

ANTICUERPO ANTI-MUERTE PROGRAMADA-LIGANDO 1 Y SU USO

CAMPO TÉCNICO

5 La presente solicitud se refiere al campo biomédico, especialmente a un anticuerpo anti-PD-L1, además se refiere a un método para tratar cánceres mediante el uso de dicho anticuerpo en combinación con un anticuerpo anti-CD137, y además se refiere a un anticuerpo biespecífico formado por tal anticuerpo y un anticuerpo anti-CD137.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La muerte programada-1 (PD-1, también conocida como CD279) y sus ligandos PD-L1 (también conocida como B7-H1, CD274) y PD-L2 (también conocida como B7-DC, CD273) cooperan para proporcionar una señal co-estimuladora para regular la activación de las células T. En ausencia
15 de la señal coestimuladora, las células T son difíciles de sentir la estimulación antigénica, no pueden proporcionar una respuesta inmune efectiva y también pueden resultar en agotamiento o tolerancia a antígenos heterogéneos. PD-1 se puede expresar en células T, células B, células T asesinas naturales, células mononucleares activadas y células dendríticas (DC). PD-1 se puede expresar mediante células T CD4⁺ y CD8⁺ humanas activadas, pero no estimuladas, células B y células de la médula ósea. PD-L1
20 y PD-L2 son diferentes entre sí en sus modos de expresión. PD-L1 puede expresarse no solo en células hematopoyéticas, sino también en una variedad de células no hematopoyéticas, en las que la expresión de PD-L2 está principalmente limitada en células dendríticas y macrófagos. B7.1 (CD80) también es un receptor PD-L1 que se expresa en células B activadas, células T, macrófagos y células dendríticas. Como los ligandos de PD-1 y B7.1, PD-L1 también se expresa selectivamente en una variedad de
25 células tumorales. La inhibición de la transducción de señales de PD-L1 incluye el bloqueo de la interacción entre PD-L1 y uno o ambos de PD-1 y B7.1, evitando así que PD-L1 envíe una señal coestimuladora negativa a las células T y otras células presentadoras de antígenos. Puede mejorar la respuesta inmune a la infección (por ejemplo, aguda o crónica) y la inmunidad al tumor.

30 CD137 (también conocido como 4-1BB, TNFRSF9, etc.) es una proteína transmembrana de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFRS). Los estudios indican que el anticuerpo monoclonal activado por CD137 aumenta la expresión de moléculas coestimuladoras en muchos modelos, mejora significativamente la respuesta de los linfocitos T citolíticos y desempeña un papel antitumoral. El efecto antitumoral de las terapias dirigidas a CD137 se demuestra mediante estudios que implican el efecto terapéutico antitumoral del anticuerpo monoclonal anti-CD137 de ratón
35 activado en ratones.

Actualmente, los anticuerpos PD-L1 han sido aprobados para su uso en el tratamiento de algunos cánceres, y los anticuerpos CD137 existentes exhiben un potencial para tratar una variedad de tumores. Se ha informado que el efecto terapéutico antitumoral del anticuerpo PD-1 en combinación con el anticuerpo CD137 se estudia mediante el uso de un modelo de ratón portador de tumor. Los resultados muestran que los dos anticuerpos usados en combinación exhiben una actividad inhibidora de tumores significativamente mejorada en comparación con los usados solos, pero desde el punto de vista del cumplimiento y el dolor, la terapia de combinación trae inconvenientes a los pacientes y aumenta los costos del tratamiento. El desarrollo del anticuerpo biespecífico (BsAb) de los dos anticuerpos monoclonales puede resolver el problema mencionado anteriormente debido a la presencia de dos sitios de unión al antígeno específicos en el anticuerpo biespecífico. Por tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar un nuevo anticuerpo anti-PD-L1 que tenga mejor eficacia farmacéutica y menor inmunogenicidad y un anticuerpo biespecífico PD-L1/CD137 para proporcionar un mejor efecto antitumoral.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente solicitud proporciona un anticuerpo PD-L1, un fragmento de unión a antígeno o una variante de la misma que tiene una o más de las siguientes propiedades: 1) capaz de unirse a la proteína PD-L1 con mayor afinidad y especificidad; 2) capaz de inhibir la unión de la proteína PD-1 a la proteína PD-L1; y 3) capaz de aliviar o tratar tumores. La presente solicitud proporciona además un anticuerpo biespecífico que tiene una o más de las siguientes propiedades: 1) capaz de unirse a la proteína PD-L1 con mayor afinidad y especificidad; 2) capaz de unirse a la proteína CD137 con mayor afinidad y especificidad; 3) capaz de mejorar las funciones de las células T; y 4) capaz de aliviar o tratar un tumor. La presente solicitud proporciona además un método de preparación y el uso del anticuerpo PD-L1, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo, anticuerpo biespecífico.

