refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión del antígeno. La región hipervariable generalmente comprende residuos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable".

En ciertos casos, también puede ser deseable alterar uno o más residuos de
25 aminoácidos de CDR para mejorar la afinidad de unión al epítipo diana. Esto se conoce como "maduración de afinidad" y puede realizarse opcionalmente en relación con la humanización, por ejemplo, en situaciones en las que la humanización de un anticuerpo conduce a una especificidad o afinidad de unión reducida y no es posible mejorar suficientemente la especificidad o afinidad de unión

solamente mediante mutaciones secundarias. En la técnica se conocen varios métodos de maduración de afinidad, por ejemplo, el método de mutagénesis de saturación de barrido in vitro descrito por Burks et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94:412–417 (1997) y el método de maduración de afinidad in vitro por etapas de Wu. et al., Proc Natl Acad Sci USA 95:6037 6042 (1998).

Las "regiones marco" (FR) son aquellos residuos de dominio variable distintos de los residuos de CDR. Cada dominio variable normalmente tiene cuatro FR identificadas como FR1, FR2, FR3 y FR4. Si las CDR se definen de acuerdo con Kabat, los residuos de la cadena ligera FR se posicionan en los residuos 1-23 (LCFR1), 35-49 (LCFR2), 57-88 (LCFR3), y 98-107 (LCFR4) y los residuos FR de la cadena pesada se posicionan aproximadamente en los residuos 1-30 (HCFR1), 36-49 (HCFR2), 66-94 (HCFR3) y 103-113 (HCFR4) en la cadena pesada. Si las CDR comprenden residuos de aminoácidos de bucles hipervariables, los residuos de FR de cadena ligera se colocan en los residuos 1-25 (LCFR1), 33-49 (LCFR2), 53-90 (LCFR3) y 97-107 (LCFR4) en la cadena ligera y los residuos de FR de la cadena pesada se posicionan aproximadamente en los residuos 1-25 (HCFR1), 33-52 (HCFR2), 56-95 (HCFR3) y 102-113 (HCFR4) en los residuos de la cadena pesada. En algunos casos, cuando la CDR comprende aminoácidos tanto de una CDR como la define Kabat y los de un bucle hipervariable, los residuos de FR se ajustarán en consecuencia. Por ejemplo, cuando CDRH1 incluye los aminoácidos H26-H35, los residuos de la cadena pesada FR1 están en las posiciones 1-25 y los residuos de la FR2 están en las posiciones 36-49.

Un anticuerpo de la presente invención "que se une" a un antígeno diana se refiere a un anticuerpo capaz de unirse al antígeno con una afinidad suficiente de tal manera que el anticuerpo se puede usar como agente de diagnóstico y/o terapéutico dirigido a una proteína o célula que expresa dicho antígeno, y tiene una leve reacción cruzada con otras proteínas. De acuerdo con los métodos analíticos: clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), radioinmunoensayo (RIA) o ELISA, en tales realizaciones, el grado de unión del anticuerpo a una proteína no diana es

inferior al 10% de la unión del anticuerpo a una proteína diana específica. Con respecto a la unión de un anticuerpo a una molécula diana, el término "unión específica" o "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítipo en una proteína polipeptídica particular, significa una unión que es notoriamente (mensurablemente) diferente de una interacción no específica (por ejemplo, en el caso de bH1-44 o bH1-81, una interacción no específica es la unión a la albúmina de suero bovino, la caseína, el suero bovino fetal o la neutravidina).

La unión específica se puede medir, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control. Por ejemplo, la unión específica puede ser determinada mediante competencia con una molécula de control que es similar a la diana, por ejemplo, un exceso de diana no marcada. En este caso, se indica la unión específica si la unión de la diana marcada a una sonda es inhibida competitivamente por el exceso de diana no marcada. Tal como se usa en el presente documento, el término "unión específica" o "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido específico puede ser descrito por una molécula que tiene una K_d para el objetivo de al menos aproximadamente 200 nM, o al menos aproximadamente 150 nM, o al menos aproximadamente 100 nM, o al menos aproximadamente 60 nM, o al menos aproximadamente 50 nM, o al menos aproximadamente 40 nM, o al menos aproximadamente 30 nM, o al menos aproximadamente 20 nM, o al menos aproximadamente 10 nM, o al menos aproximadamente 8 nM, o al menos aproximadamente 6 nM, o al menos aproximadamente 4 nM, o al menos aproximadamente 2 nM, o al menos aproximadamente 1 nM, o más. En una realización, el término "unión específica" se refiere a la unión en la que una molécula se une a un polipéptido o epítipo particular en un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a cualquier otro polipéptido o epítipo polipeptídico.

El término " K_a ", como se usa en el presente documento, se refiere al coeficiente de asociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno, mientras

que el término "Kd" tiene el propósito de referirse a la tasa de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno.

La "afinidad de unión" generalmente se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su pareja de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca (característica, verdadera) que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su pareja de unión Y generalmente puede representarse por la constante de disociación (Kd). El valor de Kd preferido es aproximadamente 200 nM, 150 nM, 100 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 8 nM, 6 nM, 4 nM, 2 nM, 1 nM o menos. La afinidad se puede medir mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluidos los descritos en este documento. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen a un antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen a un antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos por más tiempo. En la técnica se conoce una variedad de métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales se pueden usar para los fines de la presente invención.

En una realización, "Kd" o el "valor Kd " se mide utilizando ensayos de resonancia plasmónica de superficie usando BIAcore™ -2000 o BIAcore®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 de antígeno inmovilizado en ~ 10 unidades de respuesta (RU). Brevemente, los chips biosensores de dextrano carboximetilados (CM5, BIAcore Inc.) se activan con N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida clorhidrato (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del fabricante. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4.8, en 5 µg/ml (~ 0.2 µM) y luego se inyecta a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Después de la inyección de antígeno, se inyecta una solución de etanolamina 1M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para mediciones

cinéticas, se inyectan diluciones en serie de Fab (por ejemplo, de 0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05% (PBST) a 25°C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Los coeficientes de activación (kon) y de desactivación (koff) se calculan utilizando un modelo de enlace Langmuir simple de uno a uno (BIAcore Evaluation Software versión 3.2) mediante el ajuste simultáneo del sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (Kd) se calcula como la relación koff/kon. Véase, por ejemplo, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881. Si la velocidad de activación supera los $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia plasmónica de superficie anteriormente mencionado, la velocidad de activación puede determinarse utilizando una técnica de extinción fluorescente que mide el aumento o la disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25°C de una solución de anticuerpo antígeno-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7.2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno según medición en un espectrómetro, como un espectrofómetro equipado con flujo de parada (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-Aminco de la serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta para revolver.

El término "koff" se refiere a la constante de velocidad de desconexión de una interacción particular entre una molécula de unión y un antígeno. La constante de velocidad de apagado koff se puede medir utilizando la interferometría de biocapa, por ejemplo, utilizando el sistema Octet TM.

La velocidad de conexión, "on-rate", o "kon" de acuerdo con la presente invención también se puede medir usando los ensayos de resonancia de plasmones de superficie anteriores utilizando BIAcore TM -2000 o BIAcore®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips de antígeno CM5 inmovilizado en ~ 10 unidades relativas (unidades de respuesta, RU). Brevemente, los chips biosensores de dextrano carboximetilados (CM5, BIAcore Inc.) se activan con N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida clorhidrato (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del fabricante. El antígeno se diluye con acetato de

sodio 10 mM, pH 4.8, en 5 µg/ml (~ 0.2 µM) y luego se inyecta a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Tras la inyección de antígeno, se inyecta 1M de una solución de etanolamina para bloquear los grupos que no han reaccionado.

5 A menos que se especifique lo contrario, el término "biólogicamente activo" y "actividad biológica" y "características biológicas" con respecto a un polipéptido de la invención significa que tiene la capacidad de unirse a una molécula biológica.

 El término "molécula biológica" se refiere a un ácido nucleico, una proteína, un carbohidrato, un lípido y combinaciones de los mismos. En una realización, la
10 molécula biológica existe en la naturaleza.

 Los fragmentos de anticuerpos, como los fragmentos Fab y F (ab')₂, pueden prepararse a partir de anticuerpos completos utilizando técnicas convencionales, como la digestión con papaína o pepsina de anticuerpos completos. Además, pueden prepararse anticuerpos, porciones de los mismos y moléculas de inmunoadhesión
15 usando técnicas de ADN recombinante estándar, por ejemplo, como se describe en el presente documento.

 El término "anticuerpo recombinante" quiere referirse a un anticuerpo que se expresa en una célula o línea celular que comprende secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos, en la que dichas secuencias de nucleótidos no están asociadas
20 de forma natural con la célula.

 Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo variante" se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo "parental" del mismo mediante el agregado, la eliminación y/o la sustitución de un o más residuos de aminoácidos en
25 comparación con la secuencia de un anticuerpo parental. En una realización preferida, un anticuerpo variante comprende al menos uno o más (por ejemplo, uno a doce, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve, diez, once o doce; en algunas realizaciones, un el anticuerpo variante comprende de una a

aproximadamente diez adiciones, deleciones y/o sustituciones de aminoácidos en comparación con un anticuerpo parental. En algunas realizaciones, tales adiciones, eliminaciones y/o sustituciones se realizan en las CDR de un anticuerpo variante. La identidad u homología con respecto a la secuencia de un anticuerpo variante se define aquí como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia del anticuerpo variante que son idénticos a los residuos del anticuerpo parental, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia. Un anticuerpo variante conserva la capacidad de unirse al mismo antígeno, y preferiblemente a un epítopo, al que se une el anticuerpo parental; y en algunas realizaciones, al menos una propiedad o actividad biológica son superiores a las de un anticuerpo parental. Por ejemplo, un anticuerpo variante puede tener, por ejemplo, una afinidad de unión más fuerte, una vida media más larga, una CI50 más baja o una capacidad mejorada para inhibir la actividad biológica del antígeno en comparación con un anticuerpo parental. La variante de anticuerpo de particular interés en este documento es una que demuestra al menos 2 veces, (preferiblemente al menos 5 veces, 10 veces o 20 veces) el aumento de la actividad biológica en comparación con un anticuerpo parental.

El término "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo que tiene uno o varios dominios de unión a antígeno que son capaces de unirse específicamente a dos epítopos diferentes en una única molécula biológica o capaces de unirse específicamente a epítopos en dos moléculas biológicas diferentes. El anticuerpo biespecífico también se denomina en el presente documento como que tiene una "especificidad dual" o que es un anticuerpo de "especificidad dual".

En un sentido amplio, el término "anticuerpo quimérico" pretende referirse a un anticuerpo que comprende una o más regiones de un anticuerpo, y una o más regiones de uno o varios otros anticuerpos, típicamente, un anticuerpo parcialmente humano y un anticuerpo no humano, es decir, derivado parcialmente de un animal no humano, como se ratones, ratas o parásitos similares, o camélidos, como llamas y alpacas. Los anticuerpos quiméricos generalmente se prefieren a los anticuerpos

no humanos con el fin de reducir el riesgo de una respuesta inmunitaria anti-anticuerpo humano, por ej., una respuesta inmunitaria del anticuerpo anti-ratón humano en el caso de un anticuerpo murino. Un ejemplo de un anticuerpo quimérico típico es uno en el que las secuencias de la región variable son secuencias murinas, mientras que las secuencias de la región constante son humanas. En el caso de un anticuerpo quimérico, las partes no humanas pueden ser sometidas a una alteración adicional para humanizar el anticuerpo.

El término "humanización" se refiere al hecho de que cuando un anticuerpo tiene un origen total o parcialmente no humano, por ejemplo, un anticuerpo de ratón o llama obtenido inmunizando ratones o llamas, respectivamente, con un antígeno de interés, o es un anticuerpo quimérico basado en dicho anticuerpo de un ratón o una llama, es posible sustituir ciertos aminoácidos, en particular en las regiones marco y dominios constantes de cadenas pesadas y ligeras, para evitar o minimizar la respuesta inmunitaria en humanos. Los anticuerpos interactúan con los antígenos diana predominantemente a través de los residuos de aminoácidos que se encuentran en las seis CDR de cadena pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son mucho más variables entre los anticuerpos individuales que los que están fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de un anticuerpo natural específico, o más generalmente, de cualquier anticuerpo específico con dicha secuencia de aminoácidos, por ejemplo, construyendo vectores de expresión que expresan secuencias CDR del anticuerpo específico y secuencias marco de un anticuerpo diferente. Como resultado, es posible "humanizar" un anticuerpo no humano y, en gran medida, preservar la especificidad de unión y la afinidad del anticuerpo inicial. Aunque no es posible predecir con precisión la inmunogenicidad y, por lo tanto, la respuesta del anticuerpo humano a un anticuerpo particular, los anticuerpos no humanos son típicamente más inmunogénicos que los anticuerpos humanos. Los anticuerpos quiméricos, donde las regiones constantes

extrañas (p. ej., parásitos o camélidos) han sido sustituidas por secuencias de origen humano, han demostrado ser generalmente menos inmunogénicos que los de origen totalmente extraño, y la tendencia de los anticuerpos terapéuticos es hacia anticuerpos humanizados o completamente humanos. Por lo tanto, los anticuerpos quiméricos u otros anticuerpos de origen no humano pueden humanizarse para reducir el riesgo de una respuesta humana anti-anticuerpos.

Para los anticuerpos quiméricos, la humanización típicamente implica la modificación de las regiones *marco* de las secuencias de región variable. Los residuos de aminoácidos que forman parte de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) a menudo no se modificarán en virtud de la humanización, aunque en algunos casos puede ser deseable para modificar los residuos de aminoácidos individuales de una CDR, por ejemplo, para eliminar un sitio de glicosilación, sitio de deamidación, sitio de isomerización de aspartato o residuos de cisteína o metionina no deseados. La glicosilación ligada a N se realiza mediante la unión de una cadena de oligosacáridos a un residuo de asparagina en una secuencia tripeptídica Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro. La eliminación de un sitio de N-glicosilación se puede lograr mediante la mutación del residuo Asn o Ser/Thr por un residuo diferente, preferiblemente mediante una sustitución conservadora. La desamidación de los residuos de asparagina y glutamina puede ocurrir dependiendo de factores tales como el pH y la exposición a la superficie. Los residuos de asparagina son especialmente susceptibles a la desamidación, principalmente cuando están presentes en la secuencia Asn-Gly, y en menor grado en otras secuencias dipeptídicas tales como Asn-Ala. Siempre que una secuencia de CDR comprenda tal sitio de desamidación, en particular Asn-Gly, puede ser deseable eliminar este sitio, típicamente en virtud de una sustitución conservadora para eliminar uno de los residuos implicados.

En la técnica se conocen numerosos métodos para la humanización de una secuencia de anticuerpos. Un método comúnmente utilizado es el injerto de CDR.

El injerto de CDR puede basarse en las definiciones de CDR de Kabat, aunque la última edición (Magdelaine-Beuzelin y otros, Crit Rev.Oncol Hematol. 64:210-225 (2007)) sugiere que la definición de IMGT® (el sistema de información internacional ImMunoGeneTics®, www.imgt.org) puede mejorar los resultados de humanización (ver Lefranc et al., Dev. Comp Immunol. 27:55-77 (2003)). En algunos casos, el injerto de CDR puede reducir la especificidad y la afinidad de unión, y por lo tanto la actividad biológica, de un anticuerpo no humano injertado en CDR, en comparación con un anticuerpo parental del cual se obtuvieron las CDR. Pueden introducirse mutaciones posteriores (que a veces se denominan "reparación de la región marco") en posiciones seleccionadas de un anticuerpo injertado en CDR, típicamente en regiones marco, para restablecer la especificidad de unión y la afinidad de un anticuerpo parental. La identificación de posiciones para posibles mutaciones invertidas se puede realizar utilizando la información disponible en la literatura y en las bases de datos de anticuerpos. Los residuos de aminoácidos que son candidatos para mutaciones invertidas son típicamente aquellos que se encuentran en la superficie de una molécula de anticuerpo, mientras que los residuos están enterrados o tienen un grado bajo normalmente de exposición a la superficie no se alterarán normalmente. Está resurgiendo una técnica de humanización alternativa al injerto de CDR y la mutación invertida, en la que se conservan los residuos de origen no humano no expuestos a la superficie, mientras que los residuos de la superficie se alteran a los residuos humanos.

Pueden generarse anticuerpos totalmente humanos usando dos técnicas: usando bibliotecas de fagos recogidos *in vitro* o mediante inmunización *in vivo* de animales humanizados (ratones, ratas, etc.).

La visualización de fagos es una de las técnicas *in vitro* más poderosas y ampliamente utilizadas para la búsqueda de anticuerpos. En 1985, Smith descubrió que las secuencias de ADN extraño podían clonarse en el bacteriófago M13 filamentoso y que tal secuencia clonada puede expresarse en la superficie de las partículas del fago como proteínas de fusión (Smith GP: *Filamentous fusion phage*:

novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science 1985, 228:1315-1317.). Por lo tanto, es posible seleccionar las proteínas de fusión de interés en función de su capacidad para unirse a otras proteínas. Este descubrimiento se combinó con los métodos de amplificación por PCR, que hicieron

5 posible clonar el repertorio de ADNc de los genes de inmunoglobulina para crear una variedad de bibliotecas de fagos que contienen dominios variables que se pueden usar para buscar rápidamente anticuerpos monoclonales específicos de la meta buscada. El repertorio de la biblioteca de fagos refleja el repertorio del anticuerpo de células B de cada persona o animal cuya sangre se utilizó para crear la biblioteca.

10 En 1995, dos artículos informaron sobre la generación de ratones modificados genéticamente que expresaban repertorios de anticuerpos completamente humanos que podrían ser comparables a los producidos por la tecnología de hibridomas (Lonberg N, Taylor LD, Harding FA, Trounstein M, Higgins KM, Schramm SR, Kuo CC), Mashayekh R, Wymore K, McCabe JG et al.: *Antigen-specific human*

15 *antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications* (Nature 1994, 368:856-859). A estos animales, se les destruyeron deliberadamente sus propios genes de la cadena de inmunoglobulina pesada y ligera endógena k, luego de lo cual se introdujeron transgenes, que son los segmentos de los genes de la cadena ligera y pesada k humana. Resultó que el sistema inmunitario del ratón puede utilizar el

20 repertorio genético humano para producir anticuerpos de alta especificidad y alta afinidad contra una mayor variedad de antígenos. A pesar de que los ratones transgénicos expresan receptores de células B que son esencialmente híbridos de componentes humanos y de ratón (inmunoglobulina humana, Igα de ratón, Igβ y otras moléculas de señalización), sus células B se desarrollan y maduran

25 normalmente.

En ciertos casos, también puede ser deseable alterar uno o más residuos de aminoácidos de CDR para mejorar la afinidad de unión al epítipo diana. Esto se conoce como "maduración de afinidad" y puede realizarse opcionalmente en relación con la humanización, por ejemplo, en situaciones en las que la

humanización de un anticuerpo conduce a una especificidad o afinidad de unión reducida y no es posible mejorar suficientemente la especificidad o afinidad de unión solamente mediante mutaciones secundarias. En la técnica se conocen varios métodos de maduración de afinidad, por ejemplo, el método de mutagénesis de saturación de barrido *in vitro* descrito por Burks et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94:412–417 (1997) y el método de maduración de afinidad por etapas *in vitro* de Wu. et al., Proc Natl Acad Sci USA 95:6037 6042 (1998).

El término "anticuerpo monoclonal" o "mAb" se refiere a un anticuerpo que se sintetiza y se aísla de una población de células clónicas separadas. La población clonal puede ser una población clonal de células inmortalizadas. En algunas realizaciones, las células inmortalizadas en una población clonal son células híbridas (hibridomas), producidas típicamente por la fusión de linfocitos B individuales de animales inmunizados con células individuales de un tumor linfocítico. Los hibridomas son un tipo de células construidas y no existen en la naturaleza.

Los "anticuerpos nativos" son generalmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltones, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracadena espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo. El dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada.

El término "aislado" utilizado para describir varios anticuerpos en esta descripción se refiere a un anticuerpo que ha sido identificado y separado y/o

regenerado a partir de una célula o cultivo celular, en el que se expresa el anticuerpo. Las impurezas (componentes contaminantes) de su entorno natural son materiales que podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, un anticuerpo se purifica (1) a un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria (secuenciador Edman), o (2) hasta la homogeneidad mediante SDS PAGE en condiciones no reductoras o reductoras usando Coomassie Brilliant Blue, o preferiblemente tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes, ya que al menos un componente del ambiente natural del polipéptido no estará presente. El polipéptido aislado se prepara típicamente mediante al menos una etapa de purificación.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una que está identificada y separada de al menos una impureza de la molécula de ácido nucleico, a la que se primera está unida en la fuente natural del ácido nucleico del anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislada es diferente de la forma o conjunto en el que se encuentra en condiciones naturales. Por lo tanto, una molécula de ácido nucleico aislada es diferente de una molécula de ácido nucleico que existe en las células en condiciones naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico ubicada en células en las que el anticuerpo se expresa normalmente, por ejemplo, si la molécula de ácido nucleico tiene una localización cromosómica que es diferente de su localización en células en condiciones naturales.

El término "epítipo", como se usa en el presente documento, pretende referirse a una parte (determinante) de un antígeno que se une específicamente a una molécula de unión (por ejemplo, un anticuerpo o una molécula relacionada, como una molécula de unión biespecífica). Los determinantes de los epítipos generalmente consisten en agrupamientos de moléculas químicamente activas en la superficie tales como aminoácidos o carbohidratos o cadenas laterales de azúcar y

que típicamente comprenden características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítomos pueden ser "lineales" o "conformacionales". En un epítomo lineal, todos los puntos de interacción entre una proteína (por ejemplo, un antígeno) y una molécula interactiva (como un anticuerpo) ocurren linealmente a lo largo de la secuencia de aminoácidos primaria de la proteína. En un epítomo conformacional, los puntos de interacción se producen a través de los residuos de aminoácidos en la proteína que están separados entre sí en la secuencia de aminoácidos primaria. Una vez que se determina el epítomo deseado de un antígeno, es posible generar anticuerpos contra ese epítomo usando técnicas bien conocidas en la técnica. Además, la generación y caracterización de anticuerpos u otras moléculas de unión pueden dilucidar información sobre epítomos deseables. A partir de esta información, es posible, entonces, seleccionar de manera competitiva los anticuerpos para determinar su unión a epítomos idénticos o idénticos, por ejemplo, mediante la realización de estudios de competición para encontrar moléculas de unión que compitan entre sí por la unión al antígeno.

El término "enlazador de péptidos" como se usa en este documento se refiere a cualquier péptido que tenga la capacidad de combinar dominios, con una longitud que depende de los dominios a los que une entre sí, y que comprende cualquier secuencia de aminoácidos. Preferiblemente, el enlazador peptídico tiene una longitud de más de 5 aminoácidos y consiste en cualquier conjunto de aminoácidos seleccionados de G, A, S, P, E, T, D, K.

El término "in vitro" se refiere a una entidad biológica, un proceso biológico o una reacción biológica fuera del cuerpo en condiciones artificiales. Por ejemplo, una célula desarrollada in vitro debe entenderse como una célula desarrollada en un entorno fuera del cuerpo, por ejemplo, en un tubo de ensayo, un vial de cultivo o una placa de microtitulación.

El término "IC₅₀" (concentración inhibitoria al 50%), según se lo usa en el presente documento, se refiere a concentraciones de fármaco, en las cuales una

actividad o respuesta medible, por ejemplo, el crecimiento o la proliferación de células tales como células tumorales, es inhibida en un 50%. El valor IC_{50} puede ser calculado usando curvas apropiadas de dosificación-respuesta, utilizando software de estadísticas especial para la adecuación de las curvas.

5 El término GI_{50} (inhibición del crecimiento al 50%) se refiere a las concentraciones de la droga, en la que se inhibe a un 50% la proliferación de las células.

El término “ED50” (EC_{50}) (dosis/concentración efectiva en un 50%) se refiere a la concentración de la droga para producir un efecto biológico al 50% (que
10 puede incluir citotoxicidad).

El término "función efectora" del anticuerpo se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (secuencia de la región Fc nativa o variantes de aminoácidos de la región Fc) de un anticuerpo, que varía con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a
15 Clq y citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación hacia abajo de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B, BCR) y activación de células B.

"Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una
20 respuesta mediada por células, en la que las células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar la ADCC, células NK, expresan $Fc\gamma RII$ solamente, mientras que los monocitos
25 expresan $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RII$ y $Fc\gamma RIII$. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo in vitro de ADCC, como el que se describe en las patentes

de EE.UU. Nos. 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse in vivo, por ejemplo, en un modelo animal
5 tal como el descrito en Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan la función de efector de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica
10 (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; prefiriéndose las PBMC y las células NK. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa de las mismas, por ejemplo, de sangre o PBMC como se describe en el presente documento.

Los términos "receptor de Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que
15 se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII (FcγRIIa y FcγRIIb), y FcγRIII (FcγRIIIa y FcγRIII), incluidas las variantes alélicas y las formas alternativamente empalmadas de estos receptores. FcγRI exhibe alta afinidad
20 con IgG, mientras que FcγRII y FcγRIII exhiben bajas afinidades. FcγRIIa y FcγRIIIa son activadores de FcγR que se expresan en monocitos/macrófagos y monocitos/macrófagos/células asesinas naturales, respectivamente, y son capaces de desencadenar la citotoxicidad de las células diana humanas. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo activador de inmunoreceptor basado en
25 tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo inhibidor del inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (ver la revisión en Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). Los FcR han sido estudiados en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991). Otros FcR, incluidos los que se identificarán en el futuro, están incluidos en

el término "FcR" en este documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto.

"Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la capacidad de una molécula para lisar una diana en presencia de un complemento. La vía de activación del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) complejo (combinado) con un antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996).

El término "identidad" u "homología" se interpreta como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los residuos de una secuencia correspondiente con la que se la compara, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario para lograr el porcentaje máximo de identidad para toda la secuencia y sin considerar sustituciones conservantes como parte de la identidad de la secuencia. Ni las extensiones N o C-terminal ni las inserciones se interpretarán como una reducción de la identidad u homología. Los métodos y programas informáticos para la alineación son bien conocidos en la técnica. La identidad de la secuencia se puede medir utilizando un software de análisis de secuencia (por ejemplo, el Paquete de software de análisis de secuencia, Genetics Computer Group, Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin, 1710 University Ave., Madison, WI 53705). Este software encuentra secuencias similares asignando un grado de homología a varias sustituciones, eliminaciones (supresiones) y otras modificaciones.

El término "homólogo" con respecto a una secuencia polipeptídica de un anticuerpo debe interpretarse como un anticuerpo que exhibe al menos un 70%, preferiblemente un 80%, más preferiblemente un 90% y más preferiblemente un 95%, de identidad de secuencia respecto de una secuencia polipeptídica. El término en relación con una secuencia de ácido nucleico debe interpretarse como una secuencia de nucleótidos que demuestra al menos el 85%, preferiblemente el 90%,

más preferiblemente el 95% y más preferiblemente el 97% de identidad de secuencia respecto de una secuencia de ácido nucleico.

Se proporcionan modificaciones de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos descritos en este documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/o otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo, o mediante síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, supresiones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución se realiza para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos posteriores a la traducción en el anticuerpo, como cambiar el número o la posición de los sitios de glicosilación.

Modificaciones de las variantes de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos que usan sustituciones de aminoácido. Dicho tipo de variante es una sustitución de por lo menos un residuo de aminoácido en la molécula del anticuerpo con un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis sustitucional incluyen regiones hipervariables o CDR, pero también se contemplan alteraciones FR o FC. Las sustituciones de conservación se ilustran en el Cuadro A bajo el título “sustituciones preferidas”. Si dichas sustituciones causan la alteración de la actividad biológica, pueden realizarse otros cambios, que son referidos como “ejemplos de sustituciones” en el Cuadro A, o las alteraciones descritas con más detalle a continuación, cuando se describen las clases de aminoácidos, y también pueden realizarse el análisis del producto.

Cuadro A		
Residuo Original	Ejemplos de Sustituciones	Sustituciones Preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val

Arg(R)	Lys; Gin; Asn	Lys
Asn(N)	Gin; His; Asp, Lys; Arg	Gin
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln(Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gin	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gin; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine	Leu
Leu (L)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gin; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe(F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp(W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine	Leu

Los términos "ácido nucleico", "secuencia nucleica", "secuencia de ácido nucleico", "polinucleótido", "oligonucleótido", "secuencia de polinucleótido" y "secuencia de nucleótidos", usados indistintamente en la presente descripción, significan una secuencia precisa de nucleótidos, modificado o no, determinando un fragmento o una región de un ácido nucleico, que contenga nucleótidos no naturales o no, y que sea un ADN o ARN bicatenario, un ADN o ARN monocatenario o productos de transcripción de dichos ADN.

También debería mencionarse aquí que la presente invención no se relaciona con secuencias de nucleótidos en su entorno cromosómico natural, es decir, en un estado natural. Las secuencias de la presente invención han sido aisladas y/o purificadas, es decir, se muestrearon directa o indirectamente, por ejemplo, mediante una copia, habiéndose modificado al menos parcialmente su entorno. Por lo tanto,

también deben mencionarse aquí los ácidos nucleicos aislados obtenidos por genética recombinante, por ejemplo, por medio de células huésped, u obtenidos por síntesis química.