En un aspecto, la presente solicitud proporciona un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno o una variante de la misma que se une a la proteína PD-L1 con una K_D de 3×10^{-9} M o menos.

En algunas modalidades, el anticuerpo incluye una cadena ligera de anticuerpo o un fragmento de la misma que incluye una LCDR1, y el LCDR1 incluye una secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 53: TGTX₁SX₂VGGYX₃X₄VS; en donde X₁ es S, R o V; X₂ es D, E o S; X₃ es N o R; X₄ es Y o E, y en donde la LCDR1 se determina de acuerdo al índice del número Kabat del anticuerpo.

En algunas modalidades, la LCDR1 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada

del grupo que consta de SEQ ID NO: 54-58. En algunas modalidades, la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma incluye una LCDR2 que incluye una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 59: X_1NSX_2RPS , en donde X_1 es G o E; X_2 es N o I, y en donde la LCDR2 se determina de acuerdo al índice del número Kabat del anticuerpo. En algunas modalidades, la LCDR2 incluye una

5 secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 60-61. En algunas modalidades, la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma incluye una LCDR3 que incluye una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 62: $QSYDSSLGX_1V$, en donde X_1 es S o T, y en donde la LCDR3 se determina de acuerdo al índice del número Kabat del anticuerpo.

En algunas modalidades, la cadena ligera del anticuerpo o un fragmento de la misma

10 incluye además regiones marco L-FR1, L-FR2, L-FR3, y L-FR4. En algunas modalidades, las regiones marco se seleccionan del grupo que consta de secuencias de marco consenso humanas y secuencias de línea germinal humana. En algunas modalidades, un C-terminal de la L-FR1 está enlazado directa o indirectamente a un N-terminal de la LCDR1, y la L-FR1 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, la L-FR2 se encuentra

15 entre la LCDR1 y la LCDR2, y la L-FR2 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 72. En algunas modalidades, la L-FR3 se encuentra entre la LCDR2 y la LCDR3, y la L-FR3 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 73-75. En algunas modalidades, el N-terminal de la L-FR4 está enlazado directa o indirectamente al C-terminal de la LCDR3, y la L-FR4 incluye una secuencia de aminoácidos

20 seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 76.

En algunas modalidades, la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma incluye una región variable de cadena ligera VL, y la región variable de cadena ligera VL incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 41.

25 En algunas modalidades, la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma incluye además una región constante humana, y la región constante humana incluye una región constante $Ig\lambda$ humana.

En algunas modalidades, la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 8, SEQ ID

30 NO: 15, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 42.

En algunas modalidades, el anticuerpo incluye una cadena pesada de anticuerpo o un fragmento de la misma que incluye una HCDR1, y la HCDR1 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de aquellas mostradas en SEQ ID NO: 45: $X_1Y A I S$, en donde X_1 es S o T, y en donde la HCDR1 se determina de acuerdo al índice del número Kabat del anticuerpo. En

35 algunas modalidades, la cadena pesada de anticuerpo o un fragmento de la misma incluye una HCDR2,

la HCDR2 incluye una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 48, y en donde la HCDR2 se determina de acuerdo al índice del número Kabat del anticuerpo. En algunas modalidades, la cadena pesada de anticuerpo o un fragmento de la misma incluye una HCDR3, y la HCDR3 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de aquellas mostradas en SEQ ID NO: 49: $TMX_1X_2YX_3X_4GNX_5DY$, en donde X_1 es D, E o G, X_2 es G o E, X_3 es S o G, X_4 es Y o F, X_5 es F o Y, y en donde la HCDR3 se determina de acuerdo al índice del número Kabat del anticuerpo. En algunas modalidades, la HCDR3 incluye una secuencia de aminoácidos mostrada en el grupo de SEQ ID NO: 50-52.

En algunas modalidades, la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma incluye además regiones marco H-FR1, H-FR2, H-FR3, y H-FR4. En algunas modalidades, las regiones marco se seleccionan del grupo que consta de secuencias de marco consenso humanas y secuencias de línea germinal humana. En algunas modalidades, un C-terminal de H-FR1 está enlazado directa o indirectamente a un N-terminal de HCDR1, y la H-FR1 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 65-67. En algunas modalidades, la H-FR2 se encuentra entre la HCDR1 y la HCDR2, y la H-FR2 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 68. En algunas modalidades, la H-FR3 se encuentra entre la HCDR2 y la HCDR3, y la H-FR3 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 69. En algunas modalidades, el N-terminal de H-FR4 está enlazado directa o indirectamente al C-terminal de HCDR3, y la H-FR4 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 70.

En algunas modalidades, la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma incluye una región variable de cadena pesada VH, y la región variable de cadena pesada VH incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 35.

En algunas modalidades, la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma incluye además una región constante humana, y la región constante humana incluye una región constante IgG1 humana.

En algunas modalidades, la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 36.

En algunas modalidades, la proteína PD-L1 es seleccionada del grupo que consta de proteína PD-L1 humana, proteína PD-L1 de mono y proteína PD-L1 murino.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno o una variante de la misma que se une a una proteína CD137 con una K_D de 5×10^{-9} M o menos.

En algunas modalidades, el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo se une a una proteína CD137 con una K_D de 3×10^{-9} M o menos.

En algunas modalidades, el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo puede aliviar o tratar tumores. En algunas modalidades, el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo puede aliviar o tratar cáncer de colon.

En algunas modalidades, el anticuerpo incluye una cadena ligera de anticuerpo o un fragmento de la misma. En algunas modalidades, la cadena ligera o el fragmento de la misma incluye LCDR1-3, y las secuencias de aminoácidos de la LCDR1-3 se muestran secuencialmente en SEQ ID NO: 80-82. En algunas modalidades, la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma incluye además regiones marco L-FR1, L-FR2, L-FR3 y L-FR4. En algunas modalidades, las regiones marco se seleccionan del grupo que consta de secuencias de marco consenso humanas y secuencias de línea germinal humana. En algunas modalidades, un C-terminal de la L-FR1 está enlazado directa o indirectamente a un N-terminal de la LCDR1, y la L-FR1 incluye una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 89. En algunas modalidades, la L-FR2 se encuentra entre la LCDR1 y la LCDR2, y la L-FR2 incluye una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 90. En algunas modalidades, la L-FR3 se encuentra entre la LCDR2 y la LCDR3, y la L-FR3 incluye una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 91. En algunas modalidades, el N-terminal de la L-FR4 está enlazado directa o indirectamente al C-terminal de la LCDR3, y la L-FR4 incluye una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 92.

En algunas modalidades, la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma incluye una región variable de cadena ligera VL, y la región variable de cadena ligera VL incluye una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 20.

En algunas modalidades, la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma incluye además una región constante humana y la región constante humana incluye una región constante Igλ humana.

En algunas modalidades, la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma incluye una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23.