Una referencia a una secuencia de nucleótidos abarca a su complemento, a menos que se especifique lo contrario. Por lo tanto, una referencia a un ácido nucleico que tiene una secuencia particular debe entenderse como una que abarca su cadena complementaria la misma con su secuencia complementaria.

El término "secuencias de control" se refiere a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia de operador y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

El ácido nucleico está "unido operativamente" cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una secuencia líder o una secuencia secretora está unido operativamente al ADN para un polipéptido si está expresado como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia; un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia de codificación si está posicionado para facilitar la traducción. En general, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que están vinculadas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos.

El término "vector" como se usa en este documento significa una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha enlazado. En algunas realizaciones, un vector es un plásmido, es decir, una pieza circular de ADN de doble cadena en la que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. En

algunas realizaciones, un vector es un vector viral, en el que segmentos de ADN adicionales pueden ligarse en el genoma viral. En algunas realizaciones, los vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un sitio de replicación de origen bacteriano y vectores episómicos de mamíferos). En realizaciones adicionales, los vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras la introducción en una célula huésped, y por lo tanto se replican junto con el gen huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están vinculados operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión").

El término "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped"), como se usa en el presente documento, se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. La presente invención se refiere a células huésped, que pueden incluir, por ejemplo, un vector de acuerdo con la invención descrita anteriormente. La presente invención también se refiere a células huésped que comprenden, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada o porciones de unión a antígeno de las mismas, una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera o porciones de unión a antígeno de la primera, o ambas, del primer dominio de unión. y/o segundo dominio de unión de una molécula de unión de la invención. Debe entenderse que los términos "célula huésped recombinante" y "célula huésped" se refieren no solo a una célula sujeto en particular, sino también a la progenie de dicha célula. Dado que pueden ocurrir modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a una célula parental, sin embargo, como se usa en este documento, dichas células aún están incluidas dentro del alcance del término "célula huésped".

El término "excipiente", como se usa en este documento, describe cualquier ingrediente diverso del compuesto o los compuestos de la invención.

“Composiciones farmacéuticas” se refiere a una composición que comprende un anticuerpo de la presente invención y por lo menos uno de los componentes seleccionados de un grupo que comprende, rellenos, solventes, vehículos, diluyentes, auxiliares, agentes sensoriales y de distribución, agentes de suministro, tales como conservantes, estabilizadores, rellenos, desintegradores, humectantes, emulsionantes, agentes de suspensión, adensantes, edulcorantes, saborizadores, aromatizadores, agentes antibacteriales, fungicidas, lubricantes y controlados de suministro prolongado, farmacéuticamente aceptables y farmacológicamente compatibles, la elección y proporciones adecuadas de los mismos dependerán del tipo y el modo de administración y dosificación. Ejemplos de agentes de suspensión adecuados son alcohol isoestearílico etoxilado, polioxietileno, sorbitol y éter de sorbitol, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacante y sus mezclas también. La protección contra la acción de los microorganismos puede ser proporcionada por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, tales como, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, ácido sórbico y compuestos similares. La composición también puede contener agentes isotónicos, tales como, por ejemplo, azúcares, polioles, cloruro de sodio y similares. La acción prolongada de la composición se puede lograr mediante agentes que disminuyen la absorción del ingrediente activo, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Ejemplos de vehículos, disolventes, diluyentes y agentes de administración adecuados incluyen agua, etanol, polialcoholes y sus mezclas, aceites naturales (tales como aceite de oliva) y ésteres orgánicos (tales como oleato de etilo) para inyecciones. Ejemplos de rellenos son lactosa, leche, azúcar, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato de calcio y similares. Ejemplos de desintegradores y distribuidores son almidón, ácido algínico y sus sales, silicatos. Ejemplos de lubricantes adecuados son estearato de magnesio, laurilsulfato de sodio, talco y polietilenglicol de alto peso molecular. La composición farmacéutica para la administración peroral, sublingual, transdérmica, intraocular, intramuscular, intravenosa, subcutánea, local o rectal de ingrediente activo, solo o en combinación con otro compuesto activo puede administrarse a humanos y animales en una forma

de administración estándar, en una mezcla con vehículos farmacéuticos tradicionales. Las formas de administración estándar adecuadas incluyen formas perorales tales como comprimidos, cápsulas de gelatina, píldoras, polvos, gránulos, gomas de mascar y soluciones o suspensiones perorales; formas de administración sublingual y transbucal; aerosoles; implantes formas locales, transdérmicas, subcutáneas, intramusculares, intravenosas, intranasales o intraoculares y formas de administración rectal.

"Medicamento" es un compuesto (o una mezcla de compuestos como una composición farmacéutica) en forma de tabletas, cápsulas, soluciones, ungüentos y otras formas listas, para la restauración, mejora o modificación de las funciones fisiológicas en humanos y animales, y para el tratamiento y la profilaxis de enfermedades, para diagnóstico, anestesia, anticoncepción, cosmetología y otros.

El término "enfermedad o trastorno mediado por **CD47 y PD-L1**" se refiere a cualquier enfermedad o trastorno que está directa o indirectamente asociado con **CD47 y PD-L1**, incluida la etiología, el desarrollo, la progresión, la persistencia o la patología de una enfermedad o trastorno. "Tratar" y "tratamiento" se refieren a un método para aliviar o anular un trastorno biológico y/o al menos uno de los síntomas asociados con el mismo. Como se usa en este documento, "aliviar" una enfermedad, trastorno o afección significa reducir la gravedad y/o frecuencia de aparición de los síntomas de una enfermedad, trastorno o afección. Además, las referencias en el presente documento a un "tratamiento" incluyen referencias a tratamiento curativo, paliativo y profiláctico.

En un aspecto, el sujeto sometido a tratamiento o el paciente, es un mamífero, preferiblemente un individuo humano. Dicho sujeto puede ser de sexo femenino o masculino y de cualquier edad.

El término "trastorno" significa cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con el compuesto de la presente invención. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluidas aquellas afecciones patológicas que

predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. El trastorno preferido para ser tratado aquí es el cáncer.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a una condición fisiológica o describen una condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento/proliferación celular no regulado. La definición abarca enfermedades cancerosas tanto benignas como malignas. Los ejemplos de enfermedades cancerosas incluyen, entre otros, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de tales enfermedades cancerosas incluyen el cáncer de células escamosas, el cáncer de pulmón de células pequeñas, el cáncer de pulmón de células no pequeñas, el adenocarcinoma de pulmón y el carcinoma de pulmón escamoso, el cáncer peritoneal, el cáncer hepatocelular, el cáncer de estómago, incluido el cáncer gastrointestinal, el cáncer de páncreas glioblastoma, glioma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, melanoma y varios cánceres de cabeza y cuello.

Los términos "respuesta inmunitaria", "respuesta autoinmunitaria" e "inflamación autoinmunitaria" se refieren, por ejemplo, a la acción de linfocitos, células presentadoras de antígenos, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por dichas células o células hepáticas (incluidos los anticuerpos, citoquinas y complementos producidos como resultado del daño selectivo, la destrucción o eliminación de patógenos invasivos, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos normales del cuerpo humano).

"Cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del agente terapéutico que se administra, que aliviará en cierta medida uno o más de los síntomas del trastorno que se está tratando.

El término "uso crónico" se refiere al uso continuado (ininterrumpido) de agente(s) en oposición a la vía de administración aguda (transitoria) para mantener el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un largo período de tiempo.

5 El término uso "intermitente" se refiere a que no se realiza consistentemente, sin interrupciones, sino que es más bien de tipo periódico.

Como se usan en el presente documento, los términos "comprende", "tiene", "incluye" o variaciones de los mismos como "comprenden", "tienen", "incluyen" e "incluyendo" y todas las variaciones gramaticales de los mismos deben entenderse como inclusiones de un entero o grupo de enteros pero sin la exclusión de ningún
10 entero ni grupo de enteros.

Descripción detallada de la invención

Anticuerpo

La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen a CD47 y PD-L1.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa o un
15 fragmento de unión a antígeno del mismo.

En una realización, un anticuerpo de la presente invención comprende uno o dos sitios de unión para PD-L1.

En una realización, un sitio de unión para CD47 inhibe la interacción entre el receptor CD47 y el ligando SIRP α , y/o un sitio de unión para PD-L1 inhibe la
20 interacción de PD-L1 con el receptor PD-1.

En una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo que se une a CD47 y PD-L1, cuyo sitio de unión para CD47 comprende una región variable de cadena pesada, que comprende:

(a) CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%
25 o 90% homóloga o idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 1 - 4, es decir, CDR1 es una secuencia seleccionada del grupo que

comprende las SEC. ID NOs: 1 - 4 o una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NO:1 - 4 con 1 o 2 sustituciones;

(b) CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 84%, 86%, 88%, 92% o 96% homóloga o idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NO: 6 - 15, es decir CDR2 es la secuencia de las SEC. ID NO: 6 - 15 o una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NO: 6 - 15 con 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones;

(c) CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 86% 90%, 93% o 95% homóloga o idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NO: 17 - 20, es decir, CDR3 es una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NO: 17-20 o una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NO: 17-20 con 1, 2 o 3 sustituciones.

En una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo que se une a CD47 y PD-L1, cuyo sitio de unión para CD47 comprende una región variable de cadena pesada, que comprende:

(d) CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NO: 1 - 4;

(e) CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NO: 6 - 15;

(f) CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NO:17-20.

En una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo que se une a CD47 y PD-L1, y comprende un sitio de unión para CD47 que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende:

(i) CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% o 90% homóloga o idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que comprende

las SEC. ID NOs: 1 - 4, es decir, CDR1 es una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs : 1 - 4 o una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NO: 1 - 4 con 1 o 2 sustituciones;

5 (ii) CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 84%, 86%, 88%, 92% o 96% homóloga o idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NO: 6 - 15, es decir CDR2 es la secuencia de las SEC. ID NO: 6 - 15 o una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NO: 6 - 15 con 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones,

10 (iii) CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 86% 90%, 93% o 95% homóloga o idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NO:17 - 20, es decir, CDR3 es una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 17-20 o una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 17-20 con 1, 2 o 3 sustituciones, y

15 (b) una región variable de cadena ligera que comprende:

(i) CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% o 90% homóloga o idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 22 - 34, es decir, CDR1 es una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 22 - 34 o una secuencia seleccionada del grupo
20 que comprende las SEC. ID NO:22 - 34 con 1 o 2 sustituciones,

(ii) CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 87% o 94% homóloga o idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 36 - 48, es decir, CDR2 es una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs:36 - 48 o una secuencia seleccionada del
25 grupo que comprende las SEC. ID NOs:36 - 48 con 1, 2 o 3 sustituciones,

(iii) CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% o 90% homóloga o idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 50 - 64, es decir, CDR3 es una secuencia seleccionada

del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 50 - 64 o una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NO: 50 - 64 con 1 o 2 sustituciones.

En una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo que une CD47 y PD-L1, y que comprende un sitio de union para CD47 que comprende:

5 (a) una region variable de cadena pesada que comprende:

(i) CDR1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada de un grupo que comprende las SEC. ID NOs: 1 - 4,

(ii) CDR2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada de un grupo que comprende las SEC. ID NOs: 6 - 15,

10 (iii) CDR3 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada de un grupo que comprende las SEC. ID NOs: 17 - 20, y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende:

(i) CDR1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada de un grupo que comprende las SEC. ID NOs: 22 - 34,

15 (ii) CDR2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada de un grupo que comprende las SEC. ID NOs: 36 - 48,

(iii) CDR3 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada de un grupo que comprende las SEC. ID NOs: 50 - 64.

20 En una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo que une CD47 y PD-L1 y comprende un sitio de unión para CD47 que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido que es por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% homóloga o idéntica a una secuencia seleccionada de un grupo que comprende las SEC. ID NOs: 66 - 88, y

25 (b) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácido que es por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%

o 99% homóloga o idéntica a una secuencia seleccionada de un grupo que comprende las SEC. ID NOs: 89 - 106.

En una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo que une CD47 y PD-L1 y comprende un sitio de unión para CD47 que comprende:

5 (a) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 66 - 88, y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 89 - 106.

En una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo que une
10 CD47 y PD-L1 y comprende un sitio de unión para PD-L1 que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende:

(i) CDR1 que comprende una secuencia de aminoácido que es por lo menos 80% homóloga o idéntica a la secuencia de las SEC. ID NO: 5, es decir que CDR1 es la secuencia de la SEC. ID NO: 5 o la secuencia de la SEC. ID NO: 5 con 1
15 sustitución;

(ii) CDR2 que comprende una secuencia de aminoácido que es por lo menos 80%, 86%, o 92% homóloga o idéntica a la secuencia de las SEC. ID NO:16, es decir que CDR2 es la secuencia de la SEC. ID NO:16 o la secuencia de la SEC. ID NO: 16 con 1, 2 o 3 sustituciones; (iii) CDR3 que comprende una secuencia de
20 aminoácido que es por lo menos 80% o 90% homóloga o idéntica a la secuencia de la SEC. ID NO:21, es decir que CDR3 es la secuencia de la SEC. ID NO: 21 o la secuencia de la SEC. ID NO:21 con 1 o 2 sustituciones, y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende:

(i) CDR1 que comprende una secuencia de aminoácido que es por lo menos
25 80%, 86%, o 83% homóloga o idéntica a la secuencia de las SEC. ID NO: 35, es decir que CDR1 es la secuencia de la SEC. ID NO: 35 o la secuencia de la SEC. ID NO: 35 con 1, 2 o 3 sustituciones;

(ii) CDR2 que comprende una secuencia de aminoácido que es por lo menos 80% homóloga o idéntica a la secuencia de la SEC. ID NO: 49, es decir que CDR2 es la secuencia de la SEC. ID NO: 49 o la secuencia de la SEC. ID NO: 49 con 1 sustitución; (iii) CDR3 que comprende una secuencia de aminoácido que es por lo menos 80% o 90% homóloga o idéntica a la secuencia de la SEC. ID NO: 65, es decir que CDR3 es la secuencia de la SEC. ID NO: 65 o la secuencia de la SEC. ID NO: 65 con 1 o 2 sustituciones.

En una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo que une CD47 y PD-L1 y comprende un sitio de unión para PD-L1 que comprende:

10 (a) una región variable de cadena pesada que comprende:

(i) CDR1 que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC. ID NO: 5,

(ii) CDR2 que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC. ID NO: 16,

(iii) CDR3 que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC. ID NO: 21,

y

15 (b) una región variable de cadena ligera que comprende:

(i) CDR1 que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC. ID NO: 35,

(ii) CDR2 que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC. ID NO: 49,

(iii) CDR3 que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC. ID NO: 65.

En una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo que se une a CD47 y PD-L1, y se caracteriza porque un sitio de unión para CD47 es Fab, scFv, scFab, o mono-dominios VH o VHH aislados.

En una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo que se une a CD47 y PD-L1, y se caracteriza porque un sitio de unión para PD-L1 es Fab, scFv, scFab, o mono-dominios VH o VHH aislados.

25 En una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo que se une a CD47 y PD-L1, y se caracteriza porque estimula la citotoxicidad celular

dependiente de anticuerpos, la fagocitosis mediada por macrófagos, la citotoxicidad dependiente del complemento y la citotoxicidad mediada por células T hacia las células cubiertas con antígenos CD47 y/o PD-L1.

En una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo que se une a CD47 y PD-L1, y se caracteriza porque comprende una porción Fc que comprende al menos una mutación o modificación que aumenta la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o complemento - citotoxicidad dependiente (CDC), en comparación con el mismo anticuerpo sin mutación o modificación.

Moléculas de ácido nucleico

La presente invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico, y secuencias que codifican **un anticuerpo anti-CD47/PD-L1** de la invención descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, varias moléculas de ácido nucleico codifican el primer dominio y el segundo dominio de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo **anti-CD47/PD-L1**. En algunas realizaciones, en donde un primer dominio y/o segundo dominio comprende una cadena pesada y una cadena ligera, diferentes ácidos nucleicos codifican una cadena pesada y secuencias de aminoácidos de cadena ligera. En otras realizaciones, la misma molécula de ácido nucleico codifica secuencias de cadena pesada y cadena ligera. En ciertas realizaciones, una molécula de ácido nucleico puede codificar cualquier combinación de secuencias de aminoácidos (por ejemplo, secuencias de cadenas pesadas y ligeras) de los primeros y segundos dominios. En una realización particular, una molécula de ácido nucleico puede codificar la secuencia de aminoácidos de un primer dominio de unión y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de un segundo dominio de unión, incluyendo opcionalmente cualquier secuencia de un enlazador peptídico que los conecta. Una referencia a una secuencia de nucleótidos abarca su complemento, a menos que se especifique lo contrario. Por lo tanto, una referencia a un ácido nucleico que tiene una secuencia particular debe entenderse como una que abarca la cadena complementaria de la misma con la secuencia complementaria de la misma. El término "polinucleótido" como se usa en

el presente documento significa una forma polimérica de nucleótidos que tienen al menos 10 bases de longitud, o ribonucleótidos, o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas simples y de doble cadena.

5 Las moléculas de ácido nucleico pueden ser aisladas en cualquiera de las realizaciones antes mencionadas.

Una molécula de ácido nucleico de la invención puede aislarse de cualquier fuente que produzca un anticuerpo anti-CD47/PD-L1. En ciertas realizaciones, una molécula de ácido nucleico de la invención puede sintetizarse, en lugar de aislarse.

10 En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio VH del primer o segundo dominio de un anticuerpo de la invención, unida dentro del marco a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio constante de cadena pesada de cualquier fuente. De manera similar, una molécula de ácido nucleico de la
15 invención puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio VL de la primera o segunda región de un anticuerpo de la invención, unida dentro del marco a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio constante de cadena ligera de cualquier fuente.

En un aspecto adicional de la invención, las moléculas de ácido nucleico que
20 codifican el dominio variable de las cadenas pesadas (VH) y/o ligeras (VL) de un primer o segundo dominio de unión pueden "convertirse" a lo largo de la longitud de los genes de anticuerpos. En una realización, las moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios VH o VL se convierten en genes de anticuerpos en toda la longitud en virtud de la inserción en un vector de expresión que ya codifica los
25 dominios de constante de cadena pesada (CH) o constante de cadena ligera (CL), respectivamente, de modo tal que el segmento VH está vinculado operativamente al (los) segmento (s) CH dentro del vector, y/o el segmento VL está operativamente vinculado al segmento CL dentro del vector. En otra realización, las moléculas de

ácido nucleico que codifican los dominios VH y/o VL se convierten en genes de anticuerpos en toda la longitud en virtud de la unión, por ejemplo, la ligadura, una molécula de ácido nucleico que codifica los dominios VH y/o VL a una molécula de ácido nucleico que codifica CH y/o dominios CL usando técnicas estándar de biología molecular. Las moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesadas y/o ligeras en toda la longitud pueden expresarse en una célula en la que se han introducido.

Las moléculas de ácido nucleico pueden usarse para expresar grandes cantidades de **anticuerpos anti-CD47/PD-L1** recombinantes. Las moléculas de ácido nucleico también pueden usarse para producir anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos de cadena sencilla, inmunoadhesinas, diacuerpos, anticuerpos mutados y derivados de anticuerpos, como se describe en el presente documento.

Vector

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un vector adecuado para la expresión de cualquiera de las secuencias nucleóticas descriptas en el presente.

La presente invención se refiere a vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de anticuerpos **anti-CD47/PD-L1** o porciones de los mismos (por ejemplo, secuencias de cadenas pesadas de un primer dominio de unión y/o secuencias de cadenas pesadas y/o ligeras de un segundo dominio de unión), como se describe en el presente documento. La invención proporciona además vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión, anticuerpos modificados, fragmentos de anticuerpos.

En otra realización, las moléculas de ácido nucleico y los vectores pueden usarse para producir **anticuerpos anti-CD47/PD-L1** mutados. Los anticuerpos pueden mutarse en los dominios variables de las cadenas pesadas y/o ligeras de un primer dominio de unión y/o las cadenas pesadas y/o ligeras de un segundo dominio

de unión, por ejemplo, para alterar una propiedad de unión de los anticuerpos. Por ejemplo, se puede hacer una mutación en una o más CDR para aumentar o disminuir la KD de los anticuerpos, para aumentar o disminuir la Koff, o para alterar la especificidad de unión de un anticuerpo con respecto a FcRn. En otra realización, se realizan una o más mutaciones en un residuo de aminoácido que se sabe que ha cambiado en comparación con la línea germinal en un anticuerpo correspondiente al primer o segundo dominio de unión de los anticuerpos anti-CD47/PD-L1 de la invención. Dichas mutaciones pueden realizarse en la CDR o en la región marco de un dominio variable, o en un dominio constante. En una realización preferida, las mutaciones se realizan en un dominio variable. En otra realización, se realizan una o más mutaciones en un residuo de aminoácido que se sabe que se cambia en comparación con la línea germinal en la CDR o región estructural de un dominio variable de un anticuerpo de la invención.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD47/PD-L1 de la invención se expresan insertando un ADN que codifica parcial o totalmente la secuencia de un primer o segundo dominio de unión (por ejemplo, secuencias de cadenas ligeras y pesadas donde un dominio de unión comprende y secuencias de cadena pesada y ligera), obtenidas como se describió anteriormente, en vectores de expresión de tal manera que los genes se unen operativamente a secuencias de control de expresión necesarias, tales como secuencias de control de transcripción y traducción. Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), virus de plantas, tales como virus del mosaico de la coliflor, virus del mosaico del tabaco, cósmidos, YAC, episomas derivados del EBV y similares. Las moléculas de ADN pueden ligarse en un vector de modo que las secuencias de control transcripcional y de traducción dentro del vector cumplan su función pretendida de regular la transcripción y traducción del ADN. Se puede elegir un vector de expresión y secuencias de control de la expresión para que sean compatibles con la expresión de la célula huésped utilizada. Las moléculas de ADN que codifican parcial o totalmente las secuencias del primer y segundo dominios de

unión (por ejemplo, las secuencias de cadena pesada y ligera en las que un dominio de unión comprende una secuencia de cadena pesada y ligera) se pueden introducir en vectores individuales. En una realización, cualquier combinación de dichas moléculas de ADN se introduce en el mismo vector de expresión. Las moléculas de ADN pueden introducirse en un vector de expresión mediante métodos estándar (por ejemplo, ligadura de sitios de restricción complementarios en un fragmento de gen y vector de anticuerpo, o ligadura de extremo romo si no hay sitios de restricción presentes).

Un vector adecuado es uno que codifica secuencias de inmunoglobulina CH o CL humana funcionalmente completas, con la ingeniería del sitio de restricción apropiada, de modo que cualquier secuencia VH o VL pueda insertarse y expresarse fácilmente, como se describió anteriormente. Los genes que codifican HC y LC en dichos vectores pueden contener secuencias de intrones que dan como resultado un aumento de los rendimientos proteicos globales de los anticuerpos al estabilizar el ARNm correspondiente. Las secuencias de intrones están flanqueadas por sitios de empalme donador y empalme, que determinan dónde se producirá el empalme de ARN. La ubicación de las secuencias de intrones puede ser en regiones variables o constantes de cadenas de anticuerpos, o en regiones tanto variables como constantes cuando se usan múltiples intrones. La poliadenilación y la terminación de la transcripción pueden ocurrir en un sitio cromosómico nativo aguas abajo de las regiones codificantes. Un vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido señal, que facilita la secreción de una cadena de anticuerpo originada en una célula huésped. Un gen de cadena de anticuerpo se puede clonar en un vector de tal manera que el péptido señal se vincule en el marco al extremo amino de una cadena de inmunoglobulina. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena de anticuerpos, la expresión de vector recombinante de la invención puede llevar secuencias reguladoras que controlan la

expresión de genes de cadena de anticuerpos en una célula huésped. Los expertos en la materia entenderán que el diseño de un vector de expresión, que incluye la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de una célula huésped que se va a transformar, el nivel de expresión de una proteína deseada, etcétera. Las secuencias de control preferidas para una célula huésped de expresión en mamíferos incluyen elementos virales que aseguran altos niveles de expresión de proteínas en células de mamíferos, como promotores y/o potenciadores derivados de una LTR retroviral, citomegalovirus (CMV) (como un promotor/potenciador de CMV) , virus de simio 40 (SV40) (como un promotor/potenciador de SV40), adenovirus (por ejemplo, el principal promotor adenovirus tardío (AdMLP)), poliomavirus y promotores de mamíferos fuertes, como el promotor de inmunoglobulina nativo o el promotor de actina. Para una descripción más detallada de los elementos de control viral y sus secuencias, ver, por ejemplo, las patentes de EE. UU. Nos. 5.168.062, 4.510.245 y 4.968.615. En la técnica son conocidos los métodos para expresar moléculas de unión, tales como anticuerpos en plantas, que incluyen una descripción de promotores y vectores, así como la transformación de plantas. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 6.517.529. Los métodos para expresar polipéptidos en células bacterianas o células fúngicas, por ejemplo, células de levadura, también son bien conocidos en la técnica.

Además de los genes de la cadena de anticuerpos y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden llevar secuencias adicionales, como secuencias que regulan la replicación de un vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido un vector (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. números 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Por ejemplo, normalmente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a agentes medicinales, como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido un vector. Por ejemplo, los genes marcadores seleccionables incluyen un gen de dihidrofolato

reductasa (DHFR) (para uso en células huésped dhfr durante la selección/amplificación de metotrexato), un gen neo (para la selección de G418) y un gen de glutamato sintetasa.

El término "secuencia de control de la expresión", como se usa en el presente documento, pretende referirse a las secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de las secuencias de codificación a las que están ligadas. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias apropiadas de iniciación, terminación, secuencias promotoras y secuencias potenciadoras; señales de procesamiento de ARN eficientes, tales como señales de empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que mejoran la eficiencia de traducción (es decir, secuencia de consenso de Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de las proteínas; y cuando se desee, secuencias que potencian la secreción de proteínas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en las procariotas, estas secuencias de control generalmente incluyen el promotor del sitio de unión al ribosoma y las secuencias de terminación de la transcripción; en las eucariotas, típicamente, tales secuencias de control incluyen secuencias promotoras y de terminación de la transcripción. El término "secuencias de control" pretende incluir al menos todos los componentes, cuya presencia es esencial para expresión y procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales, cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, las secuencias líder y las secuencias asociadas de fusión.

Células huésped

Un aspecto adicional de la invención se refiere a métodos para producir anticuerpos anti-CD47/PD-L1 de la invención. Una realización de la invención se refiere a un método para producir anticuerpos como se define en el presente documento, que comprende introducir/preparar una célula huésped recombinante capaz de expresar anticuerpos, cultivar dichas células huésped en condiciones adecuadas para la expresión/producción de los anticuerpos, y aislar el anticuerpo obtenido. El anticuerpo anti-CD47/PD-L1 producido por dicha expresión en tales

células huésped recombinantes se denomina en el presente documento "anticuerpos recombinantes". La invención también se refiere a la progenie de células de tales células huésped y a los anticuerpos anti-CD47/PD-L1 obtenidos de manera análoga.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos anti-CD47/PD-
5 L1 de la invención y los vectores que comprenden estas moléculas de ácido nucleico se pueden usar para la transfección de un mamífero adecuado o célula del mismo, planta o célula del mismo, célula huésped bacteriana o de levadura. La transformación puede ser mediante cualquier técnica conocida para introducir polinucleótidos en una célula huésped. Los métodos para la introducción de
10 polinucleótidos heterólogos en células de mamíferos son bien conocidos en la técnica e incluyen transfección mediada por dextrano, transfección de complejo de ácido nucleico-polímero catiónico, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, encapsulación del polinucleótido(s) en liposomas, y microinyección directa de ADN en núcleos. Además, las moléculas
15 de ácido nucleico pueden introducirse en células de mamíferos mediante vectores virales. Los métodos para transfectar células son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nos. 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455. Los métodos para transformar células vegetales son bien conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, transformación mediada por *agrobacterium*,
20 transformación biolística, inyección directa, electroporación y transformación viral. Los métodos para transformar células bacterianas y de levadura también son bien conocidos en la técnica.

Las líneas celulares de mamíferos usadas como huéspedes para transformación son bien conocidas en la técnica e incluyen una pluralidad de líneas
25 celulares inmortalizadas disponibles. Estas incluyen, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), células NS0, células SP2, células HEK-293T, células FreeStyle 293 (Invitrogen), células NIH-3T3, células HeLa, células de riñón de hámster (BHK), células renales de mono verde africano (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células A549 y varias otras líneas

celulares. Las líneas celulares se seleccionan determinando qué líneas celulares tienen altos niveles de expresión y proporcionan las características necesarias de la proteína producida. Otras líneas celulares que se pueden usar son líneas celulares de insecto, tales como células Sf9 o Sf21. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican anticuerpos anti-CD47/PD-L1 en células huésped de mamíferos, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión de los anticuerpos en células huésped o, más preferiblemente, la secreción de los anticuerpos en el medio de cultivo en el que crecen las células huésped. Los anticuerpos anti-CD47/PD-L1 pueden reconstituirse a partir del medio de cultivo utilizando técnicas estándar de purificación de proteínas. Las células huésped vegetales incluyen, por ejemplo, *Nicotiana*, *Arabidopsis*, lenteja de pato, maíz, trigo, patata, etc. Las células huésped bacterianas incluyen *E. coli* y especies de *Streptomyces*. Las células huésped de levadura incluyen *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*.