En algunas modalidades, el anticuerpo incluye una cadena pesada de anticuerpo o un fragmento de la misma, en donde la cadena pesada o el fragmento de la misma incluye HCDR1-3, y las secuencias de aminoácidos de la HCDR1-3 se muestran secuencialmente en SEQ ID NO: 77-79. En algunas modalidades, la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma incluye además regiones marco H-FR1, H-FR2, H-FR3 y H-FR4. En algunas modalidades, las regiones marco se seleccionan del grupo que consta de secuencias de marco consenso humanas y secuencias de línea germinal humana. En algunas modalidades, un C-terminal de H-FR1 está enlazado directa o indirectamente a un N-terminal de HCDR1, y la H-FR1 incluye una secuencia de aminoácidos mostrada

en SEQ ID NO: 84-85. En algunas modalidades, la H-FR2 se encuentra entre la HCDR1 y la HCDR2, y la H-FR2 incluye una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 86. En algunas modalidades, la H-FR3 se encuentra entre la HCDR2 y la HCDR3, y la H-FR3 incluye una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 87. En algunas modalidades, el N-terminal de H-FR4 está enlazado directa o indirectamente al C-terminal de HCDR3, y la H-FR4 incluye una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 88.

En algunas modalidades, la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma incluye una región variable de cadena pesada VH, y la región variable de cadena pesada VH incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 25.

En algunas modalidades, la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma incluye además una región constante humana, y la región constante humana incluye una región constante IgG humana.

En algunas modalidades, la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 27.

En algunas modalidades, la proteína CD137 incluye una proteína CD137 humana.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona un anticuerpo biespecífico que se une a una proteína PD-L1 con una K_D de 2×10^{-9} M o menos y se une a una proteína CD137 con una K_D de 8×10^{-9} M o menos.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico incluye un primer radical de direccionamiento que se une específicamente a la proteína PD-L1, en el que el primer radical de direccionamiento incluye el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico incluye un segundo radical de direccionamiento que se une específicamente a la proteína CD137, en el que el segundo radical de direccionamiento incluye un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno o una variante de la misma que se une a la proteína CD137. En algunas modalidades, el anticuerpo que se une a la proteína CD137 incluye un scFv, y el scFv incluye una secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 83. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico incluye una primera cadena polipeptídica y una segunda cadena polipeptídica, en la que la primera cadena polipeptídica incluye la región variable de cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína PD-L1, la región variable de cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína CD137 y la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que se une a la proteína CD137; y la segunda cadena polipeptídica incluye la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que se une a la proteína PD-L1.

En algunas modalidades, en la primera cadena polipeptídica, la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína PD-L1 está ubicada en un N-terminal de la

región variable de la cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína CD137, y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína CD137 está ubicada en el N-terminal de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que se une a la proteína CD137; alternatively, la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína PD-L1 está ubicada en el N-terminal de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que se une a la proteína CD137, y la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que se une a la proteína CD137 se encuentra en el N-terminal de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína CD137.

En algunas modalidades, la región variable de cadena ligera del anticuerpo que se une a la proteína CD137 y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína CD137 en la primera cadena polipeptídica constituyen scFv.

En algunas modalidades, la primera cadena polipeptídica incluye además una región constante de IgG humana, y la región constante de IgG humana está ubicada en un C-terminal de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína PD-L1 y se ubica en un N-terminal de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que se une a la proteína CD137; alternatively, la región constante de IgG humana está ubicada en el extremo C de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína PD-L1 y está ubicada en el N-terminal de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína CD137.

En algunas modalidades, la primera cadena polipeptídica incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44. En algunas modalidades, la segunda cadena polipeptídica incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 34.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona una o más moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo, o el anticuerpo biespecífico.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona un vector que incluye la molécula de ácido nucleico.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona una célula que incluye la molécula de ácido nucleico o el vector.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona un método para preparar el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo, o el anticuerpo biespecífico, incluido el cultivo de las células en condiciones que permitan la expresión del anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo, o el anticuerpo biespecífico.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona una composición farmacéutica que incluye el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo, o el anticuerpo biespecífico, la molécula de ácido nucleico, el vector y/o la célula, y opcionalmente un adyuvante

farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona el uso del anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo, o el anticuerpo biespecífico, la molécula de ácido nucleico, el vector, la célula y/o la composición farmacéutica en la fabricación de un fármaco para aliviar o tratar tumores.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona un método para inhibir la unión de una proteína PD-L1 a una proteína PD-1, incluida la administración del anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo, o el anticuerpo biespecífico, la molécula de ácido nucleico, el vector, la célula y/o la composición farmacéutica.

En la presente solicitud, la posición CDR del anticuerpo se determina de acuerdo con el método de definición de anticuerpo de Kabat.

Los expertos en la técnica pueden reconocer fácilmente otros aspectos y ventajas de la presente descripción a partir de la descripción detallada a continuación. La siguiente descripción detallada solo muestra y describe modalidades ejemplares de la presente descripción. Por ejemplo, los expertos en la técnica reconocerán que el contenido de la presente descripción permite a los expertos en la técnica realizar variaciones en las modalidades descritas sin apartarse del espíritu y alcance de la invención a la que se refiere la presente solicitud. En consecuencia, los dibujos adjuntos y la descripción en la especificación de la presente solicitud son solo a modo de ejemplo, más que restrictivos.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las características específicas de las invenciones implicadas en la presente solicitud se muestran en las reivindicaciones adjuntas. Haciendo referencia a las modalidades ejemplares detalladas y los dibujos adjuntos a continuación, se pueden comprender mejor las características y las ventajas de las invenciones implicadas en la presente solicitud. Una breve descripción de los dibujos adjuntos es la siguiente:

La figura 1 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos entre las regiones variables de la cadena pesada del anticuerpo PD-L1 y las regiones variables de la cadena ligera de la presente solicitud y las secuencias de línea germinal relacionadas. Las subrayadas son las CDR determinadas de acuerdo con el método de definición de Kabat.

La figura 2 muestra los resultados del anticuerpo PD-L1 de la presente solicitud que inhibe la unión de la PD-L1 humana a la PD-1 humana.

La figura 3 muestra los resultados del anticuerpo PD-L1 de la presente solicitud que inhibe la unión de Macaca fascicularis PD-L1 a Macaca fascicularis PD-1.

La figura 4 muestra los resultados del anticuerpo PD-L1 de la presente solicitud que inhibe la unión de la PD-L1 de ratón a la PD-1 de ratón.

La figura 5 muestra el efecto de varios anticuerpos de la presente solicitud sobre el crecimiento tumoral MC38 en ratón C57BL/6 (*, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$; prueba t no apareada).

5 La figura 6 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos entre las regiones variables de la cadena pesada del anticuerpo CD137 y las regiones variables de la cadena ligera de la presente solicitud y las secuencias de la línea germinal relacionadas, en donde las CDR determinadas de acuerdo con el método de definición de Kabat están subrayadas.

La figura 7 muestra el efecto del anticuerpo CD137 de la presente solicitud sobre el
10 crecimiento tumoral MC38 en un ratón hembra C57BL/6 con gen CD137 humano (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; prueba t no apareada).

La figura 8 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos entre las regiones variables de la cadena pesada del anticuerpo PD-L1 y las regiones variables de la cadena ligera en la presente solicitud y las secuencias de la línea germinal relacionadas, en donde las CDR determinadas
15 de acuerdo con el método de definición de Kabat están subrayadas y las partes sombreadas son las CDR determinadas de acuerdo con el método de definición IMGT. Los residuos de aminoácidos en varias regiones CDR de YN-003 (incluidos algunos residuos de aminoácidos en las regiones CDR y varios residuos de aminoácidos en las regiones FR adyacentes a las regiones CDR) que se dirigen aleatoriamente al realizar la maduración por afinidad se indican en cursiva.

20 La figura 9 muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada del anticuerpo PD-L1 de la presente solicitud con las secuencias de la línea germinal relacionadas. Las subrayadas son las CDR determinadas según el método de definición de Kabat, y las partes sombreadas son las CDR determinadas según el método de definición de IMGT.