Además, el nivel de producción de anticuerpos anti-CD47/PD-L1 de la invención a partir de líneas celulares de producción puede mejorarse usando varias técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de expresión génica de la glutamina sintetasa (el sistema GS) es un enfoque común para mejorar la expresión en ciertas condiciones. El sistema GS es debatido en su totalidad o en parte en relación con las Patentes Europeas números 0216846, 0256055, 0323997 y 0338841.

Es probable que los anticuerpos anti-CD47/PD-L1 expresados por diferentes líneas celulares o en animales transgénicos tengan un perfil de glicosilación diferente en comparación con otros. Sin embargo, todos los anticuerpos anti-CD47/PD-L1 codificados por las moléculas de ácido nucleico descritos aquí, o que comprenden las secuencias de aminoácidos proporcionadas en este documento, son parte de la presente invención, independientemente de la glicosilación de las moléculas de unión, y, en general, independientemente de la presencia o ausencia de modificaciones postraduccionales.

Preparación de los anticuerpos

La invención también se refiere a métodos y procesos para producir anticuerpos anti-CD47/PD-L1 y fragmentos de unión al antígeno de los mismos.

Cuerpos monoclonales

5 Se pueden preparar anticuerpos monoclonales utilizando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler, et al. Nature 256,1975, p. 495, o pueden prepararse utilizando métodos de ADN recombinante (US 4816567).

En un método de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, como un hámster, es inmunizado de acuerdo con el método anterior para provocar
10 linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. De acuerdo con otra realización, los linfocitos pueden producirse por inmunización in vitro. Después de la inmunización, los linfocitos se fusionan con una línea celular de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para producir una
15 célula de hibridoma.

Las células de hibridoma, producidas de la manera anterior, pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parental no fusionadas. Por ejemplo, si las células del mieloma parental carecen de la enzima
20 hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas generalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), es decir, sustancias que impiden el crecimiento de células con deficiencia de HGPRT.

Las células preferidas, usadas como componentes para la fusión de células de
25 mieloma, son aquellas que se fusionan de manera eficiente, apoyan la producción estable y de alto nivel de anticuerpos mediante las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio donde se seleccionan las células parentales no fusionadas. Las líneas celulares de mieloma preferidas son líneas de mieloma

murino, como las derivadas de tumores de ratones MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Centro de Distribución Celular del Instituto Salk, en San Diego, California, EE. UU., y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE. UU. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromioma de ratón-humano también han sido descritas para la producción de anticuerpos monoclonales (Kozbor, J. Immunol., 133, 1984, p. 3001).

Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión in vitro, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede ser determinada, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard descrito en Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Una vez que se identifican las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar limitando los procedimientos de dilución y pueden ser cultivados mediante métodos estándar. Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, el medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden ser criadas in vivo como tumores de ascitis en un animal, por ejemplo, mediante inyección intraperitoneal (i.p.) de las células en ratones.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden ser separados del medio de cultivo, líquido ascítico o suero mediante técnicas de purificación de anticuerpos convencionales como, por ejemplo, cromatografía de afinidad (por ej., utilizando proteína A o proteína G-Sepharose) o cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, etc.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales es aislado y secuenciado fácilmente mediante procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso

de sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que luego se transfectan en células huésped como las células de *E. coli*, las células COS de simio, las células de ovario de hámster chino (CHO) o las células de mieloma que no producen proteínas de anticuerpos sin ser transfectada, para obtener así la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Se recomienda la consulta de artículos especializados sobre la expresión recombinante en bacterias del ADN que codifica el anticuerpo.

En una realización adicional, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas utilizando las técnicas descritas en McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990). Por otra parte, Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (rango nM) mediante la combinación aleatoria de cadenas (Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992), así como la infección combinatoria y la recombinación in vivo como estrategia para la construcción de grandes bibliotecas de fagos (Waterhouse et al., *Nucl. Acids. Res.* 21:2265-2266 (1993). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN que codifica el anticuerpo puede ser modificado, por ejemplo, para producir polipéptidos de anticuerpos de fusión o quiméricos, por ejemplo, sustituyendo las secuencias de la región constante de la cadena pesada y la cadena ligera (CH y CL) por secuencias murinas homólogas (US 4816567 y Morrison, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*:81:6851 (1984), o bien mediante fusión covalente de la secuencia que codifica la inmunoglobulina con la totalidad o parte de la secuencia

que codifica un polipéptido no inmunoglobulina (polipéptido heterólogo). Las secuencias polipeptídicas que no son de inmunoglobulina pueden ser sustituidas por las regiones constantes de un anticuerpo, o pueden ser sustituidas por los dominios variables de un centro de unión a antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de unión a antígeno que tiene especificidad para un antígeno y otro sitio de unión a antígeno que tiene especificidad para un antígeno diferente.

Anticuerpos humanizados

Los métodos para producir anticuerpos "humanizados" de animales no humanos son bien conocidos en la técnica. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos integrales introducidos en el mismo desde una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan residuos "importados" porque normalmente se extraen de una región variable "importada". Esencialmente, la humanización se puede realizar siguiendo el método de Winter y coautores (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986) sustituyendo las secuencias de la región hipervariable por secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, estos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (US 4816567) en los que una región, que es sustancialmente menor que una región variable humana intacta, ha sido sustituida por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR son sustituidos por residuos de regiones análogas en los anticuerpos de roedores.

La elección de regiones variables humanas, tanto ligeras como pesadas, para ser usadas en la producción de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad y la respuesta HAMA (anticuerpo humano anti-ratón) cuando el anticuerpo está destinado para uso terapéutico en seres humanos. De acuerdo con el llamado método del "mejor ajuste", la secuencia de la región variable de un anticuerpo de roedor es analizada respecto de la biblioteca completa de

secuencias de dominio variable humano conocidas. Se identifica la secuencia del dominio V humano más cercana a la del roedor y se selecciona la región marco humana (FR), que es adecuada para su uso en el anticuerpo humanizado (Sims et al., J. Immunol. 151:2296). (1993). Otro método utiliza una región de marco particular derivada de la secuencia de consenso de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas de todos los anticuerpos humanos. El mismo marco se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA:89:4285 (1992)).

También es importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad de unión por el antígeno, y otras propiedades biológicas significativas. Con ese objetivo, según un método preferido, los anticuerpos humanizados son preparados mediante el análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados utilizando modelos conceptuales tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Hay disponibles programas informáticos que ilustran y muestran posibles estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. El estudio de estas imágenes permite analizar cuál es el posible papel que juegan los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse al antígeno. De esta manera se pueden seleccionar residuos de FR y combinarlos con el receptor y las secuencias de importación, para obtener las características de anticuerpo deseadas, tales como el aumento de la afinidad por el (los) antígeno(s) diana. En general, los residuos de la región hipervariable influyen directa y fundamentalmente en la unión del antígeno.

El anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, como ser Fab, que está conjugado opcionalmente con uno o más agentes citotóxicos para generar un inmunoconjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado puede

ser un anticuerpo de longitud completa, como un anticuerpo IgG1 de longitud completa.

Anticuerpos humanos y metodología basada en bibliotecas de exhibición de fagos

- 5 Como alternativa a la humanización de anticuerpos, pueden generarse anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora ya es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que, después de la inmunización, son capaces de producir una gama completa de anticuerpos humanos sin producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de
- 10 la región de unión del anticuerpo de cadena pesada (JH) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal produce la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulina humana de línea germinal a dichos ratones mutantes de línea germinal da como resultado la producción de anticuerpos humanos después del desafío con antígeno
- 15 (US 5545806, 5569825, 5591669 (todas de GenPharm); 5545807; y WO 97/17852).

Alternativamente, se puede usar la tecnología de visualización de fagos (McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos in vitro a partir de un repertorio de genes de región variable de inmunoglobulina (V) de cuerpos de donantes inmunizados. De acuerdo

20 con esta técnica, los genes de la región V del anticuerpo son clonados dentro de la estructura con un gen con mayor o menor cobertura proteica de un bacteriófago filamentoso, como ser M13 o fd, y son visualizados como fragmentos de anticuerpos funcionales en la superficie de una partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las

25 selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección de un gen que codifica un anticuerpo que demuestra esas propiedades. Por lo tanto, el fago imita algunas de las propiedades de las células B. La visualización del fago puede realizarse en una variedad de formatos. Pueden usarse varias fuentes de segmentos V del gen para la visualización del fago.

Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) aislaron varios grupos de anticuerpos anti-oxazolona en una pequeña biblioteca de combinación aleatoria de genes V derivados del bazo de ratones inmunizados. Se puede crear un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos respecto de un grupo diverso de antígenos (incluidos antígenos propios) esencialmente las técnicas descritas por Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991).

Como se describió antes, también pueden generarse anticuerpos humanos en células B activadas in vitro (ver US 5567610 y 5229275).

10 Fragmentos de anticuerpos

En ciertas circunstancias, es recomendable utilizar fragmentos de anticuerpos en lugar de anticuerpos completos. El tamaño pequeño de los fragmentos contribuye a su rápida eliminación y puede contribuir a una mejor penetración en el caso de los tumores densos.

15 Varias técnicas han sido desarrolladas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos derivaban de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos. Ahora sin embargo, estos fragmentos pueden ser producidos directamente mediante células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y ScFv pueden expresarse y secretarse a partir de E. coli, lo que facilita la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo pueden ser aislados de las bibliotecas de fagos de anticuerpos descriptas anteriormente. Según otra realización, los fragmentos Fab'-SH pueden aislarse directamente de E. coli y acoplarse químicamente para formar fragmentos F (ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de células huésped recombinantes. En el documento US 5869046 se describen Fab y F (ab')₂ con residuos de receptor de unión con receptor de epítipo de media vida aumentada in vivo. Para los expertos en la técnica serán evidentes otras técnicas para

la producción de fragmentos de anticuerpos. En otras realizaciones, el anticuerpo elegido es un fragmento Fv de cadena única (scFv) (véanse los documentos WO 93/16185; US 5571894 y US 5587458). Fv y scFv son las únicas especies con sitios de unión intactos desprovistos de regiones constantes; por lo tanto, resultan adecuadas para una unión no específica reducida durante el uso in vivo. Las proteínas de fusión scFv pueden construirse para producir la fusión de una proteína efectora en el extremo N o C de un scFv. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como el que se describe en el documento U.S. 5641870. Estos fragmentos de anticuerpo lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

Anticuerpos multiespecíficos

Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos que tienen especificidad de unión para al menos dos epítopos diferentes. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítopos de proteína diferentes. Otros anticuerpos multiespecíficos pueden combinar un sitio de unión para CD47/PD-L1 en combinación con un sitio de unión para otra proteína. Los anticuerpos biespecíficos pueden ser preparados como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos biespecíficos).

Los métodos para producir anticuerpos multiespecíficos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades. Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que generalmente se realiza mediante cromatografía de afinidad en varios pasos, es bastante complicada y el rendimiento del producto es bajo. El documento WO 93/08829 describe procedimientos similares.

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpos con la especificidad de unión deseada (sitios de unión a antígeno de una unión) se fusionan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. Preferiblemente, la fusión se realiza con una región constante de cadena pesada de Ig, que comprende al menos una parte de las regiones bisagra, C_H2 y C_H3. Preferiblemente, la primera región constante de cadena pesada (C_H1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera está presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en varios vectores de expresión y se cotransfectan en una célula huésped adecuada. Esto proporciona una mayor flexibilidad para la selección de proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en realizaciones cuando se usan relaciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos en la construcción, para lograr rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias de codificación en dos o las tres cadenas polipeptídicas en un solo vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales produce altos rendimientos, o cuando estas relaciones no tienen un efecto importante.

En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos son una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida que proporciona una primera especificidad de unión en una primera rama, y un par de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en una segunda rama. . Se comprobó que esta estructura asimétrica facilita la separación de la molécula biespecífica deseada de las combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo la mitad de la molécula biespecífica facilita la separación. Este enfoque se describe en el documento WO 94/04690. Para más detalles con respecto a la producción de anticuerpos biespecíficos, ver, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en el documento US 5731168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo se puede construir para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se obtienen a partir de cultivos de células recombinantes. La interfaz preferida comprende al menos una parte de la región C_H3.

5 De acuerdo con este método, uno o más aminoácidos pequeños con cadenas laterales de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo son reemplazadas por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) se crean en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo al reemplazar los
10 aminoácidos que contienen cadenas laterales grandes por aminoácidos que contienen cadenas laterales más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento de heterodímero en comparación con otros productos finales no deseados.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o
15 "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar con avidina, y el otro con biotina. Dichos anticuerpos pueden usarse, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (US 4676980) y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden ser
20 preparados utilizando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen en el documento US 4676980, junto con diversas técnicas de reticulación.

Las técnicas para producir anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también han sido descriptos en la literatura. Por ejemplo, los anticuerpos
25 biespecíficos se pueden preparar utilizando un enlace químico. Brennan et al., Science 229:81 (1985) han descrito un procedimiento, según el cual los anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para producir F (ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante ditiol, como ser el arsenito de sodio, para estabilizar los ditioles vecinos y evitar la formación de enlaces disulfuro

intermoleculares. Los fragmentos Fab' producidos se convierten luego en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte luego en Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar de otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos así producidos se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Recientes progresos han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para producir anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992) describen la producción de F(ab')₂ de una molécula de anticuerpo biespecífico completamente humanizada. Cada Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a un acoplamiento químico directo in vitro para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así obtenido fue capaz de unirse a las células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y las células T humanas normales, así como desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos contra el objetivo de tumores de mama humanos.

También se han descrito varias técnicas para producir y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos provenientes directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina (Kostelny et al, *J. Immunol.* 148 (5):1547-1553 (1992). Se produjo la unión de péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun al Fab' de dos diferentes anticuerpos mediante fusión génica. Se redujeron homodímeros de anticuerpos en la región bisagra para formar monómeros y luego fueron oxidados nuevamente para formar heterodímeros de anticuerpos. Este método también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología "diacuerpo" descrita por Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993) es un mecanismo alternativo para producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden una región VH conectada a una región VL por un conector que es demasiado corto para permitir

el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, las regiones VH y VL de un fragmento tienen que emparejarse con las regiones complementarias VL y VH de otro fragmento, formando así dos sitios de unión al antígeno. Otra estrategia para producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos utilizando dímeros de cadena única (Fv) - (sFv) ha sido también descrita en Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994).

Esta invención también proporciona anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos triespecíficos.

Anticuerpos polivalentes

Un anticuerpo polivalente puede ser internalizado (y/o catabolizado) por una célula que expresa un antígeno, a la que se une el anticuerpo, más rápidamente que un anticuerpo bivalente. Los anticuerpos que se proponen en el presente (que son distintos de los de la clase IgM) con tres o más sitios de unión al antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que pueden ser fácilmente producidos mediante expresiones recombinantes de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo polivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) un fragmento Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá un fragmento Fc y tres o más sitios de unión a antígeno en el extremo N del fragmento Fc. El anticuerpo polivalente preferido en el presente documento comprende (o consiste en) 3 a aproximadamente 8, pero preferiblemente 4, sitios de unión a antígeno. El anticuerpo polivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (y preferiblemente dos cadenas polipeptídicas), en donde la cadena o cadenas polipeptídicas comprenden dos o más regiones variables. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, en donde VD1 se refiere a una primera región variable, VD2 se refiere a una segunda región variable, Fc se refiere a una cadena polipeptídica de un fragmento Fc, X1 y X2 se refieren a un aminoácido o polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, la o las cadenas polipeptídicas pueden comprender la siguiente

cadena:enlazador flexible VH-CH 1-VH-CH1- Fragmento de Fc; o fragmento VH-CH1-VH-CH1-Fc. El anticuerpo polivalente en el presente documento preferiblemente comprende además al menos 2 (y preferiblemente 4) polipéptidos de región variable de cadena ligera. El anticuerpo polivalente en el presente documento puede, por ejemplo, comprender de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 polipéptidos de región variable de cadena ligera. En el contexto de la presente invención, los polipéptidos de región variable de cadena ligera comprenden una región variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además una región CL.

10 *Composiciones farmacéuticas*

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo específico para CD47/PD-L1 como ingrediente activo (o como único ingrediente activo). La composición farmacéutica puede incluir al menos un anticuerpo que es específico para CD47 y PD-L1 y/o una o más moléculas de unión adicionales (por ejemplo, anticuerpos) dirigidas a uno o más de receptores de superficie correspondientes, como se describe en este documento. En algunas realizaciones, las composiciones están destinadas a mejorar, prevenir o tratar trastornos mediados por IgG.

"Composición farmacéutica" significa una composición que comprende un anticuerpo anti-CD47/PD-L1 de la presente invención y al menos uno de los componentes seleccionados del grupo que consiste en excipientes farmacéuticamente aceptables y farmacológicamente compatibles, tales como rellenos, solventes, diluyentes, vehículos, auxiliares, agentes para distribución, agentes para administración, conservantes, estabilizantes, emulsionantes, agentes de suspensión, espesantes, controladores de administración prolongada, cuya elección y proporciones dependen del tipo y la vía de administración y la dosis. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención y los métodos de preparación de las mismas resultarán sin duda evidentes para los expertos en la técnica. Las composiciones farmacéuticas deben fabricarse preferiblemente de acuerdo con los

requisitos de Buenas Prácticas de Fabricación (GMP - *Good Manufacturing Practice*). La composición puede comprender una composición tampón, agentes de tonicidad, estabilizantes y solubilizantes. La acción prolongada de la composición se puede lograr mediante agentes que disminuyen la absorción del ingrediente farmacéutico activo, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Los ejemplos de vehículos, disolventes, diluyentes y agentes de administración adecuados incluyen agua, etanol, polialcoholes y sus mezclas, aceites y ésteres orgánicos para inyecciones.

"Medicamento (droga, fármaco)": es un compuesto o una mezcla de compuestos como una composición farmacéutica en forma de tabletas, cápsulas, polvos, liofilizados, inyecciones, infusiones, pomadas y otras formas listas para usar, para restaurar, mejorar o modificar las funciones fisiológicas en seres humanos y en animales, como así también para el tratamiento y prevención de enfermedades, para diagnósticos, anestesia, anticoncepción, cosmetología y otros. Cualquier método para administrar péptidos, proteínas o anticuerpos que se acepte en la técnica puede ser adecuadamente empleado respecto de un anticuerpo anti-CD47/PD-L1 de la invención.

El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a uno o más componentes compatibles, líquidos o sólidos, que son adecuados para ser administrados a un mamífero, preferiblemente a un ser humano.

El término "excipiente" se usa en el presente documento para describir cualquier ingrediente distinto de los ingredientes anteriores de la invención. Estas son sustancias de naturaleza inorgánica u orgánica que se utilizan en la industria farmacéutica para dar a los productos farmacéuticos las propiedades fisicoquímicas necesarias.

Como se usa en el presente documento, "tampón", "composición del tampón", "agente de tamponamiento" se refiere a una solución, que es capaz de resistir los cambios en el pH por la acción de sus componentes conjugados de base ácida, y que

permite que el fármaco el anticuerpos anti-CD47/PD-L1 resistir los cambios en el pH. En general, la composición farmacéutica tiene preferiblemente un pH en el intervalo de 4.0 a 8.0. Los ejemplos de tampones usados incluyen, pero sin limitación a éstos, soluciones tampón de acetato, fosfato, citrato, histidina, succinato, etc.

Los términos "agente tónico", "osmolito" o "agente osmótico", como se usan en este documento, se refieren a un excipiente que puede aumentar la presión osmótica de una formulación de anticuerpo líquido. El medicamento "isotónico" es un medicamento que tiene una presión osmótica equivalente a la de la sangre humana. Los medicamentos isotónicos típicamente tienen una presión osmótica de aproximadamente 250 a 350 mOsm/kg. Los agentes isotónicos utilizados incluyen, pero sin limitación a éstos, polioles, sacáridos y sacarosa, aminoácidos, sales metálicas, por ejemplo, cloruro de sodio, etc.

"Estabilizador" se refiere a un excipiente o una mezcla de dos o más excipientes que proporcionan la estabilidad física y/o química del agente activo. Los estabilizadores incluyen aminoácidos, por ejemplo, pero sin limitación a éstos, arginina, histidina, glicina, lisina, glutamina, prolina; tensioactivos, por ejemplo, pero sin limitación a éstos, polisorbato 20 (nombre comercial:Tween 20), polisorbato 80 (nombre comercial:Tween 80), polietileno-polipropilenglicol y sus copolímeros (nombres comerciales:Poloxamer, Pluronic, dodecil sulfato de sodio (SDS); antioxidantes, por ejemplo, pero sin limitación a éstos, metionina, acetilcisteína, ácido ascórbico, monotioglicerol, sales de ácido sulfuroso, etc.; agentes quelantes, por ejemplo, pero sin limitación a éstos, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminotraacético (DTPA), citrato de sodio, etc.

Una composición farmacéutica es "estable" si el agente activo conserva la estabilidad física y/o la estabilidad química y/o la actividad biológica del mismo durante su vida útil especificada, a la temperatura de almacenamiento, por ejemplo, de 2–8°C. Preferiblemente, el agente activo conserva tanto la estabilidad física como

la química, así como la actividad biológica. El período de almacenamiento se regula de acuerdo con los resultados de la prueba de estabilidad, en condiciones de envejecimiento acelerado o natural.

Una composición farmacéutica de la invención puede fabricarse, envasarse o venderse en forma de una dosis unitaria única o una pluralidad de dosis unitarias únicas en forma de una formulación preparada. El término "dosis unitaria única", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad discreta de una composición farmacéutica que contiene una cantidad predeterminada de un ingrediente activo. La cantidad del ingrediente activo es típicamente igual a la dosis del ingrediente activo que se administra en un sujeto, o una porción conveniente de dicha dosis, por ejemplo, la mitad o un tercio de dicha dosis.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención son típicamente adecuadas para administración parenteral como formulaciones estériles destinadas a ser administradas a un cuerpo humano mediante ruptura de la piel o de las barreras de la mucosa, sin pasar por el tracto gastrointestinal, mediante inyección, infusión e implantación. Por ejemplo, la administración parenteral incluye, entre otras, inyección o infusión subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intraesternal, intravenosa, intraarterial, intratecal, intraventricular, intrauretral, intracraneal, intrasinovial, transdérmica; como así también, técnicas de infusión dialítica renal. Realizaciones preferidas incluyen vías intravenosas y subcutáneas. Cualquier método para administrar péptidos o proteínas que se acepte en la técnica, puede ser adecuadamente empleado para un anticuerpo anti-CD47/PD-L1 de la invención.

Se pueden preparar, envasar o vender formulaciones inyectables sin limitación, en forma de dosis unitaria, como en ampollas, viales, en recipientes de plástico, jeringas precargadas, dispositivos de autoinyección. Las formulaciones para administración parenteral incluyen, entre otras, suspensiones, soluciones, emulsiones en bases oleosas o acuosas, pastas y similares.

En otra realización, la invención proporciona una composición para administración parenteral que comprende una composición farmacéutica que se proporciona en forma seca (es decir, en polvo o granular) para su reconstrucción con una base adecuada (por ejemplo, agua estéril sin pirógenos) antes de la administración. Dicha formulación puede prepararse, por ejemplo, mediante un proceso de liofilización, que se conoce en la técnica como secado por congelación, y que implica la congelación de un producto seguido de la eliminación del disolvente del material congelado.

El anticuerpo anti-CD47/PD-L1 de la invención también puede ser administrado por vía intranasal o por inhalación, ya sea solo, como una mezcla con un excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado de un inhalador, como un recipiente de aerosol presurizado, bomba, pulverizador, atomizador, o nebulizador, en el que se usa o no un propulsor adecuado, o como gotas nasales o aerosol.

Las formas de dosificación para administración parenteral pueden formularse para ser de liberación inmediata o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida y programada.

Uso terapéutico del anticuerpo anti-CD47/PD-L1 de la invención

En un aspecto, un anticuerpo anti-CD47/PD-L1 de la invención se usa para tratar trastornos mediados por CD47 y PD-L1, por ejemplo, una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que comprende: (HNSCC) carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer cervical, cáncer de origen primario desconocido, glioblastoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga, TNBC (cáncer de mama triple negativo), CCR (cáncer colorrectal), carcinoma hepatocelular, melanoma, CPCNP (cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de riñón, cáncer de ovario, linfoma de Hodgkin, MSI CRC (cáncer colorrectal con inestabilidad de microsatélite), leucemia (leucemia aguda o leucemia mieloblástica), linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico.

En un aspecto, el sujeto sometido al tratamiento o paciente es un mamífero, preferiblemente un sujeto humano. Dicho sujeto puede ser de sexo femenino o masculino, y de cualquier edad.

En el caso de un tumor (por ejemplo, cáncer), la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento del mismo (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a CD47 y PD-L1) puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño inicial del tumor; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferiblemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, en cierta medida, el crecimiento del tumor; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. El anticuerpo o fragmento del mismo puede, en cierta medida, prevenir el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia del cáncer, la eficacia in vivo se puede medir, por ejemplo, evaluando la supervivencia general (SG), el tiempo hasta la progresión del tumor (TTP), el coeficiente global de respuesta del tumor al tratamiento (ORR), la duración de la respuesta (DR) y/o la calidad de vida.

Como se usa en este documento, los términos "coadministración", "coadministrado" y "en combinación con", con referencia a un anticuerpo anti-CD47/PD-L1 y uno o más agentes terapéuticos diferentes, se espera que signifiquen, se refieren a o incluir lo siguiente:

1) la administración simultánea de dicha combinación de un anticuerpo anti-CD47/PD-L1 de la invención y un agente terapéutico a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se formulan juntos en una forma de dosificación única que libera dichos componentes sustancialmente en la misma forma tiempo de dicho paciente,

Como se usa en este documento, los términos "coadministración", "coadministrado" y "en combinación con", con referencia a un anticuerpo anti-

CD47/PD-L1 y uno o más agentes terapéuticos diferentes, se refieren, significan o incluyen lo siguiente:

1) la administración simultánea de dicha combinación de un anticuerpo anti-CD47/PD-L1 de la invención y un agente terapéutico a un paciente que necesita
5 tratamiento, cuando dichos componentes se formulan juntos en una forma de dosis única, que libera dichos componentes a sustancialmente el mismo tiempo en dicho paciente,

2) la administración sustancialmente simultánea de dicha combinación de un anticuerpo anti-CD47/PD-L1 de la invención y un agente terapéutico a un paciente
10 que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se formulan separados unos de otros en formas de dosificación separadas que son tomadas sustancialmente al mismo tiempo por dicho paciente, con lo cual dichos componentes se liberan sustancialmente al mismo tiempo en dicho paciente,

3) la administración secuencial de dicha combinación de un anticuerpo anti-CD47/PD-L1 de la invención y un agente terapéutico a un paciente que necesita
15 tratamiento, cuando dichos componentes son formulados en forma separada, en formas de dosificación separadas, las cuales son tomadas en momentos consecutivos por dicho paciente con un intervalo de tiempo importante entre cada administración, luego de lo cual los componentes son liberados en momentos sustancialmente
20 diferentes en el paciente, y

4) la administración secuencial de dicha combinación de un anticuerpo anti-CD47/PD-L1 de la invención y un agente terapéutico a un paciente que necesita
tratamiento, cuando dichos componentes son formulados conjuntamente en una forma de dosis única que libera dichos componentes de manera controlada, después
25 de lo cual se liberan de forma simultánea, consecutiva o conjunta en dicho paciente, en donde cada porción puede ser administrada por las mismas vías o por vías distintas.

Un anticuerpo anti-CD47/PD-L1 de la invención puede administrarse sin tratamiento terapéutico adicional, es decir, como una terapia independiente. Además, el tratamiento con un anticuerpo de la invención puede comprender al menos un tratamiento terapéutico adicional (terapia de combinación). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD47/PD-L1 puede ser administrado en combinación, o ser formulado, con un medicamento/fármaco diferente contra el cáncer.

El término “agente citotóxico”, como se usa en el presente, se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de las células y/o causa la destrucción de células. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas activas encimáticamente de origen bacteriano, fúngico, planta o animal, incluyendo fragmentos y/o variants de las mismas.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil para el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclosfosfamida (CYTOXAN®); sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocuna, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilaminasas que incluyen altretamina, trietilenemelamina, trietilenfosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (por ejemplo, bullatacina y bullatacinona); beta-lapachone; lapachol colchicinas; ácido betulínico; camptotecina (incluido el topotecan análogo sintético (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escoplectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calystatin; CC-1065 (incluidos sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (por ejemplo, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluidos los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; sarcodictina; espongistatina; mostazas nitrogenadas

como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, uracilo y mostaza; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; 5 antibióticos tales como los antibióticos enediyne (por ejemplo, caliqueamicina, por ejemplo, caliqueamicina gamma II y caliqueamicina omega II (ver, por ejemplo, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994))); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforos de neocarzinostatina y cromóforos relacionados con antibióticos de cromoproteína enedina), 10 aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN[®] morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, doxorubicina HCl inyección de 15 liposomas (DOXOL[®]), liposomal doxorubicin TLC D-99 (MYOCET[®]), doxorubicina liposomal pegilada (CAELYX[®]), y deoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcellomicina, mitomicinas como ser mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicin, streptonigrina, 20 streptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatin, zorubicin; anti-metabolitos tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR[®]) tegafur (UFTORAL[®]), capecitabina (XELODA[®]), una epotilona y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina, 25 análogos de pirimidina como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxioxididina, doxifluridina, enocitabina, floxididina; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; relleno de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamiddeglicósido; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina bestrabucil; bisantreno; edatraxato; 30 defofamina; demecolcina diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio;

etoglucido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; phenamet pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidracida; procarbazona; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; triclorotrietilamina-2,2',2"; tricotecenos (por ejemplo, toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosine; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoide, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulación de nanopartículas diseñadas por albúmina de paclitaxel (ABRAXANE®) y docetaxel (TAXOTERE®); clorambucil; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; agentes de platino como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; vincas, que evitan que la polimerización de tubulina forme microtúbulos, incluyendo vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®), vindesina (ELDISINE®), FILDESIN® y vinorelbina (NAVELBINE®); etopósido (VP16); ifosfamida; mitoxantrona; leucovorin; novantrona edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, como el ácido retinoico, incluido el bexaroteno (TARGRETIN®); bifosfonatos como el clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE- 58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAJX®), pamidronato (AREDIA®), paidronato , o risedronato (ACTONEL®); troxacitabina (análogo de la citosina del nucleósido del 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en vías de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, como por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas como la vacuna THERATOPE® y las vacunas de terapia génica, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la vacuna VAXID®; inhibidor de topoisomerasa 1 (por ejemplo, LURTOTECAN®); rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); BAY439006

(sorafenib; Bayer); SU-11248 (Pfizer); perifosina, inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib o etoricoxib), inhibidor de proteosoma (por ejemplo, PS341); bortezomib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (R1 1577); orafenib, ABT510; inhibidor de Bcl-2 tal como oblimersen sódico (GENA SENSE®);
5 pixantrona; inhibidores de EGFR (se define a continuación) inhibidores de la tirosina quinasa (ver definición más abajo); y ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores, como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y
10 prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorin.

También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de las hormonas en los tumores, tales como los antiestrogénicos con perfil agonista mixto/antagonista, incluyendo tamoxifeno
15 (NOLVADEX®), 4-hidroxitamoxifeno, toremifeno (FARESTON®), idoxifeno, droloxifeno, raloxifeno (EVTSTA®), trioxifeno, keoxifeno y moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM), tales como SERM3; antiestrogenos puros sin propiedades agonistas, como fulvestrant (FASLODEX®) y EM800 (estos agentes pueden bloquear la dimerización del
20 receptor de estrógeno (ER), inhibir la unión al ADN, aumentar el recambio de ER y/o suprimir los niveles de ER); inhibidores de la aromatasa, incluidos los inhibidores de la aromatasa esteroidea, como formestane y exemestano (AROMASIN®), e inhibidores de la aromatasa no esteroidea, como el anastrozol (AREVIDEX®), letrozol (FEMARA®) y aminoglutetimida, y otros
25 inhibidores de la aromatasa, incluido el vorozol (RIVIS) acetato de megestrol (MEGASE®), fadrozol, imidazol; agonistas de la hormona liberadora de la hormona lutenizante, incluyendo leuprolide (LUPRON® y ELIGARD®), goserelina, buserelina y tripterelina; esteroides sexuales, incluyendo progestinas, como acetato de megestrol y acetato de medroxiprogesterona,

estrógenos, como dietilestilbestrol y premarin, y andrógenos/retinoides como fluoximesterona, todos los ácidos transretiónicos y fenretinida; onapristona; anti-progesterones; reguladores bajos de ñps receptores de estrógeno (ERD); anti-andrógenos, tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; testolactona;
5 y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores.

Otros agentes terapéuticos que pueden usarse en combinación con los anticuerpos anti-CD47/PD-L1 de la invención pueden ser inhibidores de la función del factor de crecimiento; por ejemplo, estos inhibidores incluyen
10 anticuerpos del factor de crecimiento y anticuerpos del receptor del factor de crecimiento (por ejemplo, los anticuerpos anticuerpos erbB2 trastuzumab [Herceptin], el anticuerpo anti-EGFR panitumumab, el anticuerpo anti-erbB1 cetuximab [Erbix, C225] y cualquier anticuerpo del factor de crecimiento o receptor del factor de crecimiento descrito por Stern et al. en *Critical reviews in*
15 *oncology/haematology*. 2005, Vol. 54, pp11-29); agentes antiangiogénicos, como los que inhiben los efectos del factor de crecimiento endotelial vascular, [por ejemplo, el anticuerpo anti-factor de crecimiento de células endoteliales vasculares bevacizumab (Avastin)], anticuerpos anti-receptor del factor de crecimiento endotelial vascular, como los anticuerpos anti-KDR y anticuerpos
20 anti-flt1; nucleótidos antisentido, por ejemplo, aquellos que están dirigidos a los objetivos listados anteriormente, como ISIS 2503, un antisentido anti-ras o G3139 (Genasense), un antisentido anti bcl2; enfoques de terapia génica, incluidos, por ejemplo, enfoques para reemplazar genes aberrantes, como p53 aberrante o BRCA1 o BRCA2 aberrante, GDEPT (terapia pro-fármaco
25 enzimática dirigida por genes), enfoques como los que utilizan citosina desaminasa, timidina quinasa o una enzima nitroreductasa bacteriana, y los enfoques para aumentar la tolerancia del paciente a la quimioterapia o radioterapia, como la terapia génica de resistencia a múltiples fármacos; enfoques de inmunoterapia, que incluyen, por ejemplo, tratamiento con

Alemtuzumab (campath-1H), un anticuerpo monoclonal dirigido a CD52, o tratamiento con anticuerpos dirigidos a CD22, enfoques ex vivo e in vivo para aumentar la inmunogenicidad de las células tumorales del paciente, transfección con citoquinas tales como interleucina 2, interleucina 4 o factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos, enfoques para disminuir la anergia de las células T, como el tratamiento con anticuerpos monoclonales que inhiben la función CTLA-4, enfoques que utilizan células inmunitarias transfectadas, como las células dendríticas transfectadas con citoquinas, enfoques que utilizan líneas celulares tumorales transfectadas con citoquinas y enfoques que utilizan anticuerpos antiidiotípicos, transferencia adoptiva de células T que utilizan células T que no han sido específicamente activadas o dirigidas a un antígeno específico interés ex vivo; inhibidores de la degradación de proteínas, como el inhibidor de proteasoma, como Velcade (bortezomid); enfoques terapéuticos bioterapéuticos, por ejemplo, aquellos que usan péptidos o proteínas (como anticuerpos o construcciones de dominio de receptor externo solubles), que aíslan ligandos del receptor, bloquean la unión del ligando al receptor o disminuyen las señales del receptor (por ejemplo, debido a una mayor degradación del receptor o niveles de expresión más bajos).

Dosificación y vías de administración

El anticuerpo anti-CD47/PD-L1 de la invención se administrará en una cantidad que sea eficaz en el tratamiento de la afección en cuestión, es decir, en la dosis y durante los periodos de tiempo requeridos para lograr el resultado deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva puede variar con relación a factores tales como la condición particular que se está tratando, la edad, el sexo y el peso del paciente, y si el anticuerpo anti-CD47/PD-L1 está siendo administrado como tratamiento independiente o en combinación con uno o más tratamientos adicionales.

Los regímenes de dosificación pueden ser regulados a fin de lograr la respuesta óptima. Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden

administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Resulta particularmente conveniente formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Una forma de dosificación unitaria como se usa en este documento se refiere a unidades físicamente discretas, adecuadas como dosificaciones unitarias para los pacientes/sujetos que se someterán al tratamiento; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico deseado. La especificación de las formas de dosificación unitaria de la invención está normalmente determinada, y depende directamente de (a) las características únicas de un agente quimioterapéutico y el efecto terapéutico o profiláctico particular que se debe lograr, y (b) las limitaciones inherentes de la técnica usada para realizar la composición, como ser un compuesto activo para el tratamiento de los pacientes.

Por lo tanto, los expertos en la material podrán apreciar, en base a las descripciones proporcionadas en el presente documento, que las dosis y los regímenes de dosificación se regulan de acuerdo con métodos bien conocidos en los ámbitos terapéuticos. Es decir que la dosis máxima tolerable puede ser establecida y también puede determinarse la cantidad efectiva que proporciona un efecto terapéutico detectable a un paciente, como también pueden determinarse los requisitos temporales para la administración de cada agente para proporcionar efectos terapéuticos detectables en un paciente. Por lo tanto, si bien en el presente se ejemplifican dosis y regímenes de administración, estos ejemplos de ninguna manera limitan las dosis y los regímenes de administración que pueden ser proporcionados a un paciente cuando se pongan en práctica las realizaciones de la invención.

Debe hacerse notar que los valores de las dosis pueden variar según el tipo y la gravedad de la condición que quiere aliviarse, y pueden incluir dosis únicas o múltiples. Asimismo, debe entenderse que para cada sujeto particular deben establecerse regímenes de dosificación particular a lo largo del tiempo y de acuerdo con las necesidades individuales y el criterio del profesional médico que administra o supervisa la administración de las composiciones. Los rangos de las dosis que se establecen en el presente son a modo de ejemplos solamente y no pretenden limitar el alcance o las prácticas de las composiciones reivindicadas. Asimismo, el régimen de dosificación de las composiciones de esta invención pueden basarse en una variedad de factores, incluyendo el tipo de enfermedad, la edad, el peso, el sexo, las condición de salud del paciente, la gravedad de su condición, la vía de administración, el anticuerpo anti-CD47/PD-1 particular empleado. Por lo tanto, el régimen de dosificación puede variar ampliamente pero puede ser determinado en la rutina utilizando métodos estándar. Por ejemplo, las dosis pueden regularse en base a parámetros farmacocinéticos o farmacodinámicos, que pueden incluir efectos clínicos, como ser efectos tóxicos y/o valores de laboratorios. Por lo tanto, la presente invención abarca la escalada de dosis intra-paciente según lo determinado por el experto en la materia. Los métodos para determinar las dosis y los regímenes apropiados son bien conocidos en la técnica y un experto en la técnica los entenderá una vez que esté en posesión de las ideas descriptas en el presente documento.

Se proporcionan ejemplos de métodos de administración adecuados más adelante.

Se cree que una dosis adecuada de un anticuerpo anti-CD47/PD-L1 de la invención estará en el rango de 0.1-200 mg/kg, preferiblemente 0.1-100 mg/kg, incluyendo aproximadamente 0.5-50 mg/kg, por ejemplo alrededor de 1-20 mg/kg. El anticuerpo anti-CD47/PD-L1 se puede administrar, por ejemplo, en una dosis de al menos 0,25 mg/kg, tal como al menos 0,5 mg/kg, incluyendo al

menos 1 mg/kg, por ejemplo, al menos 1, 5 mg/kg, tal como al menos 2 mg/kg, por ejemplo, al menos 3 mg/kg, incluyendo al menos 4 mg/kg, por ejemplo, al menos 5 mg/kg; y, por ejemplo, hasta un máximo de 50 mg/kg, incluyendo hasta un máximo de 30 mg/kg, por ejemplo, hasta un máximo de 20 mg/kg, incluyendo hasta un máximo de 15 mg/kg. La administración generalmente se repetirá en intervalos de tiempo apropiados, como ser una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas, y durante el tiempo que el médico responsable lo considere apropiado, pudiendo, en algunos casos, aumentar o reducir la dosis, si fuera necesario.

10 *Artículos de producción (productos) y kits*

En otra realización más, la invención proporciona un artículo de fabricación que comprende productos destinados ser utilizados en el tratamiento del cáncer, por ejemplo, en el tratamiento de HNSCC, cáncer cervical, cáncer de origen primario desconocido, glioblastoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga, TNBC, CCR, carcinoma hepatocelular, melanoma, CPNM, cáncer de riñón, cáncer de ovario, linfoma de Hodgkin, CCR de MSI, leucemia (leucemia aguda o leucemia mieloblástica), linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico. El producto es un envase o recipiente que lleva una etiqueta y/o contiene un prospecto, que puede estar dentro o fuera de dicho envase. Los recipientes o envases adecuados incluyen, por ejemplo, ampollas, viales, jeringas, etc. Los envases pueden estar hechos de varios materiales, como ser vidrio o polímeros. El envase comprende una composición que es efectiva para el tratamiento de una cierta condición, y puede tener una boca de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial con una pieza de cierre o tapón que pueda ser perforado con una aguja hipodérmica para inyección). Por lo menos un ingrediente activo de la composición es un anticuerpo anti-PD-L1 según esta invención. La etiqueta o el prospecto indicarán que la composición está destinada a ser usada para el tratamiento de una determinada condición. La etiqueta o el prospecto además

incluirán instrucciones para administrar la composición del anticuerpo a un paciente.

El prospecto contiene las instrucciones que normalmente se incluyen en los envases de productos terapéuticos que se comercializan en el Mercado, incluyendo información sobre las indicaciones, frecuencia, dosis, vías de administración, contraindicaciones y/o precauciones para dichos productos terapéuticos. En una realización, el prospecto indica que la composición está destinada al uso en el tratamiento del cáncer, por ejemplo de HNSCC, cáncer cervical, cáncer de origen primario desconocido, glioblastoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga, TNBC, CCR, carcinoma hepatocelular, melanoma, CPNM, cáncer de riñón, cáncer de ovario, linfoma de Hodgkin, MSI CCR, leucemia (leucemia aguda o leucemia mieloblástica) linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico.

Asimismo, el artículo puede también incluir un segundo recipiente con un tampon farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BSVI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Además, el artículo puede incluir otros productos necesarios desde un punto de vista comercial y desde el punto de vista del consumidor, en particular, otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

La invención también se refiere a kits que pueden usarse para diversos fines, por ejemplo, para la detección de PD-L1 en tejidos, células o fluidos corporales de un mamífero. Un kit de este tipo sería útil para el cribado asociado con enfermedades PD-L1. El kit incluye un agente de unión específico o anticuerpo de la invención y medios para indicar la reacción del agente de unión específico o anticuerpo anti-PD-L1, cuando está presente. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En una realización, el anticuerpo que se une a PD-L1 está marcado. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo primario no marcado y el kit comprende además medios para detectar el anticuerpo primario. En una realización, los medios de detección incluyen un

segundo anticuerpo marcado que es una anti-inmunoglobulina. El anticuerpo puede estar marcado con un marcador seleccionado del grupo que consiste en un fluorocromo, una enzima, un radionúclido y un material radiopaco. El kit puede ser un kit que contiene anticuerpos para detectar y cuantificar PD-L1 in vitro, por ejemplo, mediante la implementación de técnicas como ELISA o transferencia de Western. Además, como en el caso de los artículos, el kit comprende un contenedor y una etiqueta o prospecto, ubicado en o dentro del contenedor. El recipiente contiene una composición que comprende al menos un anticuerpo anti-PD-L1, de acuerdo con la invención. Los contenedores adicionales pueden comprender, por ejemplo, diluyentes y tampones, anticuerpos de control. La etiqueta o el prospecto en el envase pueden contener una descripción de la composición, así como instrucciones para su uso in vitro o con fines de diagnóstico.

Uso diagnóstico y composiciones

El anticuerpo anti-CD47/PD-L1 de la invención también se usa en procesos de diagnóstico (por ejemplo, in vitro, ex vivo). Por ejemplo, se puede usar el anticuerpo anti-CD47/PD-L1 para detectar o medir el nivel de CD47 y/o PD-L1 en muestras obtenidas de un paciente (por ejemplo, muestra de tejido o una muestra de fluido corporal, como una exudado inflamatorio, sangre, suero, fluido intestinal, saliva u orina). Los métodos adecuados para la detección y medición incluyen inmunoensayos, como la citometría de flujo, el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), el ensayo de quimioluminiscencia, el radioinmunoensayo y la inmunohistología. La invención incluye además kits, por ejemplo, kits de diagnóstico que comprenden anticuerpos anti-CD47/PD-L1 descritos en el presente documento.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para una mejor comprensión de la invención. El propósito de estos ejemplos es solamente el de ilustrar y no deben ser interpretados en modo de limitar el alcance de la invención de manera alguna.

5 Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente citadas en esta descripción quedan incorporadas a este documento en virtud de dicha referencia. Si bien esta invención ha sido descrita con algún grado de detalle a modo de ilustración y ejemplo para facilitar la claridad de su comprensión, a los expertos en la técnica les resultará obvio que, a la luz de las enseñanzas de esta invención,
10 ciertos cambios y modificaciones pueden ser realizados en la misma sin variar del espíritu y alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1. Producción de antígenos recombinantes y anticuerpos en cultivo en suspensión de células de mamíferos.

15 Las secuencias de los dominios extracelulares de CD47 humano (Leu19-Val134) y PD-L1 (Phe19-Arg238) (SEC. ID NOs: 107-108) fueron clonadas en un plásmido para producir proteína marcada con Fc en células de mamíferos (Fig. 1) en Los sitios de restricción SalI/NotI. Se produjeron las cantidades de plásmidos requeridas en células de E.Coli y se purificaron utilizando el kit Qiagen.

20 Las secuencias de los dominios variables del anticuerpo anti-CD47 (B6H12, Stanford University, US20130142786) se clonaron en plásmidos para producir la proteína IgG1 en células de mamíferos. Las cantidades requeridas de plásmidos se produjeron en células de E. Coli y se purificaron utilizando el kit Qiagen.

25 Se generaron anticuerpos y antígenos en una línea celular establecida obtenida de células de ovario de hámster chino (CHO-K1). El cultivo en suspensión se realizó en matraces en un agitador orbital utilizando medios sin suero (Life Technologies Corporation) y de acuerdo con las pautas del

fabricante. Para la expresión transitoria, se transfectaron células en una concentración de 2×10^6 /ml mediante polietilenimina lineal (por ejemplo, PEI MAX, Polysciences). La relación ADN/PEI fue de 1:3/1:10. En 5-7 días después de la transfección, se centrifugó el cultivo celular a 2000 g durante 20 min y se
5 filtró a través de un filtro de 0,22 μ m. Las proteínas diana se aislaron del líquido de cultivo mediante HPLC afín.

Las proteínas Fc recombinantes se aislaron y se purificaron a partir de cultivo celular en una columna de Proteína A para HPLC afín. El líquido de cultivo aclarado fue pasado a través de 5 ml de la columna HiTrap rProtein A
10 Sepharose FF (GE Healthcare) equilibrada con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4). Luego, se lavó la columna con 5 volúmenes de PBS para eliminar los componentes unidos no específicos. El antígeno unido se eluyó con tampón de glicina 0,1 M (pH 8). El pico de elución de la proteína principal se recogió y se llevó a pH neutro con tampón Tris 1 M (pH 8). Todas las etapas se
15 realizaron a una velocidad de flujo de 110 cm/h. Luego, la proteína fue dializada en PBS (pH 7,4) utilizando la técnica SnakeSkin Dialysis Tubing, filtrada (0,22 μ m), y transferida a tubos, para ser almacenada a -70°C.

La pureza de la solución proteica obtenida fue evaluada mediante SDS-PAGE (12%gel) no reductor ilustrado en la Figura 2.

20 **Ejemplo 2. Preparación de anticuerpos de longitud completa**

La clonación se realizó mediante la técnica estándar. Se generaron productos de PCR con contenido de genes de dominios variables de cadena pesada/ligera de anticuerpos con cebadores que comprenden sitios de restricción. El dominio variable de la cadena pesada se clonó en el vector pEE-Hc IgG1 en los sitios de restricción
25 Sal1/Nhe1. El dominio variable de la cadena ligera se clonó en el vector pEE-CK en los sitios de restricción Sal1/BsiW1. Las construcciones genéticas obtenidas se utilizaron para la producción transitoria de proteínas en la línea celular CHO-T. Las proteínas se aislaron y se purificaron de acuerdo con los métodos estándar mediante

cromatografía de afinidad en Proteína A bacteriana como se describe en el Ejemplo 1. La electroforesis se realizó en PAGE desnaturalizante al 12% suplementado con mercaptoetanol (Fig. 3) y PAGE desnaturalizante al 8% no suplementado con mercaptoetanol (Fig. 4).

Ejemplo 3. Ingeniería de una biblioteca “naive” de fagos humanos Fab MeganLib™

Se aisló el ARN total de linfocitos B de muestras de sangre de más de mil donantes humanos individuales usando un RNeasy Mini Kit (QIAGEN) de acuerdo con el protocolo sugerido. Se efectuó el ensayo de concentración de ARN con el kit Nanovue (GE Healthcare); se verificó la calidad del ARN aislado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

Se realizó la reacción de transcripción inversa con el kit MMLV RT (Evrogen) de acuerdo con el protocolo recomendado con MMuLV transcriptasa inversa y oligonucleótidos de hexámero aleatorios como cebadores.

Los productos de transcripción inversa se utilizaron como matriz en una reacción en cadena de la polimerasa en dos etapas para obtener los genes de dominios variables flanqueados por sitios de restricción; la reacción se realizó utilizando el kit de oligonucleótidos según los protocolos de [J Biol Chem. 1999 25 de junio; 274 (26):18218-30].

El producto de ADN obtenido (VL-CK-VH) fue tratado con endonucleasas de restricción NheI/Eco91I y ligado en el fagémido original pH 5. Los productos de ligación se transformaron en células electrocompetentes de E. coli SS320 preparadas de acuerdo con los protocolos [Methods Enzymol. 2000; 328:333-63.]. El repertorio de la biblioteca de visualización de fagos Fab combinados MeganLib™ fue de 10^{11} transformantes. Los productos de la biblioteca de fagos Fab se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente [J Mol Biol. 1991 5 de diciembre; 222 (3):581-97].

Ejemplo 4. Inmunización de llama con antígeno humano CD47 y generación de biblioteca de exhibición de fagos de fragmentos de anticuerpos de llama.

Se inmunizó *Lama Glama* (llama) 5 veces, seguido de administración subcutánea de material antigénico mezclado con un volumen igual de adyuvante de Freund completo (primera inyección) o incompleto (otras inyecciones). Se usó la proteína humana recombinante CD47 del Ejemplo 1 (1 mg/inyección) como antígeno. Las inyecciones de antígeno se realizaron en los siguientes intervalos: 0, 2, 4, 5, 8 semanas. Se recogieron muestras de sangre (50 ml) 5 después de cada inyección a partir de la tercera inyección. Se usó citrato de sodio al 3.8% como anticoagulante (1:9). Se diluyó la sangre 2 veces con una solución salina estéril. Luego se colocaron 30 ml de solución de sangre diluida en 15 ml de medio Lymphoprep™ (Axis-Shield, Noruega) (densidad de 1.077 g/ml) y se centrifugaron durante 20 minutos a 800 g. Las células mononucleares (linfocitos y monocitos) se seleccionaron de la zona de interfase del medio plasma/Lymphoprep y se lavaron con PBS estéril.

En este caso, el recuento estimado de moléculas de matriz en todas las reacciones no fue inferior a 1011. El título de inmunoglobulina sérica anti-CD47 medido de acuerdo con el protocolo estándar fue de al menos 1/100000, que es suficiente para preparar una biblioteca de anticuerpos.

El ARN total de las células mononucleares de llama se aisló usando el RNeasy Mini Kit de acuerdo con el protocolo (QIAGEN). El ensayo de concentración de ARN se realizó utilizando Nanovue (GE Healthcare); La calidad del ARN aislado se probó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

La reacción de transcripción inversa se realizó utilizando el kit MMLV RT (Evrogen) de acuerdo con el protocolo recomendado con MMuLV transcriptasa inversa y cebadores hexaméricos aleatorios.

Los productos de la transcripción inversa se utilizaron como matriz en una reacción en cadena de la polimerasa en dos etapas para obtener los genes de los monodominios VHH, scFv o Fab flanqueados por sitios de restricción; la reacción se realizó con el kit de oligonucleótidos y los protocolos de [FASEB J. 2007 Nov; 21 (13):3490-8]. El producto de ADN del gen VHH obtenido se trató con restrictivasas NcoI/NotI y se ligó en el fagemid pscFv original, que es análogo en su composición a pHEN2 utilizado en [FASEB J. 2007 Nov; 21 (13):3490-8]. Los productos de ligación se transformaron en células electrocompetentes SS320 preparadas de acuerdo con los protocolos [Methods Enzymol. 2000; 328:333-63.].

Los repertorios de bibliotecas construidas en base a VHH fueron transformantes independientes $0,5-2 \times 10^8$. Los repertorios de bibliotecas contruidas en base a scFv/Fab fueron $0,5-2 \times 10^9$ / $1,2-2,5 \times 10^9$, respectivamente. El producto de la biblioteca de fagos se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente [J Mol Biol. 1991 5 de diciembre; 222 (3):581-97].

Ejemplo 5. Selección de bibliotecas de presentación de fagos de fragmentos de anticuerpos

Se seleccionaron anticuerpos anti-CD47 específicos a partir de bibliotecas de presentación de fagos Fab, VHH o scFv (Ejemplos 3, 4) mediante procedimientos de selección convencionales descritos en [EMBO J. 1994 15 de julio; 13 (14):3245-60, Nat Biotechnol . 1996 Mar; 14 (3):309-14; J Mol Biol.1991 5 de diciembre; 222 (3):581-97], pero usando perlas magnéticas y el dispositivo KingFisher Flex, porque esta técnica permite realizar simultáneamente hasta 96 esquemas y variantes diferentes.

Se inmovilizó intencionalmente el antígeno PD-L1/CD47 biotinilado humano (Fc, EPEA) sobre perlas magnéticas de estreptavidina (NEB) a una concentración de 10 µg/ml para la primera ronda, 2 µg/ml para la segunda ronda, 0.4 y 0.2 µg/ml para la tercera ronda y cuarta ronda, respectivamente. El antígeno se incubó con las perlas durante 1 hora a temperatura ambiente en un rotador. Las perlas se lavaron luego con PBS (pH 7,4), la superficie de las perlas se bloqueó con una solución de

leche sin grasa al 2% o BSA al 1% en PBS (pH 7,4) durante 1 hora. La biblioteca de fagos humanos MeganLib™ se diluyó a una concentración de 2×10^{13} partículas de fago/ml en PBS (pH 7,4) con un 2% de leche sin grasa y un antígeno no diana con contenido de etiqueta de antígeno diana, y se preseleccionó mediante cuentas magnéticas que sin contenido de antígeno en superficie, con el fin de eliminar fagos de unión inespecíficos. Se incubaron luego las perlas magnéticas recubiertas con IL-5R α con MeganLib™ durante 1-2 horas a temperatura ambiente.

Los fagos no unidos se eliminaron mediante varios ciclos de lavado de las perlas magnéticas con una solución de PBS (pH 7,4) que contenía Tween-20 al 0,1%. El número de ciclos de lavado aumentó de ronda a ronda (3 ciclos de lavado en la primera ronda, 9 ciclos de lavado en la segunda ronda y 15 ciclos de lavado en la cuarta ronda). Los fagos que se unieron al antígeno en la superficie de las perlas magnéticas se eluyeron de las perlas con una solución 100 mM de Gly-HCl (pH 2,2) durante 15 min con agitación, y luego se neutralizaron con Tris-HCl 1 M (pH 7,6). Las bacterias de E. coli TG1 fueron infectadas con fagos, cultivadas en medio de cultivo y luego utilizadas en el siguiente ciclo de selección. Después de tres o cuatro rondas, se aisló ADN fagémido del cultivo de E. coli TG1 de acuerdo con el protocolo del fabricante (Qiagen). Se usó el inmunoensayo enzimático de fago policlonal (ELISA) para el enriquecimiento de la biblioteca frente a antígenos diana y la evaluación de la presencia de partículas de fago que no se unían específicamente.

Ejemplo 6. ELISA de fagos policlonales contra antígenos específicos y no específicos.

Se inmovilizaron el antígeno diana (CD47/PD-L1) y el no diana (con proteína de fusión Fc) en placas de alta absorción (Greiner-Bio) para realizar el ensayo ELISA. La proteína se añadió a una concentración de 1 μ g/ml y 5 μ g/ml, respectivamente, en NaHCO₃ 0,1 M (pH 9,0) y se tituló con un incremento de 2 a 7 diluciones; las placas selladas se incubaron durante la noche a 4°C. Todos los pasos posteriores se realizaron de acuerdo con el protocolo ELISA estándar utilizando una plataforma robótica basada en Tecan Freedom EVO 200 de alto rendimiento

(Tecan). Para bloquear la unión no específica, se añadió tampón de bloqueo que comprendía 2% de leche sin grasa o BSA al 1% en PBS (pH 7,4) a los pocillos de la placa. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de varios ciclos de lavado con solución salina de fosfato con contenido de Tween 20 (PBST), se agregaron 50 µl/pocillo de fago policlonal del ensayo. Después del lavado, se recubrió cada pocillo (50 µl/pocillo) con anticuerpo secundario conjugado con HRP anti-M13 (Pierce-ThermoScientific) en PBST (1:7500). Después de 50 minutos de incubación a temperatura ambiente, las placas se lavaron tres veces con PBST. La señal colorimétrica se obtuvo al agregar una solución de sustrato (H₂O₂-0.02% y TMB en CH₃COONa pH 5.5) durante 10 minutos; el desarrollo del color se bloqueó agregando ácido sulfúrico al 1% (20 µl). La señal de color se midió a 450 nm utilizando un lector de placas Tecan-Sunrise (Tecan) adecuado

El ensayo ELISA del producto de fago policlonal demostró un importante enriquecimiento después de las tercera y cuarta rondas de selección del antígeno diana. Las bibliotecas se seleccionaron para su re-clonación y posterior estudio, en donde se observó que la señal excedía 5 veces a una dilución mínima de las bibliotecas de fagos para antígenos de control no homólogos.