La figura 10 muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las regiones
25 variables de la cadena ligera del anticuerpo PD-L1 de la presente solicitud con las secuencias de la línea germinal relacionadas. Las subrayadas son las CDR determinadas según el método de definición de Kabat, y las partes sombreadas son las CDR determinadas según el método de definición de IMGT.

La figura 11 muestra la unión del anticuerpo PD-L1 de la presente solicitud a las células CHO que expresa de manera estable la PD-L1 humana.

30 La figura 12 muestra el estado en el que el anticuerpo PD-L1 de la presente solicitud inhibe la unión de PD-1 humana a PD-L1 humana.

La figura 13 muestra el estado en el que el anticuerpo PD-L1 de la presente solicitud se une a las células CHO que expresan de manera estable PD-L1 de ratón.

La figura 14 muestra el estado en el que el anticuerpo PD-L1 de la presente solicitud
35 inhibe la unión de PD-1 de ratón a PD-L1 de ratón.

La figura 15 muestra el estado en el que el anticuerpo PD-L1 de la presente solicitud se une a las células MDA-MB-231.

La figura 16 muestra el estado en el que el anticuerpo PD-L1 y el anticuerpo biespecífico PD-L1/CD137 de la presente solicitud se unen a las células CHO que expresan de forma estable PD-L1 humana.

La figura 17 muestra el estado de que el anticuerpo PD-L1 y el anticuerpo biespecífico PD-L1/CD137 de la presente solicitud inhiben la unión de PD-1 humana a PD-L1 humana.

La figura 18 muestra el estado en el que el anticuerpo PD-L1 y el anticuerpo biespecífico PD-L1/CD137 de la presente solicitud se unen a las células CHO que expresan de manera estable PD-L1 de ratón.

La figura 19 muestra el estado en que el anticuerpo PD-L1 y el anticuerpo biespecífico PD-L1/CD137 de la presente solicitud inhiben la unión de PD-1 de ratón a PD-L1 de ratón.

La figura 20 muestra el estado en el que el anticuerpo CD137 y el anticuerpo biespecífico PD-L1/CD137 de la presente solicitud se unen a las células 293T que expresan de forma estable CD137 humano.

Las figuras 21A y 21B muestran el estado en el que se analiza el peso molecular del anticuerpo de la presente solicitud mediante análisis SDS-PAGE. Fig. 21A, no reducido; y Fig. 21B, reducido.

La figura 22 muestra los resultados de varios anticuerpos de la presente solicitud que estimulan la actividad luciferasa de las células 293T que expresan el CD137 humano e integran de manera estable el gen indicador de luciferasa.

La figura 23 muestra el efecto de los anticuerpos de la presente solicitud sobre el crecimiento de tumores MC38 en ratones hembra C57BL/6 con gen CD137 humano (*, $P < 0.05$; prueba t no apareada).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A continuación, las modalidades de la invención implicadas en la presente solicitud se ilustran mediante ejemplos específicos. Aquellos con conocimientos ordinarios en la técnica pueden comprender fácilmente otras ventajas y efectos de la invención descrita en la presente solicitud a partir de la divulgación de la descripción.

En la presente solicitud, el término "anticuerpo" generalmente se refiere a una molécula de polipéptido capaz de reconocer y/o neutralizar específicamente un antígeno específico. Por ejemplo, el anticuerpo puede incluir una inmunoglobulina compuesta por al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) unidas mediante un enlace disulfuro, e incluir cualquier molécula

que incluya su porción de unión al antígeno. El término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos o derivados de anticuerpos, incluidos, entre otros, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de cadena sencillas (por ejemplo, ScFv) y fragmentos de anticuerpos que se unen a antígenos (por ejemplo, fragmentos Fab, Fab' y (Fab)₂). El

5 término "anticuerpo" incluye además todos los recombinantes de un anticuerpo, tales como anticuerpos expresados en células procarióticas, anticuerpos no glicosilados y cualquier fragmento de unión a antígeno del anticuerpo como se describe en este documento y sus derivados. Cada cadena pesada puede estar compuesta por una región variable de cadena pesada (VH) y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera puede estar compuesta por regiones variables de cadena ligera