Ejemplo 7

Reclonación de genes de fragmentos de anticuerpos en plásmidos de expresión

Se realizó la reclonación de genes de dominios variables de anticuerpos en un plásmido de expresión del vector fagémido después de las rondas exitosas de selección, de acuerdo con un protocolo estándar que utiliza la técnica de ligamiento de restricción.

El conjunto resultante de clones, enriquecidos con monodominios de VHH o scFv, específicos contra CD47 se volvió a clonar en el plásmido de expresión pET-22 (Novagen) bajo el control del promotor T7, que transporta secuencias marcadas myc e His6 en el extremo C-terminal de VHH. Los genes Fab para bibliotecas que

comprenden secuencias enriquecidas contra el antígeno CD47 se volvieron a clonar en el vector de expresión pLL4, bajo el control del promotor lac, que además comprendía secuencias de etiqueta myc e His6 en el extremo C del dominio de cadena pesada CH1.

5 Posteriormente, los vectores de expresión que comprenden fragmentos de anticuerpos se transformaron en *E. coli* Bl21 (DE3) Gold (Stratagene) para la generación de fragmentos de anticuerpos mediante secreción en el medio de cultivo y se realizó un análisis comparativo de la afinidad de fragmentos de anticuerpos variables de bibliotecas de presentación al antígeno mediante ELISA. utilizando la
10 plataforma Mabnext Flow Chart.

Ejemplo 8. Análisis de la unión específica de scFv o monodominio de VHH a CD47-Fc humano.

Se usó la técnica ELISA para medir la unión de fragmentos de anticuerpos de ensayo específicos del Ejemplo 4 a CD47-Fc humano. Las placas de pocillos ELISA
15 (Nunc ImmunoMaxisorp) se cubrieron con 50 µl/pocillo de CD47-Fc humano (Biocad) (0,5 µg/ml en tampón de carbonato de recubrimiento 1X); se sellaron y se incubaron durante la noche a 4°C. Todas las etapas adicionales se realizaron de acuerdo con los protocolos ELISA estándar con una plataforma automatizada de alto rendimiento basada en sistemas robóticos de tipo GenetixQ-pix2xt (Molecular
20 Devices) y Tecan Freedom EVO 200 (Tecan). La unión no específica se bloqueó agregando un tampón de bloqueo BB (200 µl de leche sin grasa al 0,5% en PBS). Las placas se incubaron en un agitador durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS-Tween, cada célula se recubrió con 100 µl de sobrenadante celular con contenido de fragmento de anticuerpo del ensayo. Las
25 placas se incubaron en un agitador durante 1 hora a temperatura ambiente; luego, cada placa se lavó 5 veces con tampón PBS-Tween. Después del lavado, se añadió clon anti-MYC IgG de ratón 9E10 (ThermoFisher Scientific) (50 µl/pocillo) a PBS-Tween (1:5000). Las placas se agitaron en un agitador rotatorio (50 min a temperatura ambiente) y luego se lavaron 5 veces con tampón PBS-Tween como se

describió anteriormente. Después del lavado, se añadió conjugado anti-IgG HRP de ratón (ThermoFisher Scientific) (50 µl/pocillo) a PBS-Tween (1:10000). Las placas se agitaron en un agitador rotatorio (50 min a temperatura ambiente) y luego se lavaron 5 veces con tampón PBS-Tween como se describió anteriormente. La señal colorimétrica se obtuvo al agregar TMB (50 µl/pocillo) hasta saturar (promedio de 10-12 min); se bloqueó el desarrollo de color adicional mediante la adición de una solución de parada (25 µl/pocillo, ácido sulfúrico al 1%). La señal de color se midió a 450 nm utilizando un lector de placas Tecan-Sunrise adecuado (Tecan). La unión del anticuerpo fue proporcional a la señal producida. Los clones en los que la señal de color superó la señal de fondo más de 5 veces fueron verificados en un ensayo ELISA competitivo para identificar fragmentos de anticuerpos específicos antagonistas que bloquean la interacción entre el ligando SIRP-Fc (BIOCAD) y el receptor CD47-Fc humano en condiciones análogas a las descritas en [WO2016048188 A8] y bajo una señal reducida 4 veces en comparación con un control que no comprende los fragmentos de anticuerpo del ensayo.

La revisión de 2400 clones dio como resultado 265 clones de scFv y VHH, demostrando dicho exceso de 5 veces en la señal respecto del antecedente. Dicho panel de clones positivos produjo 27 clones antagonistas capaces de bloquear la interacción entre el ligando SIRP-Fc (BIOCAD) y el receptor CD47-Fc humano. La secuencia de nucleótidos de los genes de clon positivos fue determinada mediante la secuenciación de Sanger en Genetic Analyzer 3130xl (Applied Biosystems). Se obtuvieron seis ejemplos de clones de monodominio VHH que difieren en secuencia en al menos 1 aminoácido, pero que tienen regiones CDR, cada una con al menos un 90% de homólogas a las otras, lo que indica que se originaron a partir de un clon parental en virtud de la maduración in vivo en una inmunización llama (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencias de monodominios VHH de unión específica de CD47 a CD47 humano.

Nombre del Clon	Secuencia de aminoácido	Unidades OD, screening inicial para CD47-Fc	Unidades OD, se unen en CD47 propietario	Unidades OD, screening competitivo para SIRP-Fc
BCD106-02_L.Alecto.V HHSel2_MP1_H10_78	QVKLEESGGGLVQPGGSL RLSCAASRSISSINAMNWWY RQAPGKRREWVAQITGEG ITNYRDSVKGRFTITSDNA KNTMYLQMNSLKPEDTA VYYCNAFVIHTTSEVYWG QGTLTVTVSS	0.4	0.448	0.095
BCD106-02_L.Alecto.V HHSel2_MP1_G5_37	AVQLVDSGGGLVQPGGSL RLSCAASRSIFSINAMNWWY RQAPGNRREWVAQITDEG ITNYVDSVKGRFTITRDNA KNTMYLQMNSLKPEDTA VYYCNAFVITTTSEIYWGQ GTTTVTVSS	0.166	0.426	0.143
BCD106-02_L.Alecto.V HHSel2_MP1_G7_53	QVKLEESGGGLVQPGGSL TLSCAASGISSINAMNWWY RQAPGKRREWVAQITGEG ITNCRDSWKGRFSITSDSA NNTMYLQMNNLKPDDTD VYYCNAFVIHTTSEIYWGL GTTTVTVSS	0.319	0.498	0.088
BCD106-02_L.Alecto.V HHSel2_MP1_F10_76	DVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASRNIFSINAMNWWY RQAPGKRREWVAQITSEGI TNYVDSVKGRFTITRDNA KNTMYLQMNSLKPEDTA VYYCNAFVITASSEVYWG QGTTTVTVSS	0.213	0.312	0.114
BCD106-02_L.Alecto.V HHSel2_MP1_C7_49	AVQLVDSGGGLVQPGGSL RLSCAASRSIFSINAMNWWY RQAPGNRREWVAQITDEG ITNYVDSVKGRFTITRDNA KNTMYLQMNSLKPEDTA VYYCNAFVITTTSEIYWGQ GTTTVTVSS	0.127	0.379	0.14
BCD106-02_L.Alecto.V HHSel2_MP1_B9_64	DVQLVESGGGLVQPGGSL TLSCAASRNIFRINAMNWWY YRQAPGKRREWVAPITSE GITNYVDSVKGRFTITRDN AKNTMYLQMNSLKPEDT	0.129	0.24	0.188

	AVYYCNACLITASSEVYW GQGTLLTVSS			
Antígeno de control negativo+ conjugado	-	0.021	0.024	0.481

Ejemplo 9. Análisis de la unión específica de Fab a CD47-Fc humano.

Los Fab se produjeron de acuerdo con la técnica estándar: las células bacterianas se transformaron con vectores de expresión que contenían genes Fab, y la posterior adición del inductor, que desencadena la transcripción de operón lac, en el medio, durante el cultivo de los transformantes resultantes, produce la expresión de los Fabs.

Luego se realizó el ensayo ELISA para buscar Fabs que se unían al CD47 humano.

Se utilizó Fab B6H12 con una secuencia publicada (ver Ejemplo 1) como control positivo. Para comprobar la unión específica, las placas de pocillos ELISA (unión de medio, Greiner bio one) se cubrieron con 50 µl/pocillo de CD47 Fc de llama (0.2 µg/ml en tampón de carbonato 1X), se sellaron y se incubaron durante la noche a 4°C. Todas las etapas adicionales se realizaron de acuerdo con los protocolos ELISA estándar con una plataforma automatizada de alto rendimiento basada en sistemas robóticos como Genetix Qpix2xt (Molecular Devices) y Tecan Freedom EVO 200 (Tecan). La unión no específica se bloqueó agregando un tampón de bloqueo BB (200 µl de leche sin grasa al 0,5% en PBS). Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS-Tween, cada célula se recubrió con 60 µl/pocillo de sobrenadante celular que contenía el Fab de prueba. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente; Cada placa se lavó 3 veces con tampón PBS-Tween. Después del lavado, cada pocillo se recubrió (50 µl/pocillo) con anticuerpo secundario conjugado con HRP anti-humano

(Pierce-ThermoScientific) en PBS-Tween (1:7500). Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con tampón PBS-Tween, como se describe anteriormente. La señal colorimétrica se obtuvo al agregar TMB (50 µl/pocillo) hasta saturar (15 min); se bloqueó el desarrollo de color adicional mediante la adición de una solución de parada (25 µl/pocillo, ácido sulfúrico al 1%). La señal de color se midió a 450 nm utilizando un lector de placas Tecan-Sunrise (Tecan) adecuado. La unión del anticuerpo fue proporcional a la señal producida. Los clones en los que una señal de color excedía la señal del anticuerpo de control fueron testeados mediante ELISA respecto de las uniones no específicas.

Ejemplo 10. Análisis de uniones no específicas de Fab a varios antígenos humanos

El segundo screening tiene el objetivo de seleccionar los clones que producen FAB que interactúan con el antígeno CD47 de longitud completa y no interactúan con antígenos no específicos y también compiten con el ligando (CD47) para la unión a SIRPa.

El protocolo ELISA fue empleado para analizar uniones no específicas de los Fab testeados a otros antígenos. El análisis se realizó según se describió antes, pero se usaron 3DHer3-H6E, INFα2b, PD-L1-Fc-lama (2.5 µg/ml en 1 × tampón de carbonato) como antígenos para inmovilización. Se utilizaron CD47 FE y CD47 Fc lama (0,2 µg/ml en 1 × tampón de carbonato) como controles de unión específicos. Todas las etapas adicionales se realizaron de acuerdo con el protocolo ELISA estándar con una plataforma automatizada de alto rendimiento basada en sistemas robóticos como Genetix Qpix2xt (Dispositivo Molecular) y Tecan Freedom EVO 200 (Tecan).

Se empleó ELISA competitivo para testear Fab específicos de CD47 anti-humanos pre-seleccionados respecto de su capacidad de bloquear la interacción con el receptor SIRPa. Se utilizaron Fab de una secuencia publicada (véase el Ejemplo 1) como control positivo del antagonista.

Placas con pocillos ELISA (de alta unión, Greiner Bio One) fueron cubiertas con 50 µl/well of SIRPa (0.5 µg/ml in 1X tampón de carbonato) y se incubaron durante la noche a 4 ° C. Todas las etapas posteriores se realizaron de acuerdo con protocolos estándar de ELISA con una plataforma automatizada de alto rendimiento
5 basado en sistemas robóticos como Genetix Qpix2xt (Molecular Devices) y Tecan Freedom EVO 200 (Tecan). La unión no específica se bloqueó agregando un tampón de bloqueo BB (200 µl de leche sin grasa al 0,5% en PBS). Las placas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente.

En paralelo, el sobrenadante celular que comprendía el Fab de prueba y CD47
10 Fc lama (a una concentración final de 1 µg/ml en PBS-Tween) se mezcló en una proporción 1:1 en placas no absorbentes, y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente.

Después de lavar la placa que contiene el receptor SIRPa para eliminar BB, se transfirió a la placa una mezcla de Fab y CD47 Fc lama, se incubó durante 45
15 minutos a temperatura ambiente. Cada placa se lavó tres veces con PBS-Tween, se agregaron 50 µl/pocillo de anticuerpo secundario conjugado con HRP Fab antihumano (Pierce-ThermoScientific) a PBS-Tween (1:7500). Las placas se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con PBS-Tween, como se describió anteriormente. La señal colorimétrica se obtuvo al agregar
20 TMB (50 µl/pocillo) hasta saturar (promedio de 15 min); se bloqueó el desarrollo de color adicional mediante la adición de una solución de parada (25 µl/pocillo, ácido sulfúrico al 1%). La señal de color se midió a 450 nm utilizando un lector de placas Tecan-Sunrise adecuado (Tecan). La unión de Fab fue inversamente proporcional a la señal de color producida. Los clones que mostraron bloqueo a nivel del control
25 Fab fueron declarados como positivos y se usaron en ensayos adicionales. Los genes de los dominios variables de los clones positivos se secuenciaron de acuerdo con los protocolos estándar en Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) y fueron analizados.

Ejemplo 11. Cribado comparativo de fragmentos de anticuerpo anti-CD47 por la constante de disociación cinética koff (kdis).

Los fragmentos de anticuerpo VHH se midieron para proporcionar un ejemplo de análisis de los parámetros cinéticos de interacción de los fragmentos de anticuerpo que se unen específicamente al receptor CD47. El cribado comparativo basado en la constante de disociación (kdis) para los fragmentos VHH se realizó utilizando los biosensores reactivos amino Octet Red 96 y ARG2 (Pall-ForteBio). Las constantes de afinidad se pueden calcular en función de la concentración exacta de proteína en la solución de prueba y, como los medios de crecimiento celular se usaron como una solución del ensayo y no se midieron las concentraciones de proteína, los candidatos se compararon entre sí utilizando su constante de disociación. Los biosensores se rehidrataron previamente durante una hora en agua. Después de activar los biosensores, CD47-Fc a una concentración de 10 µg/ml en tampón de acetato de pH4 fue inmovilizada no específicamente (por grupos NH₂) sobre el biosensor. Los sensores luego se sumergieron en pocillos que contenían medio de crecimiento celular con VHH específicos (de aproximadamente 1 µg de VHH en 1 ml de medio), donde se asoció el complejo. Los sensores se sumergieron luego en una solución tampón, donde tuvo lugar la siguiente etapa de disociación del complejo. Se añadió 1/10 del volumen de 10x de tampón de trabajo a las muestras de prueba en un medio de crecimiento de *E. Coli* que contenía fragmentos de VHH anti-CD47. Las curvas obtenidas se analizaron utilizando OctetDataAnalysis (versión 7.0) según el procedimiento estándar con modelo de interacción de 1:1.

Los resultados del cribado Koff de candidatos VHH anti-CD47 se muestran en la Tabla 2. Se demostró la unión específica de todos los fragmentos de VHH a CD47 humano; el candidato BCD106-02_L.Alecto.VHHSel2_MP1_C7_49 fue seleccionado en base a kdis predominantes para estudios adicionales y reclonación para obtener anticuerpos biespecíficos.

Tabla 2. Constantes de disociación cinética de VHH con CD47-Fc

No	Nombre del Clon	kdis(1/s)
1	BCD106-02_L.Alecto.VHHSel2_MP1_B9_64	8.00E-03
2	BCD106-02_L.Alecto.VHHSel2_MP1_C7_49	5.00E-03
3	BCD106-02_L.Alecto.VHHSel2_MP1_F10_76	1.00E-02
4	BCD106-02_L.Alecto.VHHSel2_MP1_G5_37	6.00E-03
5	BCD106-02_L.Alecto.VHHSel2_MP1_G7_53	8.00E-03
6	BCD106-02_L.Alecto.VHHSel2_MP1_H10_78	6.00E-03
7	BCD106-02_L.Alecto.VHHSel2_MP1_B9_64	8.00E-03

Ejemplo 12. Obtención de construcciones y producción de anticuerpos anti-CD47/PD-L1 biespecíficos asimétricos.

5 Las secuencias de todos los dominios variables de fragmentos scFv optimizados, y las secuencias de genes para la síntesis de variantes de tipo salvaje y mutantes del dominio variable VHH del candidato BCD106-02-VHH_C7_49 (Tabla 3) y los genes de dominios variables de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo anti-PD-L1 (BCD135, anticuerpo humano original de BIOCAD) fueron obtenidas, *de*
10 *nov*o, mediante un cálculo en el que se utilizaron algoritmos informáticos patentados y síntesis de PCR de oligonucleótidos obtenidos en sintetizadores ASM-2000 (Novosibirsk) de acuerdo con el protocolo estándar [http://www.openwetware.org/wiki/DNA_Synthesis_from_Oligos]. Los genes largos scFv fueron derivados de los genes VH y VL utilizando una síntesis de PCR
15 de dos pasos a partir de moléculas de ADN de cadena simple. Después de la síntesis de PCR, los fragmentos de ADN fraccionados en gel de agarosa se purificaron en columnas de *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). Los genes scFv y VHH se ligaron individualmente en el plásmido pEE-Fc (botón), mientras que el dominio

variable de la cadena pesada del anticuerpo específico de aPD-L1 se ligó individualmente en el plásmido pEE-Fc (ojal). pEE-Fc (botón) contiene IgG1 Fc humana con mutaciones S354C + T366W, y pEE-Fc (ojal) contiene IgG1 Fc humana con mutaciones Y349C + T366S + L368A que proporciona heterodimerización de estas porciones de Fc entre sí, bajo un grado mínimo de homodimerización [Nat Biotechnol. 1998 Jul; 16 (7):677-81.], con expresión co-transitoria en células CHO-EBNA con el dominio variable de la cadena ligera aPD-L1, clonado de forma análoga en pEE-Clambda. Después de la clonación por ligadura independiente mediante método LIC modificado [Aslanidis C, de Jong PJ. *Ligation-independent cloning of PCR products* (LIC-PCR). Nucleic Acids Res. 1990; 18:6069–6074]), el ADN fue transformado en *E. coli*. Las construcciones con las secuencias correctas pEE-Fc (botón) -scFv o pEE-Fc (botón) -VHH se cotransfectaron con pEE-BCD135-VH-299P-HC-ojal y pEE-BCD135-01 4LG VL hzau CL para obtener los llamados “anticuerpos biespecíficos asimétricos” (ver Fig. 6). La figura muestra modelos esquemáticos de anticuerpos biespecíficos asimétricos de base A en fragmentos de unión Fab scFv anti-CD47 y anti-PD-L1, y de base B- en fragmentos de unión Fab VHH anti-CD47 y anti-PD-L1. Las construcciones genéticas resultantes se utilizaron para producir proteínas en la línea celular CHO-T, de acuerdo con el Ejemplo 2. Después de la purificación, los anticuerpos fueron altamente homogéneos en su composición, los rendimientos de producción de anticuerpos biespecíficos variaron de 60 a 260 mg/ml de medio de cultivo. La Fig. 7 muestra ejemplos de anticuerpos biespecíficos purificados basados en fragmentos scFv anti-CD47. La Fig. 8 muestra ejemplos de anticuerpos biespecíficos purificados basados en fragmentos VHH anti-CD47. La variante de anticuerpo que contiene la secuencia VHH47Opt3 indicada en la Tabla 3 generó un rendimiento de anticuerpos extremadamente bajo y se excluyó de pruebas adicionales.

Tabla 3. Secuencias de aminoácidos de variantes de tipo salvaje/mutantes de VHH anti-CD47 a partir del clon BCD106-02-VHH_C7_49 y dominios variables de

anti-PD-L1 BCD135. El color gris indica posiciones VHH anti-CD47 con mutaciones distintas de las del tipo salvaje.

Nombre	Secuencias de aminoácido de dominios variables anti-CD47-VHH
VHH47 Salvaje	AVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAASRSIFSINAMNWYRQPPGNRREW VAQITDEGITNYVDSVKGRFTITRDNAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYY CNAFVITTTSEIYWGGQTTVTVSS
VHH47Opt1	AVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAASRSIFSINAMNWYRQAPGKGTEW VAQITDEGITNYVDSVKGRFTITRDNAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYY CNAFVITTTSEIYWGGQTTVTVSS
VHH47Opt2	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRSIFSINAMNWYRQAPGKGTEW VAQITDEGITNYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CNAFVITTTSEIYWGGQTTVTVSS
VHH47Opt3	QVQLVESDGGGLVQPGGSLRLSCAASRFTFSINAMNWVRQAPGKGLE WVSQITDEGITNYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAAFVITTTSEIYWGGQTLVTVSS
	Secuencias de aminoácido de dominios variables anti-PD-L1
VH(BCD135)	EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQAPGKGLE WVSDISWGSNTNYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAL YHCARAPLLAMTFGVGSWGQGTTLVTVSS
VL(BCD135)	QTVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGTVTAINYPGWYQQTPGQAPRT LIYNTNTRHSGVPDRFSGSISGNKAALTITGAQAEDEADYYCALYMG NGGHMFGGGTKLTVL

5 Ejemplo 13. Análisis de la interacción de anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/anti-CD47 PD-L1 con antígenos humanos PD-L1/CD47 en OctetRED96.

El análisis de la interacción de los anticuerpos biespecíficos PD-L1 con antígenos humanos PD-L1/CD47 se realizó en OctetRed 96 (Pall-ForteBio). Los biosensores AR2G se rehidrataron previamente durante una hora en mQ. Después de activar los biosensores, PD-L1-Fc o CD47-Fc a una concentración de 25 µg/ml en tampón de acetato pH4 fueron inmovilizados inespecíficamente (por grupos

NH2) sobre el biosensor. Luego, se sumergieron los sensores en pocillos que contenían soluciones de anticuerpos anti-PD-L1/anti-CD47 (10 µg/ml), donde se asoció el complejo antígeno-anticuerpo. Los sensores se sumergieron luego en una solución tampón para una etapa de disociación posterior. Se analizaron las curvas de unión, después de restar una señal de referencia, utilizando el software de análisis de datos Octet (versión 8.2) de acuerdo con el procedimiento estándar y utilizando el modelo de interacción 1:1.

Los resultados de los análisis se muestran en la Tabla 4. Por lo tanto, se puede concluir que los anticuerpos tienen una alta afinidad, donde la afinidad por el antígeno PD-L1 en los anticuerpos de este formato tiene valores nM, mientras que la afinidad por el antígeno CD47 tiene valores subnM. Dicha unión se considera suficiente para que el anticuerpo pueda interactuar con los receptores en las células diana, para probar posteriormente la actividad terapéutica in vitro e in vivo.

Tabla 4. Constantes de disociación cinética de anticuerpos biespecíficos anti-CD47/anti-PD-L1.

Nombre del Candidato	Respuesta (CD47 FcL)	kD (M) (CD47 FcL)	kon(1/Ms) (CD47 FcL)	kdis(1/s) (CD47 FcL)	Respuesta (PD-L1-Fc humano)	kD (M) (PD-L1-Fc humano)	kon(1/Ms) (PD-L1-Fc humano)	kdis(1/s) (PD-L1-Fc humano)
BCD106-02-001	0.7313	1,45E-08	9,88E+04	1,43E-03	3.1828	1,35E-09	3,24E+05	4,38E-04
BCD106-02-002	0.412	4,59E-08	1,4100E+05	6,44E-03	3.0283	1,24E-09	3,65E+05	4,52E-04
BCD106-02-003	0.4481	2,90E-08	1,65E+05	4,77E-03	3.1756	1,21E-09	3,71E+05	4,50E-04
BCD106-02-004	0.4398	3,09E-08	1,60E+05	4,93E-03	3.0586	1,30E-09	3,55E+05	4,61E-04

BCD106-02-005	0.413	1,77E-08	1,53E+05	2,70E-03	3.0494	1,31E-09	3,35E+05	4,40E-04
BCD106-02-006	1.2762	5,81E-10	2,73E+05	1,58E-04	2.9262	1,04E-09	3,98E+05	4,14E-04
BCD106-02-013	0.7682	5,88E-10	1,13E+06	6,62E-04	2.6744	.75E-09	2.38E+05	4.16E-04
PD-L1-VHH-VHH47Opt1	0.0882	4.65E-09	6.66E+04	3.10E-04	0.1621	6.90E-10	1.17E+06	8.09E-04
PD-L1-VHH-VHH47Opt2	0.2332	3.65E-09	8.02E+04	2.93E-04	0.175	7.64E-10	1.09E+06	8.36E-04

Ejemplo 14. Análisis de las interacciones de los anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/anti-CD47 con los receptores CD47 y PD-L1 de mono cynomolgus en Forte Bio Octet RED 384.

5 El estudio experimental de la afinidad del anticuerpo a los antígenos animales CD47/PD-L1 se realizó en Forte Bio Octet RED 384. Se inmovilizaron anticuerpos a una concentración de 20 µg/ml en sensores AR2G (Forte Bio) de acuerdo con el protocolo estándar y las instrucciones del fabricante. El análisis se realizó a 30°C

10 de trabajo. Después del registro de referencia, los sensores se sumergieron en pocillos que contenían solución de antígeno (animal CD47 y PD-L1) durante 300 segundos, donde se asoció el complejo. La disociación del complejo en solución tampón fue luego detectada durante 600 segundos.

Después de restar una señal de referencia, Las curvas de unión fueron

15 analizadas utilizando el software Octet Data Analysis (versión 9.0) de acuerdo con el procedimiento estándar y utilizando el modelo de interacción global 1:1. Los

anticuerpos anti-CD47 se unen específicamente al antígeno de mono cynomolgus CD47 y PD-L1. Ver Tabla 5 y Tabla 6.

5 **Tabla 5. Valores cinéticos de interacción de anticuerpos respecto del antígeno de mono cynomolgus (CD—47)**

Nombre	KD (M)	KD Error	kon(1/Ms)	kon Error	kdis(1/s)	kdis Error
BCD106-02-001	6.32E-09	3.69E-11	1.88E+05	9.64E+02	1.18E-03	3.28E-06
BCD106-02-006	6.99E-10	3.99E-12	8.64E+05	3.61E+03	6.04E-04	2.34E-06
BCD106-02-013	3.06E-10	3.56E-11	5.31E+04	1.60E+02	1.63E-05	1.89E-06

10 **Tabla 6. Valores cinéticos de interacción de los anticuerpos respecto del antígeno del mono cynomolgus (PD-L1).**

Nombre	KD (M)	KD Error	kon(1/Ms)	kon Error	kdis(1/s)	kdis Error
BCD106-02-001	8.75E-10	6.01E-12	1.67E+06	1.07E+04	1.46E-03	3.55E-06
BCD106-02-006	7.27E-10	6.40E-12	1.73E+06	1.34E+04	1.26E-03	5.25E-06
BCD106-02-013	1.34E-09	1.02E-11	1.65E+06	1.19E+04	2.21E-03	5.66E-06

Ejemplo 15. Análisis de la unión no específica de anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/anti-CD47 a un panel de antígenos en Forte Bio Octet RED 384.

15 El estudio experimental de la unión inespecífica se realizó en un panel de antígenos no específicos marcados con “his-tag”. Para las mediciones se utilizaron biosensores Anti-hIgG Fc Capture (AHC) prehidratados durante 10 minutos en PBS con contenido de Tween-20 al 0,1% y BSA al 0,1% como tampón de trabajo.

Se inmovilizaron anticuerpos a una concentración de 30 µg/ml en sensores de captura de Fc anti-hIgG (AHC) (Forte Bio). El análisis se realizó a 30°C utilizando PBS que comprendía 0,1% de Tween 20 y 0,1% de BSA como tampón de trabajo. Después del registro de referencia, los sensores se sumergieron en pocillos que
5 contenían una solución de antígeno no específico durante 300 segundos, donde se asoció el complejo. La disociación compleja en solución tampón se detectó luego durante 600 segundos.

Las curvas de unión (después de restar una señal de referencia) se analizaron utilizando OctetDataAnalysis (versión 9.0) de acuerdo con el procedimiento
10 estándar usando un modelo de interacción global 1:1. Los anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/anti-CD47 no se unen no específicamente al panel de antígenos.

Ejemplo 16. Análisis de la interacción de anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/anti-CD47 con un panel FcγRIIIa en Forte Bio Octet RED 384.

El estudio experimental de la afinidad del anticuerpo al panel de proteínas de
15 unión a Fc se realizó en Forte Bio Octet RED 384 utilizando biosensores de estreptavidina (SAX) prehidratados durante 30 minutos en PBS que contenía Tween-20 al 0,1% y BSA al 0,1%.

Las proteínas FcγRIIIa-F158 y FcγRIIIa-V158 marcadas con Avi-tag biotiniladas a una concentración de 5 µg/ml en tampón cinético FSB con contenido
20 de 0.1% de Tween-20 y 0.1% de BSA pH 7.4 se inmovilizaron sobre sensores de estreptavidina (SAX), con fijación de *tRecLoad* durante el tiempo necesario para alcanzar un nivel de señal de 0,4 nm. Después del registro de referencia, los sensores se sumergieron en pocillos que contenían solución de anticuerpos durante 60 segundos, donde se asoció el complejo. La disociación del complejo en solución
25 tampón fue luego detectada durante 150 segundos.

Las curvas de unión (después de restar una señal de referencia) se analizaron utilizando OctetDataAnalysis (versión 9.0) de acuerdo con el procedimiento estándar, usando un modelo de interacción global 2:1. Los anticuerpos biespecíficos

anti-PD-L1/anti-CD47 se unen específicamente a las proteínas de unión a Fc FcγRIIIa-F158 y FcγRIIIa-V158. Ver Tabla 7 y Tabla 8.

Tabla 7. Valores cinéticos de la interacción de los anticuerpos BCD-106 (02-001, 03-006, 02-013) respecto de FcγRIIIa-F158.

Nombre	KD (M)	KD Error	kdis(1/s)	kdis Error	kon(1/Ms)	kon Error
BCD106-02-001	1.61E-06	9.86E-07	6.27E-08	1.04E-07	1.73E+05	1.19E+04
BCD106-02-006	1.47E-06	1.73E-07	6.03E-08	8.40E-08	1.35E+05	1.67E+04
BCD106-02-013	1.30E-06	2.00E-06	3.79E-08	1.88E-07	2.22E+05	1.55E+04

5

Tabla 8: Valores cinéticos de la interacción de los anticuerpos BCD-106 (02-001, 03-006, 02-013) respecto de FcγRIIIa-V158.

Nombre	KD (M)	KD Error	kdis(1/s)	kdis Error	kon(1/Ms)	kon Error
BCD106-02-001	9.32E-07	1.62E-07	2.86E-08	1.86E-08	2.33E+05	5.72E+04
BCD106-02-006	4.63E-06	<1.0E-12	1.07E-06	5.25E-07	4.75E+04	8.58E+03
BCD106-02-013	3.73E-07	1.45E-07	1.83E-09	1.07E-08	6.10E+05	5.77E+04

Ejemplo 17. Análisis de la interacción de anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/anti-CD47 con un FcRn en Forte Bio Octet RED 384.

10

El estudio experimental de la afinidad del anticuerpo al panel de proteínas de unión a Fc se realizó en Forte Bio Octet RED 384 utilizando biosensores de estreptavidina (SAX) prehidratados durante 30 minutos en PBS que contenía Tween-20 al 0,1% y BSA al 0,1%.

15

Se inmovilizó FcRn con marcado con Avi-tag biotinilado a una concentración de 5 µg/ml en tampón cinético PBS que contenía 0,1% de Tween-20 pH 6 en sensores de estreptavidina (SAX), con fijación de *tRecLoad* durante el tiempo necesario para alcanzar un nivel de señal de 0,4 nm. Después del registro de referencia en solución tampón, los sensores se sumergieron en pocillos que

20 contenían solución de anticuerpo en tampón cinético PBS que contenía 0,1% de Tween-20 pH 6 durante 60 segundos, donde se asoció el complejo. La disociación

del complejo en tampón cinético PBS que contenía 0,1% de Tween-20 y 0,1% de BSA pH 7,4 fue luego detectada durante 150 segundos.

Las curvas de unión (después de restar una señal de referencia) se analizaron utilizando OctetDataAnalysis (versión 9.0) de acuerdo con el procedimiento estándar usando un modelo de interacción global 2:1. Los anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/anti-CD47 se unen específicamente a FcRn. Ver Tabla 9.

Tabla 9. Valores cinéticos de la interacción de los anticuerpos BCD-106 (02-001, 03-006, 02-013) respecto de FcRn.

Nombre	KD (M)	KD Error	kdis(1/s)	kdis Error	kon(1/Ms)	kon Error
BCD106-02-001	1.61E-06	9.86E-07	6.27E-08	1.04E-07	1.73E+05	1.19E+04
BCD106-02-006	1.47E-06	1.73E-07	6.03E-08	8.40E-08	1.35E+05	1.67E+04
BCD106-02-013	1.30E-06	2.00E-06	3.79E-08	1.88E-07	2.22E+05	1.55E+04

Ejemplo 18. Análisis de la capacidad de los anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/anti-CD47 PD-L1 para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos en células positivas para PD-L1/CD47.

Con el fin de realizar la ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos), se usó la línea celular MDA-MB-231 que expresa receptores PD-L1/CD47 en su superficie, como así también células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Preparación de células mononucleares de sangre periférica.

Las PBMC (células mononucleares de sangre periférica) se prepararon al fraccionar las células de la sangre venosa de donantes sanos en un gradiente de densidad. Después del aislamiento, las células se cultivaron en medio RPMI-1640 que contenía FBS al 10% a una concentración de $2-5 \times 10^6$ células/ml durante 18-24 horas a 37°C y 5% de CO₂.

Preparación de células diana.

Las células MDA-MB-231 fueron cultivadas en medio DMEM que contenía FBS al 10% (suero bovino fetal) a 37°C y CO₂ al 5%. Las células se retiraron de la superficie de plástico utilizando tripsina y se resuspendieron en DMEM que contenía FBS al 10%. Se añadió calceína AM a una concentración de 5 µM. Después de 30 minutos, las células se lavaron dos veces del exceso de calceína AM con DMEM que contenía FBS al 10%. Se preparó una suspensión de células diana a una concentración de 10⁵ células/ml en DMEM que contenía FBS al 10%.

Preparación de diluciones de anticuerpos de prueba.

Todos los anticuerpos del ensayo se diluyeron con medio DMEM que contenía FBS al 10% hasta una concentración de 10 µg/ml. Se preparó una serie de diluciones seriadas con un incremento de hasta 5. Las concentraciones de los anticuerpos del ensayo fueron (ng/ml): 10000; 2000; 400; 80; 16; 3.2; 0,64; 0,128; 0,0256; 0.

Preparación de PBMC

Se recogieron linfocitos mononucleares de viales y se centrifugaron a 200 xg durante 5 minutos. Se preparó una suspensión de células a una concentración de 5 x 10⁶ células/ml en medio DMEM que contenía FBS al 10%.

Realización de ensayo ADCC

Se agregaron 50 µl/pocillo de los anticuerpos de prueba a los pocillos de una placa de 96 pocillos. Se añadieron 100 µl/pocillo de la suspensión de células diana a los pocillos que contenían los anticuerpos. La placa se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 15 a 20 minutos. Se añadieron 50 µl/pocillo de suspensión de PBMC a los pocillos que contenían los anticuerpos y las células diana. Se agregaron 50 µl/pocillo de medio DMEM que contenía FBS al 10%, 100 µl de suspensión de células diana y 50 µl de suspensión de PBMC a tres pocillos (un control de lisis máxima, "KL"). La placa se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 3,5 - 4 horas. 30 minutos antes del final de la incubación, se añadió tampón de lisis a los pocillos KL.

Después de la incubación, las placas se centrifugaron a 200xg durante 10 minutos. El fluido sobrenadante se transfirió a nuevas placas de 96 pocillos. La fluorescencia se midió en unidades de fluorescencia relativa a una longitud de onda de excitación/emisión de 485/538 nm utilizando un fluorímetro de placa.

5 La eficacia de ADCC se calculó mediante la fórmula:

$$ADCC(\%) = \frac{\text{El valor de la luminiscencia en el espacio (RLU)} - \text{El valor promedio K (RLU)}}{\text{Valor promedio KL (RLU)} - \text{El valor promedio de K (RLU)}} \cdot 100 ,$$

En donde:

K: control de lisis espontánea de células diana en presencia de células efectoras (50 µl / pocillo de medio DMEM que contiene un 10% de FBS + 100 µl /
10 pocillo de células diana + 50 µl / pocillo de PBMC)

KL: control lisis máxima de las células diana (50 µl / pocillo de medio DMEM que contiene 10% de FBS + 100 µl / pocillo de células diana + 50 µl / pocillo de PBMC + tampón de lisis).

Los resultados se muestran en las Fig. 9 y 10.

15 De acuerdo con los datos obtenidos, todos los anticuerpos anti-CD47/PD-L1 muestran valores de EC50 que son similares o superiores a los de un anticuerpo anti-CD47 monoespecífico de control (clon B6H12).

**Ejemplo 19. Comparación de la actividad de anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/anti-CD47 respecto de CD47/PD-L1 en un ensayo de estimulación
20 de fagocitosis mediante células de macrófagos humanos**

Con el fin de realizar una ADCP (fagocitosis celular dependiente de anticuerpos), se utilizaron la línea celular MDA-MB-231 que tiene receptores PD-L1/CD47 en su superficie, y células de macrófagos humanos.

Preparación de macrófagos humanos.

Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de la sangre venosa de donantes sanos fueron aisladas mediante separación por gradiente de densidad. Se aislaron monocitos de sangre humana utilizando un kit para aislar una fracción de células humanas positivas CD14 humanas (Miltenyi Biotec). Los pocillos de una
5 placa de 24 pocillos se utilizaron para cultivar 350.000 monocitos / pocillo en 700 µl de RPMI-1640 que contenían FBS al 10%, 100 ng / ml de GM-CSF (PeproTech) a 37°C y 5% de CO₂ durante 3 días. El cuarto día de cultivo se reemplazó el medio con un nuevo medio que contenía 700 µl de RPMI-1640 con contenido de FBS al 10%, 100 ng / ml de GM-CSF (PeproTech), 50 ng / ml de IFN γ (PeproTech) y 10 ng.
10 / ml de LPS (Sigma) por pocillo, y las células se cultivaron a 37° C y 5% de CO₂ durante otros 3 días.

Preparación de células diana.

Las células MDA-MB-231 se cultivaron en un medio DMEM que contenía FBS al 10% (suero bovino fetal) a 37° C y CO₂ al 5%. Las células se retiraron de la
15 superficie plástica con tripsina y se resuspendieron en DMEM con contenido de FBS al 10%. Se añadió calceína AM a una concentración de 5 µM. Después de 30 minutos, las células se lavaron dos veces del exceso de Calcein AM con DMEM que contenía FBS al 10%. Se preparó una suspensión de células diana a una concentración de 105 células / ml en DMEM con FBS al 10%.

Realización del ensayo ADCP

Se seleccionó el medio a partir de pocillos de placa que contenían macrófagos, se añadieron a los pocillos 500 µl de medio RPMI-1640 con contenido de FBS al 10% y 20 µg / ml de los anticuerpos de prueba. Se añadió a los pocillos 500 µl / pocillo de suspensión de las células diana. La placa se incubó a 37°C y 5% de CO₂
25 durante 3 horas. Luego se seleccionó el medio, las células se retiraron de la superficie plástica con el reactivo TrypLE Express y se tiñeron con anticuerpos anti-CD14 marcados con fluorescencia. La suspensión de células teñidas se analizó en un citofluorómetro de flujo.

La eficacia de ADCP se calculó mediante la fórmula:

$$\text{ADCP eficacia \%} = \frac{\text{Calceína}^+ \text{CD14}^+}{\text{CD14}^+} \times 100\% , \text{ en donde}$$

Calceína⁺CD14⁺ es el número de células positivas CD14 que contienen la tinción de calceína.

CD14⁺ es el número de todas las células CD14 positivas.

- 5 De acuerdo con los datos obtenidos, una serie de anticuerpos anti-CD47 / PD-L1 demuestran eficacia en la estimulación de la fagocitosis de líneas celulares MDA-MB-231 mediante macrófagos humanos, lo que es comparable a la de un anticuerpo anti-CD47 monoespecífico de control (clon B6H12).

10 **Ejemplo 20. Comparación de la influencia de los candidatos anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/anti-CD47 en la hemaglutinación de eritrocitos humanos**

Se utilizaron eritrocitos humanos para analizar la capacidad de los anticuerpos para producir la hemaglutinación.

15

Preparación de la suspensión de eritrocitos.

Se tomó una muestra de sangre de una vena de un donante sano en un tubo de heparina al vacío. Se transfirieron 9 ml de sangre a un tubo de centrífuga de 50 ml.

- 20 La sangre se diluyó a 30 ml con DPBS sin Ca²⁺ y Mg²⁺ a temperatura ambiente. Se centrifugó la suspensión a 800 g durante 10 minutos y se decantó el sobrenadante. El procedimiento de lavado de las células fue repetido dos veces con DPBS sin Ca²⁺ y Mg²⁺ y centrifugación. Luego se resuspendieron 300 µl de sedimento celular en 30 ml de DPBS, obteniendo como resultado una suspensión de eritrocitos al 1%.

- 25 *Realización de ensayo de hemaglutinación.*

Los anticuerpos del ensayo fueron diluidos en DPBS a una concentración de 20 µg / ml. Se mezclaron 100 µl de diluciones de anticuerpos y suspensiones de eritrocitos en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. La placa se incubó en una

incubadora de CO₂ durante 16 horas a 37 ° C. Los resultados fueron documentados visualmente utilizando una escala de 4 cruces arbitraria. El resultado significativamente positivo es de 2 cruces y más. Los resultados se muestran en la tabla 10.

5

Tabla 10. Reacción de la hemaglutinación en presencia de anticuerpos anti-CD47/PD-L1. "-" indica ausencia de aglutinación.

Anticuerpo	Concentración de anticuerpos, ng/ml											
	10000	5000	2500	1250	625	313	156	78	39	19.5	9.77	0
anti-CD47/PD-L1 BCD106-02-001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
anti-CD47/PD-L1 BCD106-02-002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
anti-CD47/PD-L1 BCD106-02-003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
anti-CD47/PD-L1 BCD106-02-004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
anti-CD47/PD-L1 BCD106-02-005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
anti-CD47/PD-L1 BCD106-02-006	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
anti-CD47/PD-L1 BCD106-1106	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
anti-CD47/PD-L1 BCD106-1133	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
anti-CD47 ctrl	3+	3+	3+	3+	2+	1+	-	-	-	-	-	-
anti-PD-L1 ctrl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- 10 De acuerdo con los datos obtenidos, ninguno de los anticuerpos anti-CD47/PD-L1 produce hemaglutinación, mientras que el anticuerpo monoclonal anti-CD47 de referencia (clon B6H12) produce una importante aglutinación debido a la naturaleza bivalente del anticuerpo, y, por consiguiente, la capacidad de interactuar con dos moléculas CD47 ubicadas en diferentes eritrocitos.

- 15 **Ejemplo 21. Análisis de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) de anticuerpos anti-CD47/PD-L1 biespecíficos.**

Para la realización del análisis de CDC (citotoxicidad dependiente del complemento), la línea celular MDA-MB-231 que contiene receptores PD-L1 y CD47 en su superficie se usó como células diana.

Preparación de células diana.

- 5 El cultivo de MDA-MB-231 se cultivó en medio de cultivo DMEM complementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS).

Las células se retiraron de la superficie plástica con tripsina y se suspendieron en medio DMEM que contenía BSA al 0,1% a una concentración de 1×10^6 células / ml.

- 10 *Preparación de diluciones de anticuerpos de prueba.*

Todos los anticuerpos anti-CD47 / PD-L1 de prueba se diluyeron con medio DMEM que contenía BSA al 0,1% hasta una concentración de 100 µg / ml. Se preparó una serie de diluciones seriadas con un incremento de 8. Las concentraciones de los anticuerpos de prueba fueron (ng / ml): 100000; 12500; 1562,5; 195,3; 24,4; 3,05; 0,38; 0,04; 0,005.

Realización del ensayo de CDC

El complemento humano se descongeló y se disolvió en una proporción de 1:4 en un medio DMEM que contenía BSA al 0,1%.

- 20 Se agregaron 50 µl / pocillo de cada dilución de los anticuerpos del ensayo a los pocillos de una placa de 96 pocillos, 50 µl / pocillo de medio suplementado con BSA al 0.1% para cada muestra de anticuerpo –control celular, 150 µl / pocillo de medio DMEM que contenía BSA al 0,1% - medio de control.

Se añadieron 50 µl / pocillo de una suspensión de células MDA-MB-231 a cada pocillo que contenía los anticuerpos del ensayo y un control celular.

- 25 Se vertieron 50 µl / pocillo del complemento diluido en todos los pocillos que contenían los anticuerpos del ensayo y un control celular. La placa se agitó durante

2 a 4 minutos en un agitador orbital a temperatura ambiente y se la colocó en una incubadora de CO₂ durante 2 a 3 horas a 37° C.

Se agregaron 15 µl de reactivo Alamar Blue a los pocillos de la placa de prueba. Las placas se agitaron durante 10 a 20 minutos a temperatura ambiente en un agitador orbital. Las placas se incubaron adicionalmente en una incubadora de CO₂ durante 18-24 horas.

Las placas se agitaron durante 10 a 20 minutos a temperatura ambiente en un agitador orbital.

La fluorescencia se midió utilizando unidades de fluorescencia relativa a una longitud de onda de excitación / emisión de 544/590 nm utilizando un fluorímetro de placa. La señal de fluorescencia obtenida es proporcional al número de células viables. Los resultados pueden observarse en las Fig. 12-15.

De acuerdo con los datos obtenidos, los anticuerpos del ensayo no causan la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) de la línea celular MDA-MB-231.

Ejemplo 22. Análisis de la actividad antagonista de anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/anti-CD47 respecto de un cultivo celular que transporta al receptor de membrana PD-L1.

Con el fin de analizar la actividad antagonista de los anticuerpos anti-PD-L1 / CD47 respecto del el receptor PD-L1, se evaluó la capacidad de dichos anticuerpos para reactivar una señal de luciferasa en la línea celular informadora Jurkat-PD1-NFAT-Luc durante el co-cultivo con células productoras de PD-L1.

Preparación de células productoras de PD-L1

El cultivo de MDA-MB-231 se cultivó en un medio de cultivo DMEM complementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS).

Las células se retiraron de la superficie plástica mediante tripsina y se suspendieron a una concentración de 1×10^5 células/ml células en medio DMEM que contenía FBS al 10% y 20 ng / ml de interferón gamma. Luego se agregaron 200 μ l / pocillo de la suspensión celular a los pocillos de una placa blanca de 96 pocillos y
5 esto se incubó durante 48 horas en una incubadora de CO₂ a 37°C y 5% de CO₂.

Preparación de diluciones de anticuerpos de prueba.

Todos los anticuerpos anti-CD47 / PD-L1 de prueba se diluyeron con un medio RPMI-1640 que contenía FBS al 10% hasta una concentración de 5 μ g / ml. Se preparó una serie de diluciones seriadas con un incremento de 3. Las
10 concentraciones de los anticuerpos de prueba fueron (ng/ml): 2500; 833,3; 277,7; 92,5; 30,8; 10,2; 3,4; 1,1.

- *Preparación de Células Jurkat-PD1-NFAT-Luc*
- El día del experimento, se preparó una suspensión de células Jurkat-PD1-NFAT-Luc a una concentración de 2.5×10^6 células/ml en un medio RPMI-
15 1640 que contenía FBS al 10%.
- *Preparación de una solución de anticuerpos activadores*
- El día del experimento, se preparó una mezcla de 10 veces de anticuerpos activadores (4 μ g / ml de anti-CD3; 4 μ g / ml de anti-CD28; 16 μ g / ml de anti-ratón en medio RPMI-1640 conteniendo 10% de FBS).
- 20 • *Realización de prueba*
- Se eliminó el medio de crecimiento de una placa que contenía células MDA-MB-231. Se añadieron 40 μ l / pocillo de diluciones de anticuerpos a los pocillos que contenían las células. Se añadieron 40 μ l / pocillo de medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10% a los pocillos de control (células sin los
25 anticuerpos de prueba, células sin los anticuerpos de prueba y de activación) y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Luego se agregaron 40 μ l / pocillo de la suspensión de células Jurkat-PD1-NFAT-Luc a todos los pocillos. Luego, se agregaron 10 μ l / pocillo de una

solución de 10 veces de anticuerpos activadores a todos los pocillos, a excepción de los pocillos de control "células sin prueba y anticuerpos activantes". Las células se incubaron durante 6 horas en una incubadora de CO₂ a 37° C y 5% de CO₂.

- Se introdujo el sistema del ensayo Substrate One-Glo Luciferase Assay System "Promega" en todos los pocillos en una proporción de 1:1 (90 µl / pocillo). Después de 5-10 minutos, se midió el nivel de luminiscencia utilizando un lector de placas.
- Según los datos obtenidos, los anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1 / anti-CD47 del ensayo, así como también un anticuerpo monoespecífico anti-PD-L1 de control, son antagonistas de la vía de señalización dependiente de PD-L1 y, por lo tanto, pueden estimular la citotoxicidad dependiente de células T hacia las células portadoras del receptor PD-L1.

Ejemplo 23. Análisis de homogeneidad de productos de anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1 / anti-CD47.

La homogeneidad de los anticuerpos biespecíficos fue analizada mediante HPLC de exclusión por tamaño (SEC HPLC) con un detector de UV. La cromatografía se realizó en un sistema de HPLC (Agilent) en la columna Tosoh TSK-Gel G3000SWXL, 7,8 mm x 30 cm, número orden 08541 con precolumna Tosoh TSKgel Guard SWXL, 6,0 mm x 4,0 cm, con un diámetro de partícula de 7 µm, no. 08543. La detección se realizó a longitudes de onda de 220 y 280 nm. La Fig. 17 muestra un ejemplo de perfil de HPLC del producto BCD106-02-013, basado en VHH47Opt2 (ver Ejemplo 12). De acuerdo con los resultados del ensayo, se puede concluir que la molécula BCD106-02-013 genera un producto que es 93% homogéneo en la composición de agregación de monómero y puede aplicarse en ensayos posteriores tanto *in vitro* como *in vivo*.

Reivindicaciones

1. Un anticuerpo monoclonal, que se une específicamente a CD47 y PD-L1, que comprende un sitio de unión para CD47 y al menos un sitio de unión para PD-L1.
- 5 2. Un anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizado porque es un anticuerpo completo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
3. Un anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende uno o dos sitios de unión para PD-L1.
4. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque
10 dicho sitio de unión para CD47 inhibe la interacción entre el receptor CD47 y el ligando SIRP, y /o dicho sitio de unión para PD-L1 inhibe la interacción de PD-L1 con el receptor PD-1.
5. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque
15 dicho sitio de unión para CD47 comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2, CDR3, **en donde CDR1** es una secuencia que es al menos un 80% homóloga a la secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 1 - 4, **en donde CDR2** es una secuencia que es al menos 80% homóloga a la secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 6 - 15, **en donde**
20 **CDR3** es una secuencia que es al menos 80% homóloga a la secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 17 - 20.
6. Un anticuerpo de acuerdo con la Reivindicación 1, caracterizado porque
25 dicho sitio de unión para CD47 comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende secuencias de CDR1, CDR2, CDR3, **en donde CDR1** es una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC ID NO: 1 - 4, **en donde CDR2** es una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 6 - 15, **en donde CDR3** es una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 17 - 20.

7. Un anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho sitio de unión para CD47 comprende un dominio variable de cadena pesada según la reivindicación 4, y un dominio variable de cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2, CDR3, **en donde CDR1** es una secuencia que es al menos 80% homóloga a la secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 22 - 34, **en donde CDR2** es una secuencia que es al menos 80% homóloga a la secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 36 a 48, **en donde CDR3** es una secuencia que es al menos 80% homóloga a la secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NO: 50 - 64.
8. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho sitio de unión para CD47 comprende un dominio variable de cadena pesada de acuerdo con la reivindicación 4, y un dominio variable de cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2, CDR3, **en donde CDR1** es una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC ID NO: 22 - 34, **CDR2** es una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC ID NO: 36 - 48, **CDR3** es una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NO: 50 64.
9. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho sitio de unión para CD47 comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende secuencias que son al menos un 90% homólogas a las secuencias seleccionadas del grupo que comprende las SEC. ID NO: 66 - 88, y un dominio variable de cadena ligera que comprende secuencias que son al menos un 90% homólogas a las secuencias seleccionadas del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 89 - 106.
10. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho sitio de unión para CD47 comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende secuencias seleccionadas del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 66 - 88, y un dominio variable de cadena ligera que

comprende secuencias seleccionadas del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 89 – 106.

11. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho sitio de unión para PD-L1 comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende secuencias que son al menos un 80% homólogas a las siguientes secuencias: SEC. ID NO: 5, SEC. ID NO: 16 y SEC. ID NO: 21, y un dominio variable de cadena ligera que comprende secuencias que son al menos 80% homólogo a las siguientes secuencias: SEC. ID NO: 35, SEC. ID NO: 49 y SEC. ID NO: 65.
12. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho sitio de unión para PD-L1 comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende las siguientes secuencias: SEC. ID NO: 5, SEC. ID NO: 16 y SEC. ID NO: 21, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las siguientes secuencias: SEC. ID NO: 35, SEC. ID NO: 49 y SEC. ID NO: 65.
13. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho sitio de unión para CD47 es Fab, scFv, scFab, o mono dominios VH or VHH aislados.
14. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho sitio de unión para PD-L1 es Fab, scFv, scFab, o mono dominios VH or VHH aislados.
15. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque estimula la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, la fagocitosis mediada por macrófagos y/o la citotoxicidad mediada por células T hacia células cubiertas con CD47 y/o antígenos PD-L1.
16. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque comprende una porción Fc que comprende al menos una mutación o modificación que aumenta la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (*antibody-dependent cellular cytotoxicity* /ADCC) y/o la citotoxicidad

dependiente de complemento (*complement-dependent cytotoxicity* /CDC), en comparación con el mismo anticuerpo sin mutación o modificación.

17. Un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, destinado a ser utilizado como un medicamento para el tratamiento del cáncer.
- 5 18. Un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, destinado a ser utilizado según la reivindicación 17, donde el cáncer se selecciona del (HNSCC) carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer cervical , cáncer de origen primario desconocido, glioblastoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga, TNBC (cáncer de mama triple negativo), CRC (cáncer colorrectal), carcinoma hepatocelular, melanoma, NSCLC 5 (cáncer de pulmón no de células pequeñas), cáncer de riñón, cáncer de ovario, MSI CCR (cáncer colorrectal con inestabilidad de microsatélite), leucemia (leucemia aguda o leucemia mieloblástica), linfoma, mieloma múltiple, cáncer de mama, cáncer de próstata, sarcoma, carcinoma hepatocelular, 15 linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemia 10 linfoblástica aguda de células T y células B cáncer de pulmón de células, leucemia mieloblástica aguda, linfoma de células B no Hodgkin refractario, linfoma folicular, linfoma de células B de zona marginal, linfoma difuso de células B grandes, cáncer de páncreas y síndrome mielodisplásico de mayor riesgo.
- 20 19. Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16.
20. Un ácido nucleico según la reivindicación 18, en el que el ácido nucleico es AND.
21. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18-19. 25
22. Un método para producir una célula huésped para preparar un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, que comprende la transformación de una célula con un vector de acuerdo con la reivindicación 20.

23. Una célula huésped para preparar un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-16; dicha célula huésped comprende un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 18-19.
24. Un método para preparar un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende cultivar una célula huésped según la reivindicación 22 en un medio de crecimiento en condiciones suficientes para producir dicho anticuerpo, si es necesario, seguido de aislamiento y purificación del anticuerpo obtenido.
25. Una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno mediado por PD-L1 y CD47, comprendiendo dicha composición farmacéutica un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
26. Una composición farmacéutica según la reivindicación 24, destinada a usarse para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno mediado por PD-L1 y CD47, seleccionándose dicha enfermedad o trastorno del grupo que comprende: (HNSCC) carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer cervical , cáncer de origen primario desconocido, glioblastoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga, TNBC (cáncer de mama triple negativo), CRC (cáncer colorrectal), carcinoma hepatocelular, melanoma, NSCLC (cáncer de pulmón no de células pequeñas), cáncer de riñón, cáncer de ovario, MSI CCR (cáncer colorrectal con inestabilidad de microsatélite), leucemia (leucemia aguda o leucemia mieloblástica), linfoma, mieloma múltiple, cáncer de mama, cáncer de próstata, sarcoma, carcinoma hepatocelular, linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemia linfoblástica aguda de células T y células B cáncer de pulmón de células, leucemia mieloblástica aguda, linfoma de células B no Hodgkin refractario, linfoma folicular, linfoma de células B de zona marginal, linfoma difuso de células B grandes, cáncer de páncreas y síndrome mielodisplásico de mayor riesgo.