10 (VL) y regiones constantes de cadena ligera. Las regiones VH y VL se pueden dividir adicionalmente en regiones altamente variables llamadas regiones determinantes complementarias (CDR) que están dispersas en regiones más conservadas llamadas regiones marco (FR). Cada VH y VL puede estar compuesto por tres CDR y cuatro FR que pueden disponerse desde el terminal amino al carboxi terminal en un orden de FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las regiones variables en las

15 cadenas pesadas y las cadenas ligeras incluyen dominios de unión que interactúan con un antígeno. La región constante del anticuerpo puede mediar la unión de la inmunoglobulina a un tejido o factor hospedero que incluye varias células del sistema inmunológico (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente de un sistema del complemento clásico (C1q).

En la presente solicitud, el término "proteína PD-L1" generalmente se refiere a un

20 ligando de la proteína de muerte programada-1 (PD-1). La PD-1 es un receptor de una superfamilia de Ig que interactúa con el ligando específico (PD-L) para regular negativamente la transducción de señales del receptor de antígeno de las células T, y se recomienda que desempeñe un papel en el mantenimiento de la autotolerancia. En ausencia de la señal coestimuladora, las células T son difíciles de sentir la estimulación del antígeno, no pueden producir una respuesta inmune efectiva y pueden

25 causar además el agotamiento o la tolerancia del antígeno heterólogo. PD-L1 puede expresarse en células hematopoyéticas o en una variedad de células no hematopoyéticas. B7.1 (CD80) también es un receptor de PD-L1, que se expresa en células B activadas, células T, macrófagos y células dendríticas. Como ligando de PD-1 y B7.1, PD-L1 se expresa además de forma selectiva en una variedad de células tumorales. La inhibición de la transducción de la señal de PD-L1 incluye el bloqueo de las interacciones

30 de PD-L1 con uno o ambos de PD-1 y B7.1, evitando así que PD-L1 envíe una señal coestimuladora negativa a las células T y otras células presentadoras de antígenos. Puede mejorar la respuesta inmune a infecciones (por ejemplo, aguda y crónica) e inmune a tumores.

En la presente solicitud, el término "proteína CD137", también conocida como 4-1BB o TNFRS9, generalmente se refiere a una proteína transmembrana de la superfamilia de receptores

35 del factor de necrosis tumoral (TNFRS), que es una molécula coestimuladora inducida por activación y

un importante regulador de la respuesta inmunitaria. Los estudios han demostrado que los anticuerpos monoclonales activados por CD137 aumentan la expresión de moléculas coestimuladoras en muchos modelos y mejoran significativamente la respuesta de los linfocitos T citolíticos y ejercen efectos antitumorales. El efecto antitumoral de la terapia dirigida a CD137 puede demostrarse mediante el estudio de eficacia antitumoral en ratones mediante el uso de anticuerpo monoclonal CD137 de anti-ratón activado. CD137 se ha convertido en un poderoso activador de las células inmunes y en un importante candidato a antígeno para el tratamiento de diversas enfermedades. (Ver Vinay, Dass S., y Byoung S. Kwon. "4-1BB (CD137), an inducible costimulatory receptor, as a specific target for cancer therapy." *BMB reports* 47.3 (2014): 122.)