Resumen

La presente invención se refiere a la biotecnología, en particular a anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y al uso de los mismos. Más particularmente, la presente invención se refiere a anticuerpos que se unen
5 específicamente a CD47 y PD-L1. La invención también se refiere a un ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, un vector de expresión, un método para preparar dicho anticuerpo y el uso de dichos anticuerpos y composiciones en terapias contra el cáncer.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SOCIEDAD ANÓNIMA "BIOCAD"

<120> ANTICUERPOS ESPECÍFICOS DE CD47 Y PD-L1

5 <140> EA201791961

<141> 2017-10-03

<160> 108

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

10 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 1

Arg Tyr Trp Met Tyr

15 1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<400> 2

Ile Asn Ala Met Asn

1 5

25

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30

<400> 3

Lys Tyr Trp Met Tyr

1 5

<210> 4

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 4

Ser Ile Phe Ser Ile Asn Ala Met Asn

10 1 5

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<400> 5

Asp Tyr Ala Met Ser

1 5

20

<210> 6

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<400> 6

Ile Glu Asp Ser Ser Ile Asn Thr Gly Gly Gly Thr Glu Thr Thr Tyr

1 5 10 15

Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly

30 20

<210> 7

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <400> 7

Ser Ile Glu Asp Ser Ser Ile Asn Thr Gly Gly Gly Thr Glu Thr Thr

1 5 10 15

Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly

20

10

<210> 8

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<400> 8

Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ile Asn Thr Gly Gly Gly Thr Ser Glu Lys

1 5 10 15

Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly

20

20

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<400> 9

Ser Ile Glu Asp Ser Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

30

Gly

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5

<400> 10

Gln Ile Thr Asp Glu Gly Ile Thr Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

10

<210> 11

<211> 18

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<400> 11

Ser Ile Glu Asp Ser Ser Thr Glu Thr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val

1 5 10 15

20 Lys Gly

<210> 12

<211> 19

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 12

Ser Ile Glu Asp Ser Ser Ile Thr Glu Thr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser

30 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 13

<211> 18

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<400> 13

Ser Ile Asn Asp Gly Gly Gly Asp Asp Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser

1 5 10 15

10 Val Lys

<210> 14

<211> 16

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 14

Gly Ile Arg Thr Ser Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

20 1 5 10 15

<210> 15

25 <211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 15

30 Gln Ile Thr Asp Glu Gly Ile Thr Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 16

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 16

Asp Ile Ser Trp Ser Gly Ser Asn Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys

10 1 5 10 15

Gly

<210> 17

15 <211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 17

20 Gly Asp Tyr Tyr Cys Thr Thr Tyr Glu Cys Gln His Tyr Tyr Gly Met

1 5 10 15

Asp Tyr

25 <210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <400> 18

Val Ile Thr Thr Thr Ser Glu Ile Tyr

1 5

<210> 19

<211> 18

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<400> 19

Gly Asp Tyr Tyr Cys Thr His Tyr Glu Cys Gln His Tyr Tyr Gly Met

1 5 10 15

10 Asp Tyr

<210> 20

<211> 12

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 20

Asn Ala Phe Val Ile Thr Thr Thr Ser Glu Ile Tyr

20 1 5 10

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<400> 21

Ala Pro Leu Leu Leu Ala Met Thr Phe Gly Val Gly Ser

1 5 10

30

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 22

5 Arg Ala Ser Gln Ala Ile Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 23

<211> 11

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 23

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

15 1 5 10

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<400> 24

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

25

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30

<400> 25

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 26

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 26

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Arg Asn Leu Asn

10 1 5 10

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<400> 27

Arg Ala Ser Gln His Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

20

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<400> 28

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser His Tyr Leu Asn

1 5 10

30 <210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 29

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

5 1 5 10

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<400> 30

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Tyr Leu Ala

1 5 10

15

<210> 31

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20

<400> 31

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser

1 5 10

25 <210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <400> 32

Gln Gly Asp Arg Ile Glu Asn Tyr Tyr Thr Ser

1 5 10

<210> 33

<211> 13

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<400> 33

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asp Asn Tyr Val Asn

1 5 10

10

<210> 34

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<400> 34

Thr Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Arg Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

20

<210> 35

<211> 14

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<400> 35

Gly Leu Ser Ser Gly Thr Val Thr Ala Ile Asn Tyr Pro Gly

1 5 10

30

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 36

5 Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser

1 5

<210> 37

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 37

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

15 1 5

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<400> 38

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Arg

1 5

25

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30

<400> 39

Thr Ala Ser Thr Leu Gln Ser

1 5

<210> 40

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 40

Ala Ala Thr Arg Leu Gln Ser

10 1 5

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<400> 41

Asp Thr Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

20

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<400> 42

Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

30 <210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 43

Ala Ser Ser Thr Leu Gln Ser

5 1 5

<210> 44

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<400> 44

Asp Asn Tyr Arg Arg Pro Ser

1 5

15

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20

<400> 45

Gly Asn Ala Asn Arg Pro Ser

1 5

25 <210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <400> 46

Ser Asn Ser Asn Arg Ala Ser

1 5

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<400> 47

Lys Val Ser Asp Arg Asp Ser

1 5

10

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<400> 48

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

20 <210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <400> 49

Asn Thr Asn Thr Arg His Ser

1 5

<210> 50

30 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 50

Gln Gln Ala Ala Ser Val Pro Leu Thr

1 5

5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<400> 51

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Phe Thr

1 5

15

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20

<400> 52

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp Thr

1 5

<210> 53

25

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 53

30

Gln Gln Ser His Ser Leu Pro Leu Thr

1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5

<400> 54

Gln Gln Ser Tyr Arg Thr Pro Phe Thr

1 5

10 <210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <400> 55

Gln Gln Ala Thr Ser Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 56

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 56

25 Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Leu Phe Thr

1 5

<210> 57

<211> 9

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 57

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Thr

1 5

5 <210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <400> 58

Gln Gln Ser Asp Thr Ser Pro Arg Val

1 5

<210> 59

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 59

20 Gln Gln Ser Leu Ser Ile Pro Gln Val Thr

1 5 10

<210> 60

<211> 11

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 60

Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Ala Val Val

30 1 5 10

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <400> 61

Gln Ser Gly Ser Ser Thr Glu Asn Ile

1 5

<210> 62

10 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 62

15 Gln Ser Tyr Glu Ile Ser Gly Tyr Pro Val

1 5 10

<210> 63

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 63

Met Gln Gly Thr His Trp Pro Ser Thr

25 1 5

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<400> 64

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Gln Leu Thr

1 5 10

<210> 65

5 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 65

10 Ala Leu Tyr Met Gly Asn Gly Gly His Met

1 5 10

<210> 66

<211> 134

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 66

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

20 1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Arg Tyr

20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

25 Ser Ser Ile Glu Asp Ser Ser Ile Asn Thr Gly Gly Gly Thr Glu Thr

50 55 60

Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

65 70 75 80

Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu

30 85 90 95

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Asp Tyr Tyr Cys Thr Thr

100 105 110

Tyr Glu Cys Gln His Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr

115 120 125

Met Val Thr Val Ser Ser

130

5

<210> 67

<211> 213

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<400> 67

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr

15

20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Glu Asp Ser Ser Ile Asn Thr Gly Gly Gly Thr Glu Thr

50 55 60

20

Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

65 70 75 80

Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu

85 90 95

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Asp Tyr Tyr Cys Thr Thr

25

100 105 110

Tyr Glu Cys Gln His Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

115 120 125

Thr Val Thr Val Ser Ser

130

30

<210> 68

<211> 134

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 68

5 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Arg Tyr
20 25 30
Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
10 35 40 45
Ser Ser Ile Glu Asp Ser Ser Ile Asn Thr Gly Gly Gly Thr Glu Thr
50 55 60
Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
65 70 75 80
15 Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu
85 90 95
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Asp Tyr Tyr Cys Thr Thr
100 105 110
Tyr Glu Cys Gln His Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr
20 115 120 125
Thr Val Thr Val Ser Ser
130

<210> 69

25 <211> 134

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 69

30 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Arg Tyr

20 25 30
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Glu Asp Ser Ser Ile Asn Thr Gly Gly Gly Thr Glu Thr
 5 50 55 60
 Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 65 70 75 80
 Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu
 85 90 95
 10 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Asp Tyr Tyr Cys Thr Thr
 100 105 110
 Tyr Glu Cys Gln His Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr
 115 120 125
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 15 130

<210> 70

<211> 134

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<400> 70

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 25 Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Arg Tyr
 20 25 30
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Glu Asp Ser Ser Ile Asn Thr Gly Gly Gly Thr Glu Thr
 30 50 55 60
 Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 65 70 75 80

Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu

85 90 95

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Asp Tyr Tyr Cys Thr Thr

100 105 110

5 Tyr Glu Cys Gln His Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr

115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser

130

10 <210> 71

<211> 134

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <400> 71

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Arg Tyr

20 25 30

20 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Glu Asp Ser Ser Ile Asn Thr Gly Gly Gly Thr Glu Thr

50 55 60

Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

25 65 70 75 80

Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu

85 90 95

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Asp Tyr Tyr Cys Thr Thr

100 105 110

30 Tyr Glu Cys Gln His Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr

115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser

130

<210> 72

<211> 134

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 72

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

10 1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Arg Tyr

20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

15 Ser Ser Ile Glu Asp Ser Ser Ile Asn Thr Gly Gly Gly Thr Glu Thr

50 55 60

Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

65 70 75 80

Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu

20 85 90 95

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Asp Tyr Tyr Cys Thr Thr

100 105 110

Tyr Glu Cys Gln His Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr

115 120 125

25 Leu Val Thr Val Ser Ser

130

<210> 73

<211> 134

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 73

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Arg Tyr

5 20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Glu Asp Ser Ser Ile Asn Thr Gly Gly Gly Thr Glu Thr

50 55 60

10 Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

65 70 75 80

Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu

85 90 95

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Asp Tyr Tyr Cys Thr Thr

15 100 105 110

Tyr Glu Cys Gln His Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr

115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser

130

20

<210> 74

<211> 134

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<400> 74

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Arg Tyr

30 20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Glu Asp Ser Ser Ile Asn Thr Gly Gly Gly Thr Glu Thr
50 55 60
Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
65 70 75 80
5 Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu
85 90 95
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Asp Tyr Tyr Cys Thr Thr
100 105 110
Tyr Glu Cys Gln His Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr
10 115 120 125
Leu Val Thr Val Ser Ser
130

<210> 75

15 <211> 134

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 75

20 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Arg Tyr
20 25 30
Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
25 35 40 45
Ser Ser Ile Glu Asp Ser Ser Ile Asn Thr Gly Gly Gly Thr Glu Thr
50 55 60
Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
65 70 75 80
30 Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu
85 90 95
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Asp Tyr Tyr Cys Thr Thr

100 105 110
 Tyr Glu Cys Gln His Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr
 115 120 125
 Met Val Thr Val Ser Ser
 5 130

 <210> 76
 <211> 134
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial

 <400> 76
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 15 Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Arg Tyr
 20 25 30
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Glu Asp Ser Ser Ile Asn Thr Gly Gly Gly Thr Glu Thr
 20 50 55 60
 Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 65 70 75 80
 Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu
 85 90 95
 25 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Asp Tyr Tyr Cys Thr Thr
 100 105 110
 Tyr Glu Cys Gln His Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr
 115 120 125
 Met Val Thr Val Ser Ser
 30 130

 <210> 77

<211> 134

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <400> 77

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Arg Tyr

20 25 30

10 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Glu Asp Ser Ser Ile Asn Thr Gly Gly Gly Thr Glu Thr

50 55 60

Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

15 65 70 75 80

Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu

85 90 95

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Asp Tyr Tyr Cys Thr Thr

100 105 110

20 Tyr Glu Cys Gln His Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr

115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser

130

25 <210> 78

<211> 134

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <400> 78

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Arg Tyr
 20 25 30
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 5 Ser Ser Ile Glu Asp Ser Ser Ile Asn Thr Gly Gly Gly Thr Glu Thr
 50 55 60
 Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 65 70 75 80
 Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu
 10 85 90 95
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Asp Tyr Tyr Cys Thr Thr
 100 105 110
 Tyr Glu Cys Gln His Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr
 115 120 125
 15 Met Val Thr Val Ser Ser
 130

 <210> 79
 <211> 134
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <400> 79
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 25 1 5 10 15
 Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Arg Tyr
 20 25 30
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 30 Ser Ser Ile Glu Asp Ser Ser Ile Asn Thr Gly Gly Gly Thr Glu Thr
 50 55 60
 Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

65 70 75 80
 Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu
 85 90 95
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Asp Tyr Tyr Cys Thr Thr
 5 100 105 110
 Tyr Glu Cys Gln His Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr
 115 120 125
 Pro Val Thr Val Ser Ser
 130
 10
 <210> 80
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <400> 80
 Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Arg Tyr
 20 20 25 30
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Glu Asp Ser Ser Ile Asn Thr Gly Gly Gly Thr Glu Thr
 50 55 60
 25 Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 65 70 75 80
 Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu
 85 90 95
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Asp Tyr Tyr Cys Thr Thr
 30 100 105 110
 Tyr Glu Cys Gln His Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr
 115 120 125

Met Val Thr Val Ser Ser

130

<210> 81

5 <211> 134

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 81

10 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

15 35 40 45

Ser Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ile Asn Thr Gly Gly Gly Thr Ser Glu

50 55 60

Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

65 70 75 80

20 Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu

85 90 95

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Asp Tyr Tyr Cys Thr Thr

100 105 110

Tyr Glu Cys Gln His Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

25 115 120 125

Thr Val Thr Val Ser Ser

130

<210> 82

30 <211> 127

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 82

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Glu Asp Ser Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val

10 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

15 Ala Lys Gly Asp Tyr Tyr Cys Thr Thr Tyr Glu Cys Gln His Tyr Tyr

100 105 110

Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

20 <210> 83

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <400> 83

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Ser Ile Phe Ser Ile Asn

20 25 30

30 Ala Met Asn Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Thr Glu Trp Val

35 40 45

Ala Gln Ile Thr Asp Glu Gly Ile Thr Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys

50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
 5 85 90 95
 Ala Phe Val Ile Thr Thr Thr Ser Glu Ile Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115
 10
 <210> 84
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <400> 84
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 20 25 30
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Glu Asp Ser Ser Thr Glu Thr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser
 50 55 60
 25 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Lys Gly Asp Tyr Tyr Cys Thr Thr Tyr Glu Cys Gln His Tyr
 30 100 105 110
 Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 85

5 <211> 129

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 85

10 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

15 35 40 45

Ser Ser Ile Glu Asp Ser Ser Ile Thr Glu Thr Thr Tyr Tyr Thr Asp

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr

65 70 75 80

20 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Ala Lys Gly Asp Tyr Tyr Cys Thr Thr Tyr Glu Cys Gln His

100 105 110

Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

25 115 120 125

Ser

<210> 86

30 <211> 129

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 86

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Gln Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Arg Tyr

20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Asn Asp Gly Gly Gly Asp Asp Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp

10 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Val Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

15 Tyr Cys Ala Lys Gly Asp Tyr Tyr Cys Thr His Tyr Glu Cys Gln His

100 105 110

Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

115 120 125

Ser

20

<210> 87

<211> 126

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<400> 87

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

30 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr

20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

	35	40	45
	Ser Gly Ile Arg Thr Ser Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys		
	50	55	60
	Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu		
5	65	70	75
	80		
	Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
	85	90	95
	Lys Gly Asp Tyr Tyr Cys Thr Thr Tyr Glu Cys Gln His Tyr Tyr Gly		
	100	105	110
10	Met Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
	115	120	125
	<210> 88		
	<211> 118		
15	<212> PRT		
	<213> Secuencia Artificial		
	<400> 88		
	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
20	1	5	10
	15		
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Ser Ile Phe Ser Ile Asn		
	20	25	30
	Ala Met Asn Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Thr Glu Trp Val		
	35	40	45
25	Ala Gln Ile Thr Asp Glu Gly Ile Thr Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys		
	50	55	60
	Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu		
	65	70	75
	80		
	Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn		
30	85	90	95
	Ala Phe Val Ile Thr Thr Thr Ser Glu Ile Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
	100	105	110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 89

5 <211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 89

10 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

15 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

20 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Ala Ser Val Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

25 <210> 90

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <400> 90

Val Ile Trp Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 5 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Phe
 10 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 91

15 <211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 91

20 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 25 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 30 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 92

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 92

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

10 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly His Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

15 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Gly Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asp Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser His Ser Leu Pro Leu

20 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Gln Gly Gly Asn Gln

100 105

<210> 93

25 <211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 93

30 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Arg Asn

20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Thr Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 5 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Thr Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Ile Tyr His Cys Gln Gln Ser Tyr Arg Thr Pro Phe
 85 90 95
 10 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

 <210> 94
 <211> 107
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <400> 94
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Val Ser Ala Ser Val Gly
 20 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 25 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Thr Ser Phe Pro Leu
 30 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 95

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<400> 95

Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

10 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser His Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Trp Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Thr Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly

15 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Leu Phe

85 90 95

20 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100 105

<210> 96

<211> 107

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 96

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

30 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 5 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 10 100 105

 <210> 97
 <211> 108
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial

 <400> 97
 Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 20 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 25 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Thr Ser Pro
 85 90 95
 30 Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 98

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5

<400> 98

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

10 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ser Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

15 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Leu Ser Ile Pro Gln

85 90 95

Val Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

20 100 105

<210> 99

<211> 110

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<400> 99

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Ala Gln

1 5 10 15

30 Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn

20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Glu Leu Leu

35 40 45
 Ile Tyr Asp Asn Tyr Arg Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
 5 65 70 75 80
 Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
 85 90 95
 Ser Ala Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu
 100 105 110
 10
 <210> 100
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <400> 100
 Glu Leu Thr Gln Pro Ser Ala Val Ser Val Ser Leu Gly Gln Thr Val
 1 5 10 15
 Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Arg Ile Glu Asn Tyr Tyr Thr Ser Trp
 20 20 25 30
 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly Asn
 35 40 45
 Ala Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser
 50 55 60
 25 Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu
 65 70 75 80
 Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Gly Ser Ser Thr Glu Asn Ile Phe Gly
 85 90 95
 Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 30 100
 <210> 101

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <400> 101

Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Ser Ala Val Ser Val Ser Leu Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Arg Ile Glu Asn Tyr Tyr Thr

20 25 30

10 Ser Trp Phe Arg Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Gly Asn Ala Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Ser Ser Gly Val Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala Glu

15 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Gly Ser Ser Thr Glu Asn Ile

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gln

100 105

20

<210> 102

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<400> 102

Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Ser Ala Val Ser Val Ser Leu Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Arg Ile Glu Asn Tyr Tyr Thr

30 20 25 30

Ser Trp Phe Arg Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Gly Asn Ala Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Ser Ser Gly Val Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala Glu

65 70 75 80

5 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Gly Ser Ser Thr Glu Asn Ile

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gln

100 105

10 <210> 103

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <400> 103

Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Ser Ala Val Ser Val Ser Leu Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Arg Ile Glu Asn Tyr Tyr Thr

20 25 30

20 Ser Trp Phe Arg Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Gly Asn Ala Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Ser Ser Gly Val Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala Glu

25 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Gly Ser Ser Thr Glu Asn Ile

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gln

100 105

30

<210> 104

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 104

5 Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Lys Phe Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asp Asn
20 25 30
Tyr Val Asn Trp Tyr Gln His Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
10 35 40 45
Ile Tyr Ser Asn Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Ser Ser Gly Gly Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln
65 70 75 80
15 Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Glu Ile Ser Gly
85 90 95
Tyr Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gln
100 105 110

20 <210> 105

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <400> 105

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Thr Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Arg
20 25 30
30 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asp Arg Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
 5 85 90 95
 Thr His Trp Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 106

10 <211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 106

15 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 20 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 25 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Gln
 85 90 95
 Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

30 <210> 107

<211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 107

Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe Cys Asn

5 1 5 10 15

Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala Gln Asn

20 25 30

Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp Ile Tyr

35 40 45

10 Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp Phe Ser

50 55 60

Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala Ser Leu

65 70 75 80

Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr Thr Cys

15 85 90 95

Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu Leu Lys

100 105 110

Tyr Arg Val Val

115

20

<210> 108

<211> 220

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<400> 108

Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser

1 5 10 15

Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu

30 20 25 30

Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln

35 40 45

	Phe	Val	His	Gly	Glu	Glu	Asp	Leu	Lys	Val	Gln	His	Ser	Ser	Tyr	Arg
	50		55					60								
	Gln	Arg	Ala	Arg	Leu	Leu	Lys	Asp	Gln	Leu	Ser	Leu	Gly	Asn	Ala	Ala
	65		70					75					80			
5	Leu	Gln	Ile	Thr	Asp	Val	Lys	Leu	Gln	Asp	Ala	Gly	Val	Tyr	Arg	Cys
		85						90					95			
	Met	Ile	Ser	Tyr	Gly	Gly	Ala	Asp	Tyr	Lys	Arg	Ile	Thr	Val	Lys	Val
	100							105					110			
	Asn	Ala	Pro	Tyr	Asn	Lys	Ile	Asn	Gln	Arg	Ile	Leu	Val	Val	Asp	Pro
10	115							120					125			
	Val	Thr	Ser	Glu	His	Glu	Leu	Thr	Cys	Gln	Ala	Glu	Gly	Tyr	Pro	Lys
	130							135					140			
	Ala	Glu	Val	Ile	Trp	Thr	Ser	Ser	Asp	His	Gln	Val	Leu	Ser	Gly	Lys
	145							150					155			160
15	Thr	Thr	Thr	Thr	Asn	Ser	Lys	Arg	Glu	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Val	Thr
		165						170					175			
	Ser	Thr	Leu	Arg	Ile	Asn	Thr	Thr	Thr	Asn	Glu	Ile	Phe	Tyr	Cys	Thr
	180							185					190			
	Phe	Arg	Arg	Leu	Asp	Pro	Glu	Glu	Asn	His	Thr	Ala	Glu	Leu	Val	Ile
20	195							200					205			
	Pro	Glu	Leu	Pro	Leu	Ala	His	Pro	Pro	Asn	Glu	Arg				
	210							215					220			

25

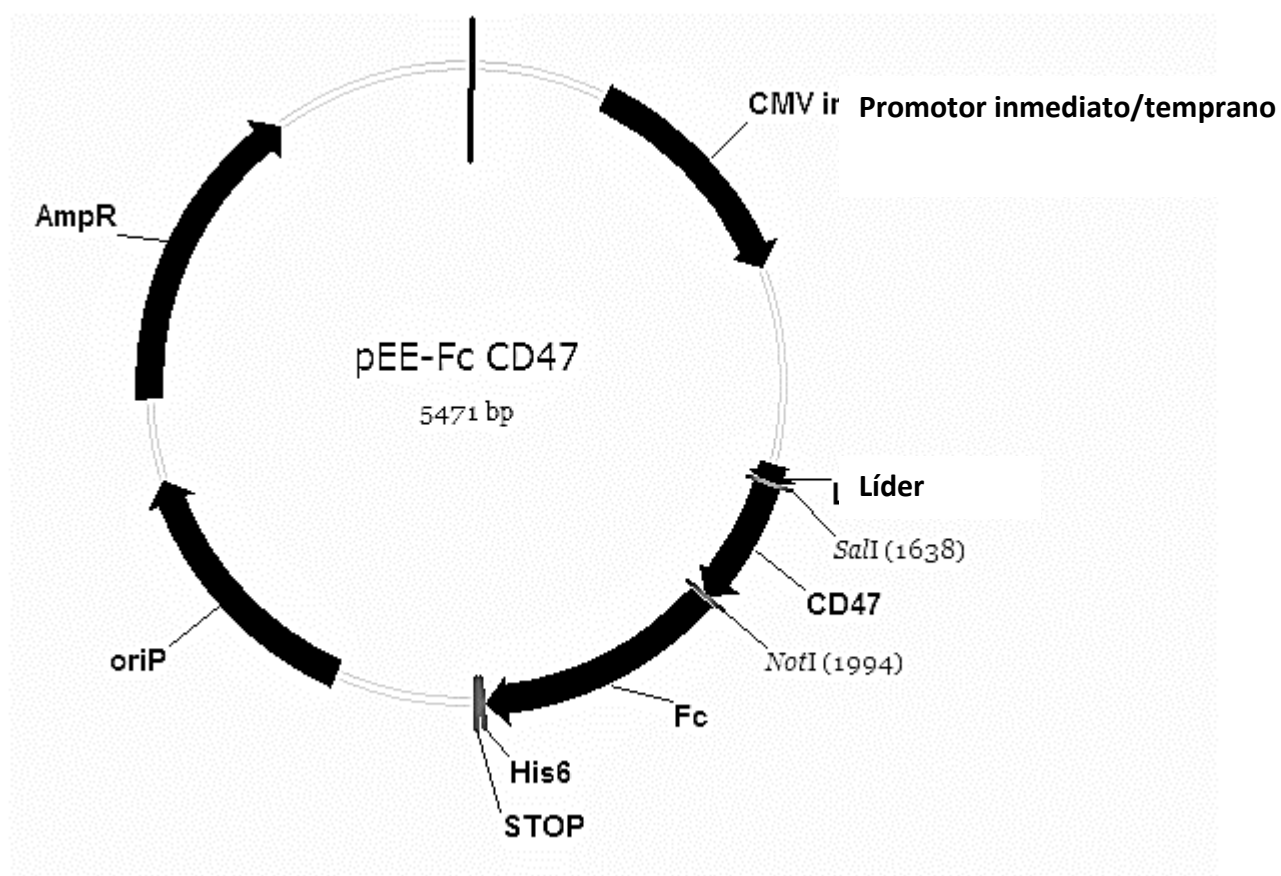


Fig. 1

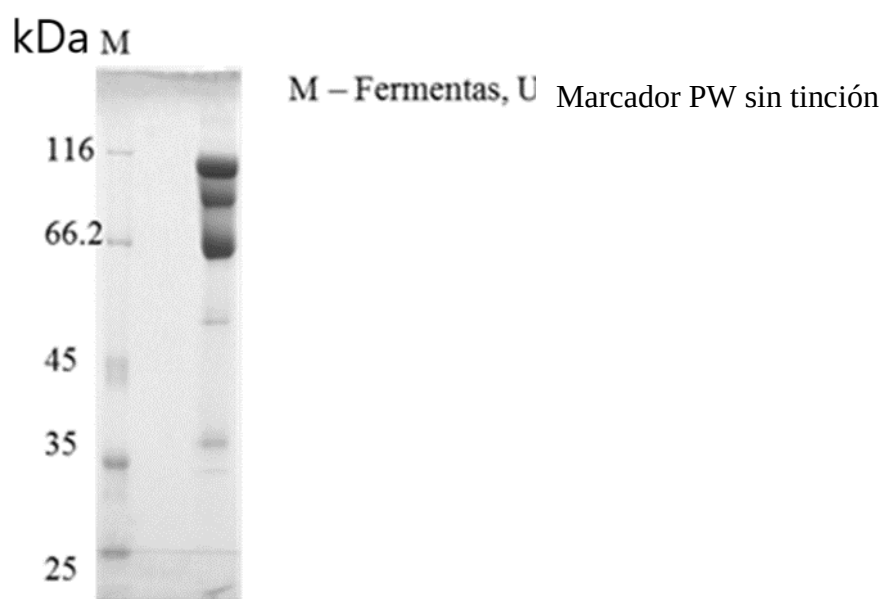


Fig. 2

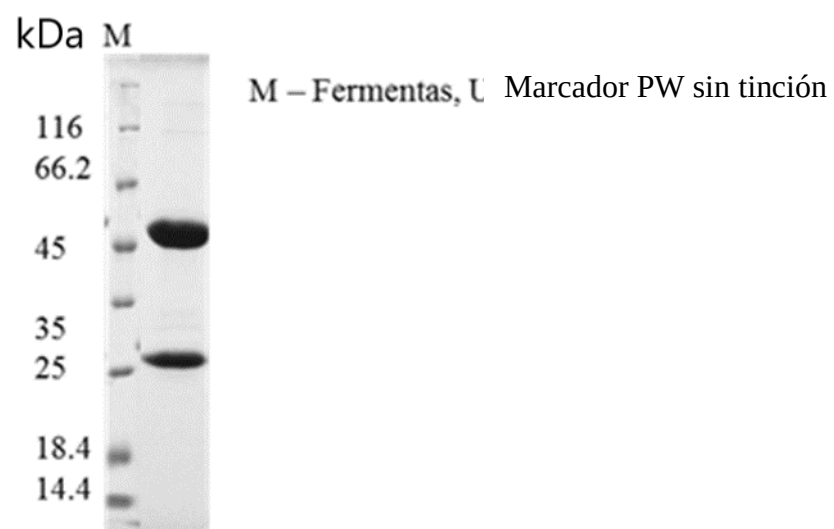


Fig.3

5

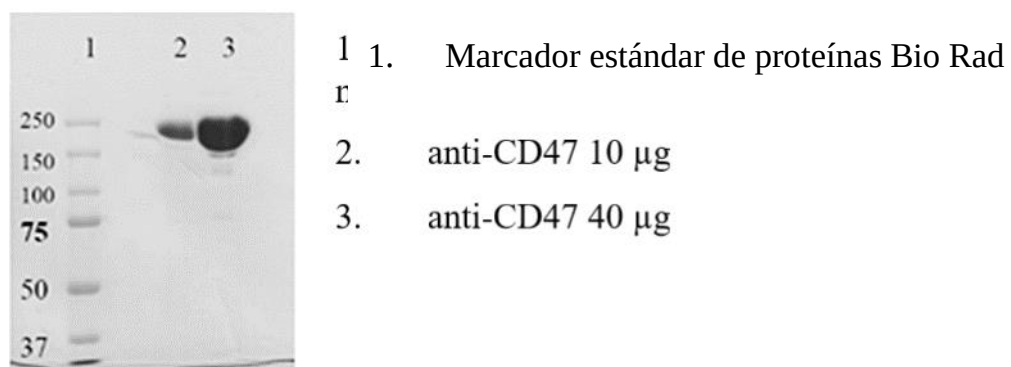


Fig.4

10

15

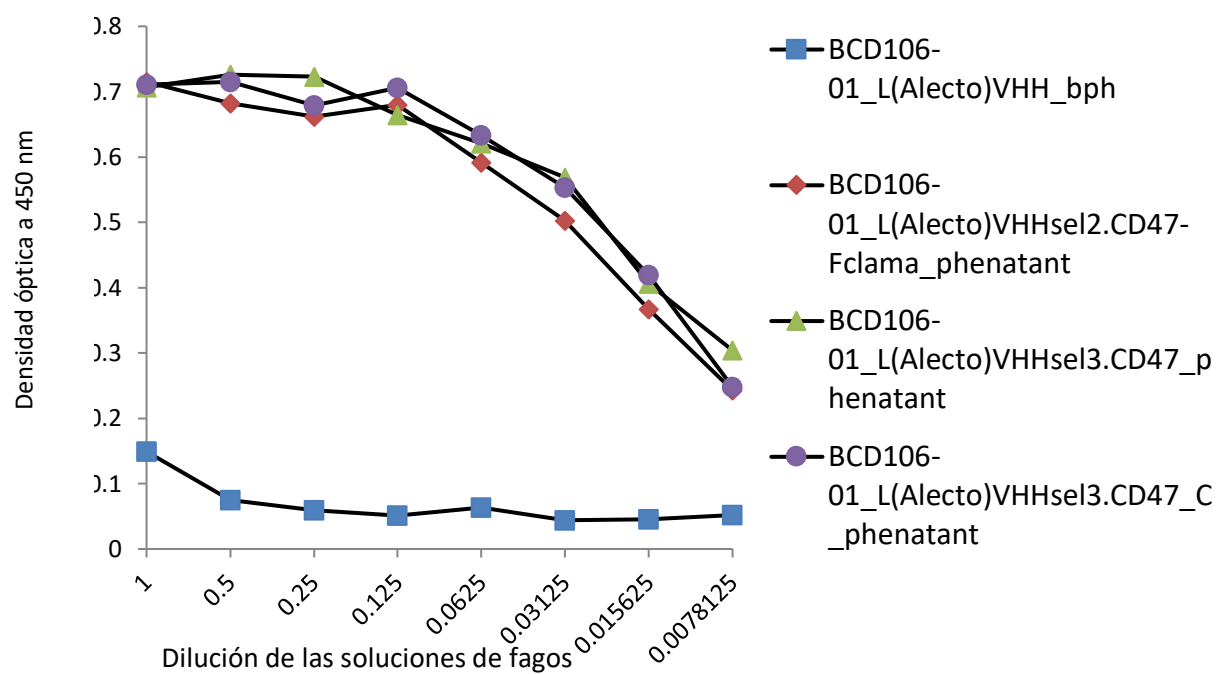


Fig.5

5

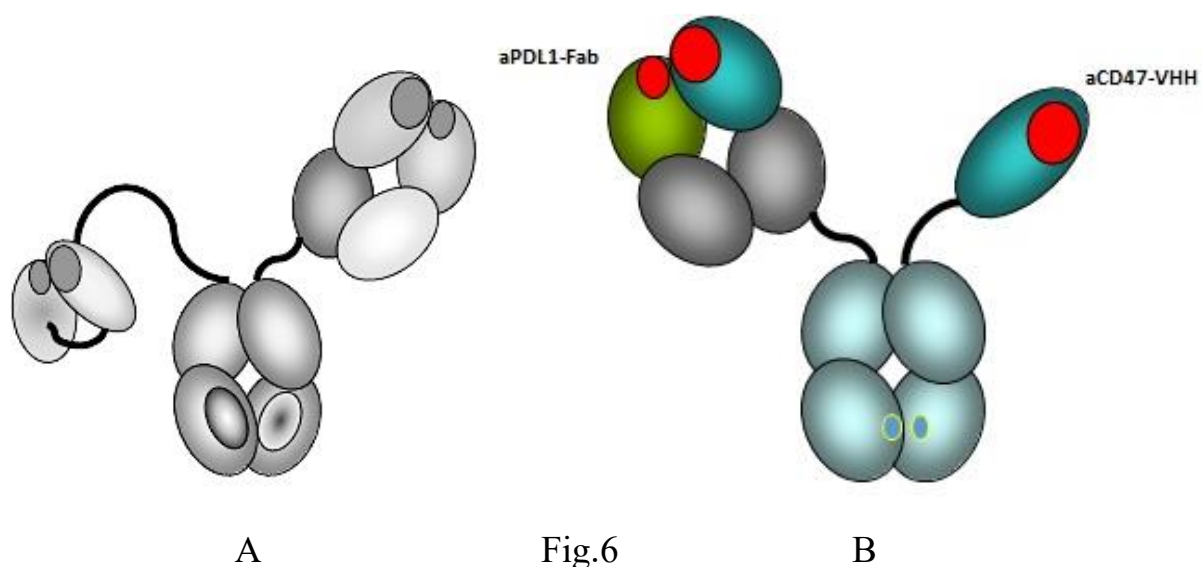


Fig.6

10

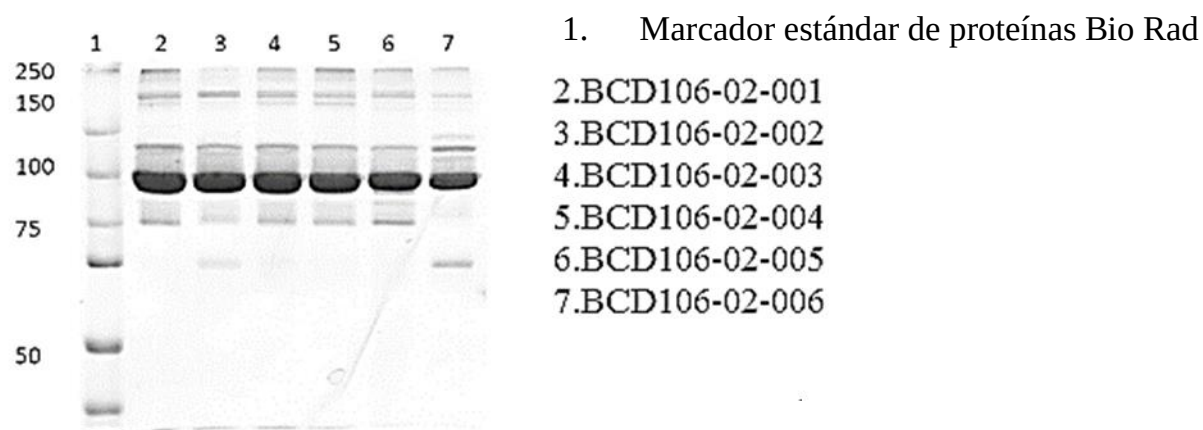


Fig.7

5

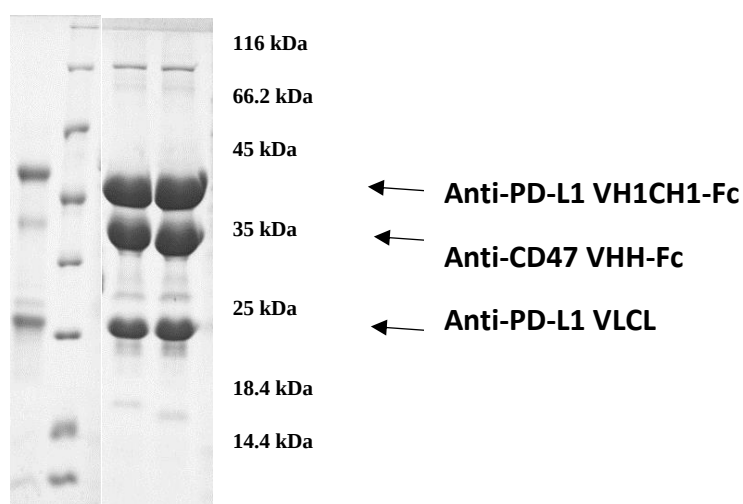


Fig.8

10

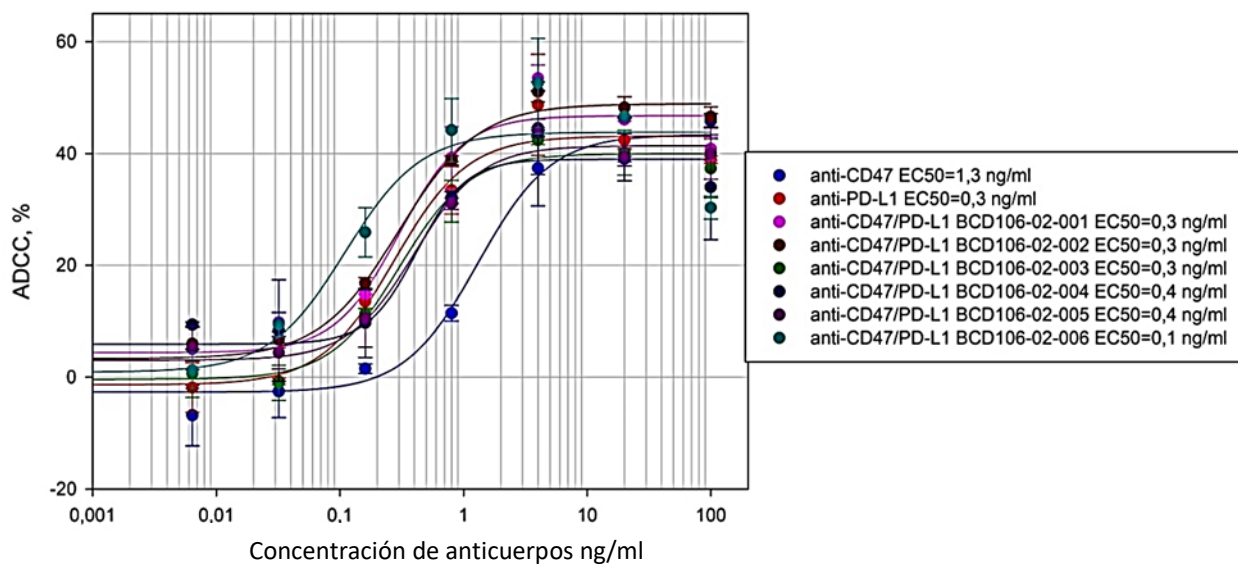


Fig. 9

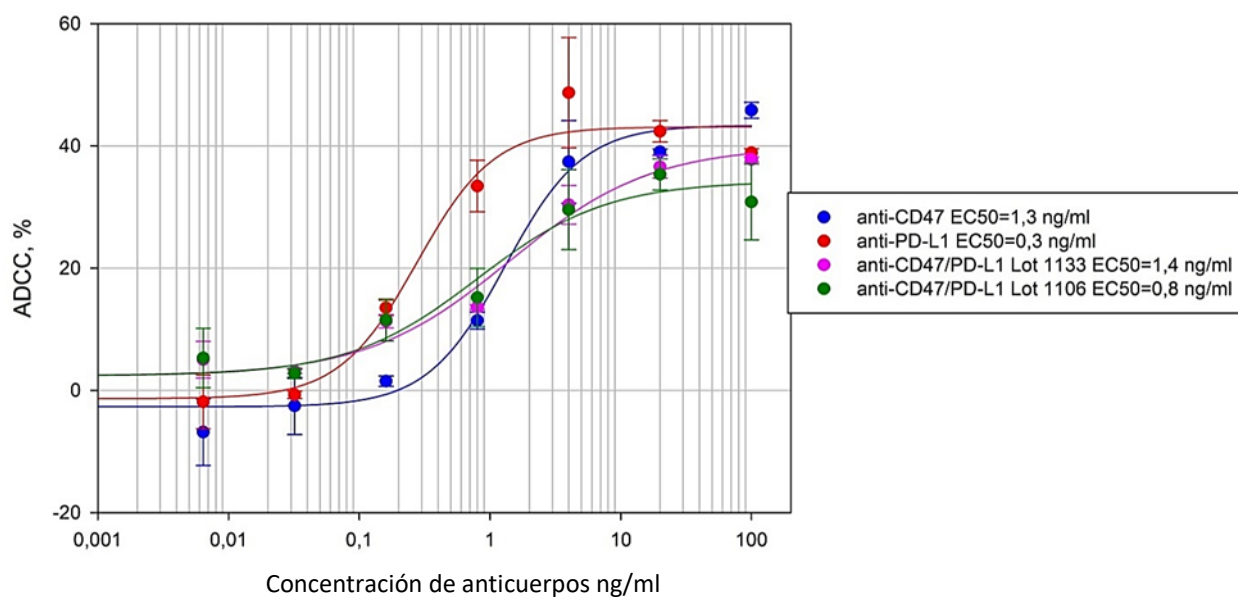


Fig. 10

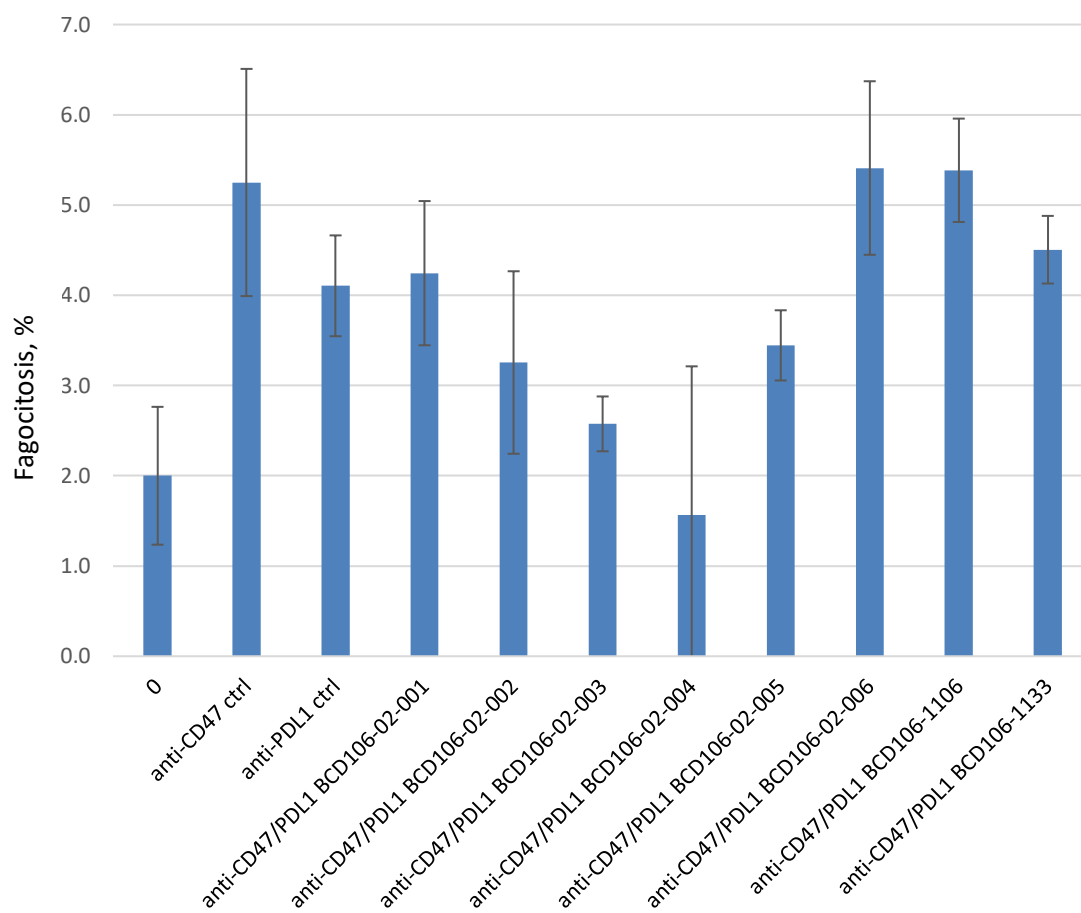


Fig. 11

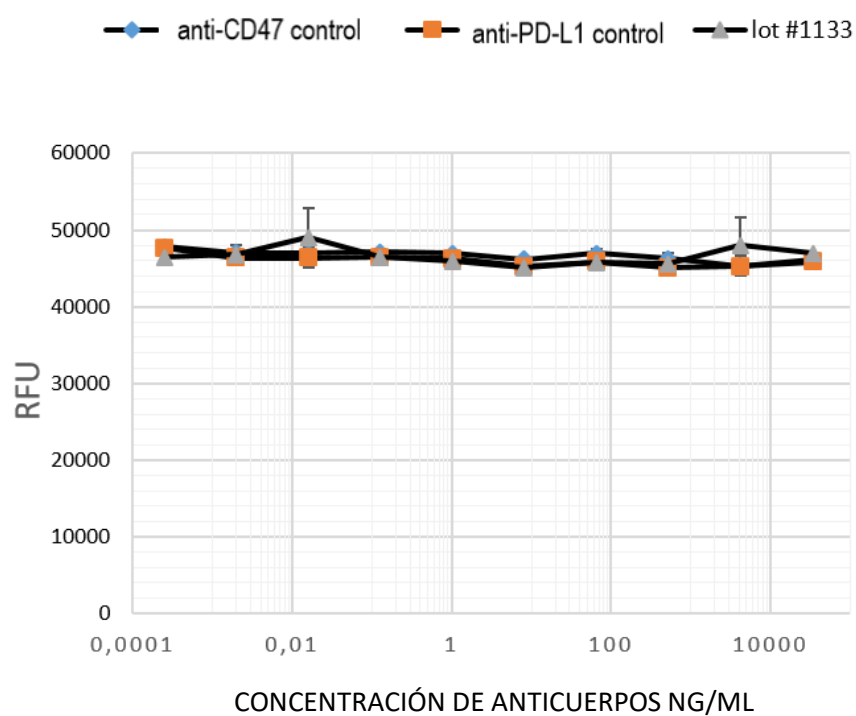


Fig. 12

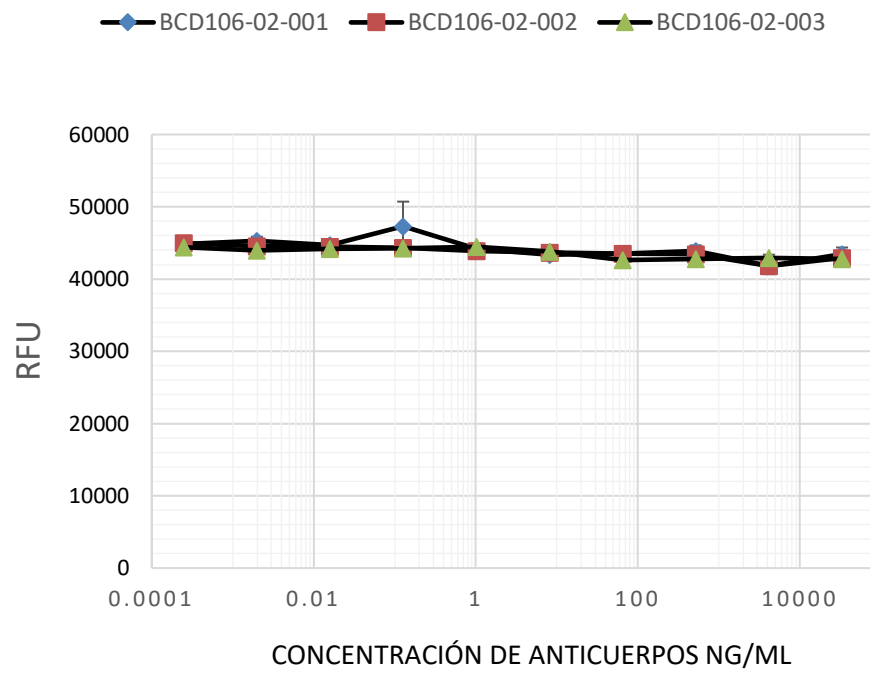


Fig. 13

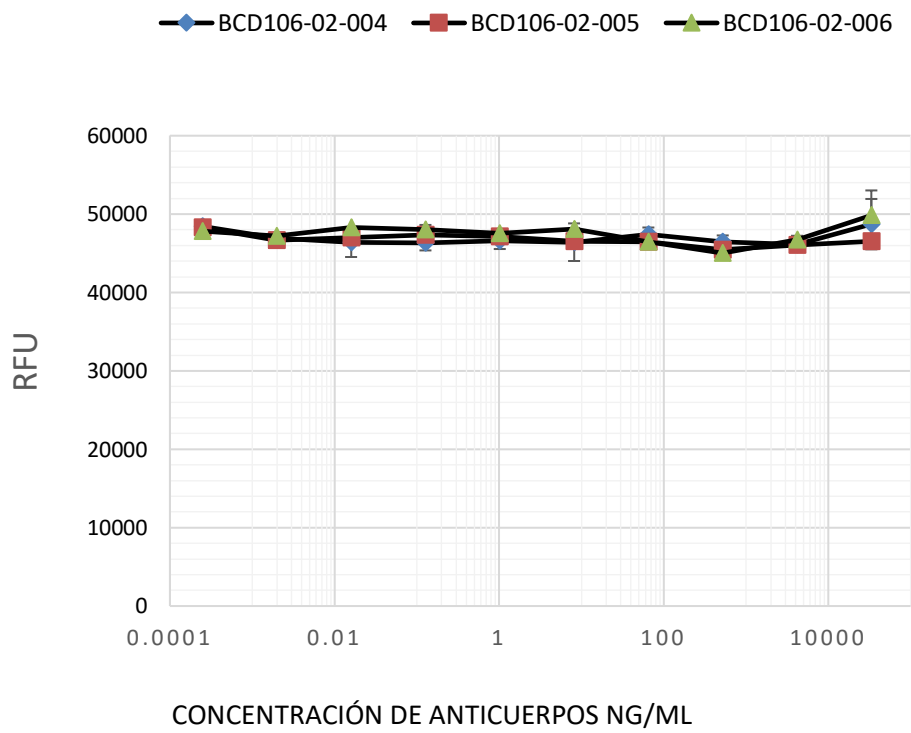


Fig. 14

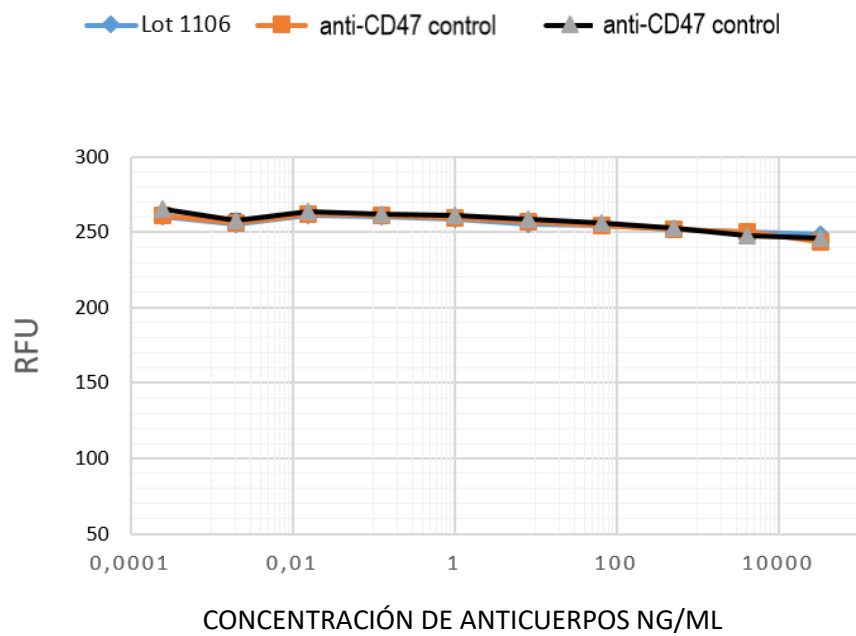


Fig. 15

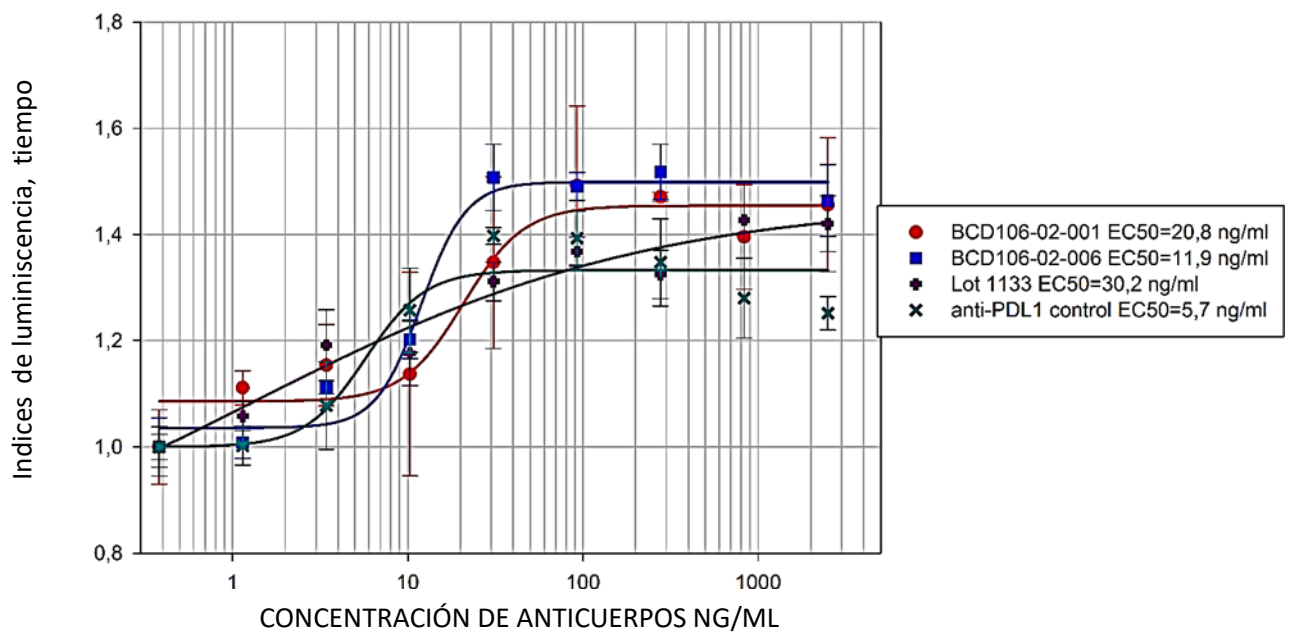


Fig. 16

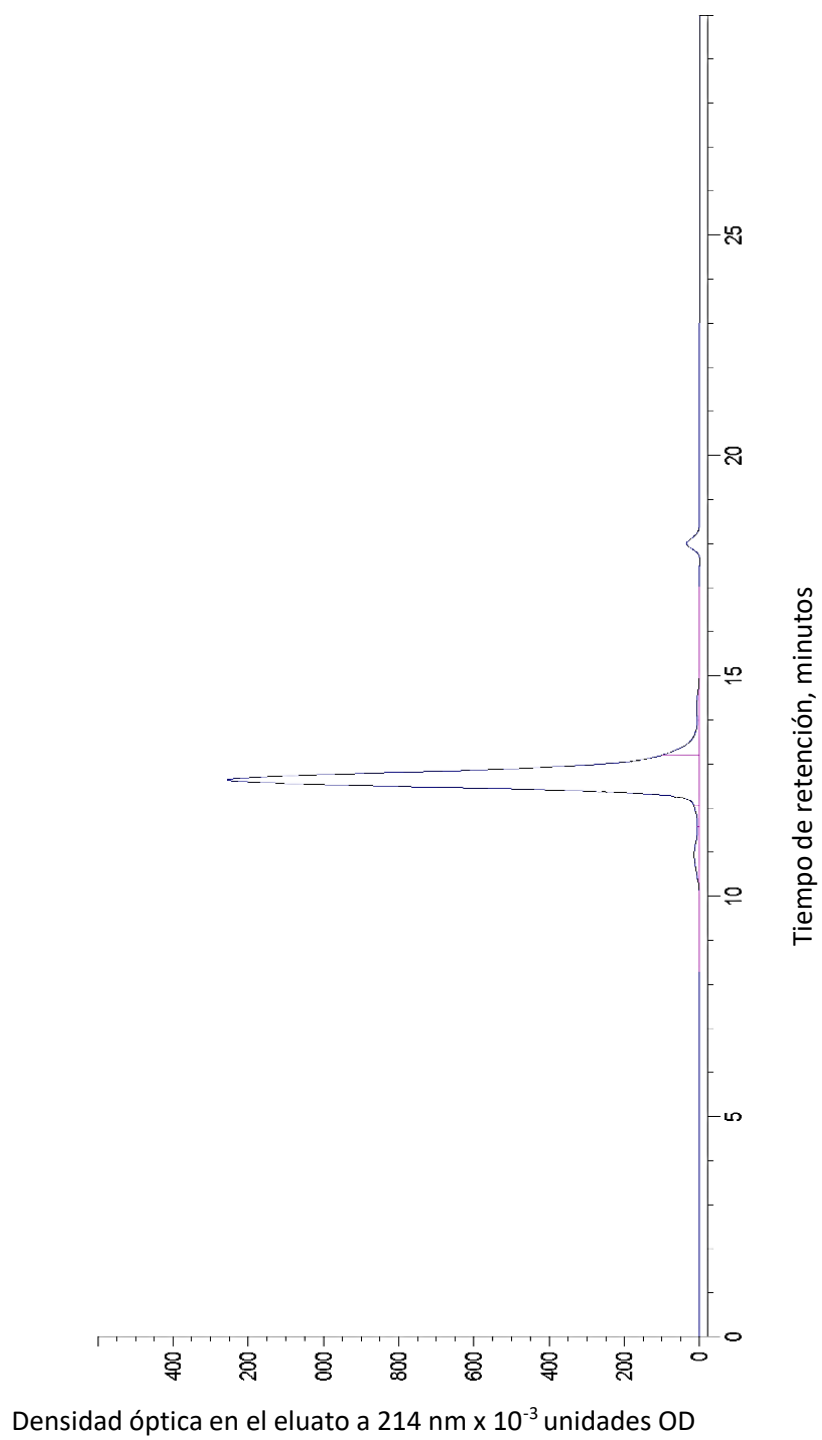


Fig. 17