En la presente solicitud, el término "NFκB" se refiere al factor nuclear kappa-potenciador de cadena ligera de células B activadas (NFκB). Este es un complejo de proteínas que controla la transcripción del ADN. El NFκB existe en casi todos los tipos de células animales y participa en las respuestas de las células a muchos estímulos, como estrés, citocinas, radicales libres, radiación UV, oxidación de LDL y antígenos microbianos o virales. En la respuesta inmune a la infección, NFκB juega un papel regulador importante (la cadena ligera κ es una parte importante de la inmunoglobulina). La regulación anormal de NFκB está asociada con cánceres, inflamaciones y enfermedades autoinmunes, choques sépticos, infecciones virales y desarrollo inmunológico anormal. NFκB también está estrechamente asociado con la plasticidad sináptica y los procesos de memoria. Las principales células objetivo de NFκB son quimiocinas, receptores inmunes, moléculas de adhesión, genes de respuesta al estrés, reguladores de la apoptosis, factores de transcripción, factores de crecimiento, enzimas y reguladores del ciclo celular. Además, NFκB tiene una influencia importante en la transcripción de varios promotores/potenciadores virales (por ejemplo, VIH-1 y CMV) (ver Tergaonkar, Vinay. "NFκB pathway: A good signaling paradigm y therapeutic target." *The international journal of biochemistry & cell biology* 38.10 (2006): 1647-1653.).

En la presente solicitud, el término " K_D " puede usarse indistintamente con "KD", y generalmente se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno específico con la unidad de M (mol/l). KD puede calcularse a partir de las concentraciones de sustancia AB y sustancias A y B obtenidas por disociación de AB: $KD = c(A) \cdot c(B) / c(AB)$. Puede verse en esta fórmula que cuanto mayor es el valor de KD, mayor es la disociación y menor la afinidad entre las sustancias A y B; por el contrario, cuanto menor es el valor de KD, menor es la disociación y mayor es la afinidad entre las sustancias A y B.

En la presente solicitud, el término "anticuerpo monoclonal" generalmente se refiere a un grupo de anticuerpos que son sustancialmente homólogos, es decir, cada anticuerpo incluido en el grupo es el mismo excepto por posibles mutaciones naturales en cantidades traza. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y están dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, a

diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal dirigido contra un solo determinante del antígeno no se interpreta como que requiera ningún método especial para producir anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante tecnología de hibridomas o producirse en bacterias, animales eucariotas o células vegetales mediante métodos de ADN recombinante. Alternativamente, los anticuerpos monoclonales también pueden obtenerse de una biblioteca de anticuerpos de fagos, usando una tecnología como se describe en, por ejemplo, Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., *Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991). En la presente solicitud, el término "anticuerpo de cadena sencilla (scFv)" se refiere normalmente a una molécula formada uniendo la región variable de la cadena pesada del anticuerpo a la región variable de la cadena ligera mediante un enlazador peptídico corto (enlazador).

En la presente solicitud, el término "anticuerpo quimérico" generalmente se refiere a un anticuerpo en el que una porción de la secuencia de aminoácidos de cada cadena pesada o ligera es homóloga a la secuencia de aminoácidos correspondiente en un anticuerpo de una especie específica, o pertenece a una clase específica, y el radical de la cadena es homólogo a la secuencia correspondiente en otra especie. Por ejemplo, las regiones variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada se derivan de la región variable de un anticuerpo de una especie animal (por ejemplo, ratón, rata, etc.), mientras que la parte constante es homóloga a una secuencia de anticuerpo de otra especie (por ejemplo, humana). Por ejemplo, para obtener los anticuerpos quiméricos, pueden usarse células B no humanas o células de hibridoma para generar regiones variables, y las regiones constantes combinadas con las mismas se derivan de humanos. La región variable tiene una ventaja de fácil preparación y su especificidad no se ve afectada por la fuente de la región constante combinada con ella. Al mismo tiempo, dado que la región constante del anticuerpo quimérico puede derivar de seres humanos, la posibilidad de que el anticuerpo quimérico induzca una respuesta inmunitaria cuando se inyecta es menor que la de un anticuerpo cuya región constante se deriva de un origen no humano.

En la presente solicitud, el término "anticuerpo humanizado" generalmente se refiere a un anticuerpo modificado obtenido mediante la reducción de la inmunogenicidad de los anticuerpos, proteínas de unión a inmunoglobulina y polipéptidos derivados de especies no humanas (por ejemplo, ratones o ratas) a los seres humanos, sin dejar de retener las propiedades de unión al antígeno del anticuerpo original. Por ejemplo, es factible utilizar medios técnicos, incluido el injerto CDR (Jones et al., *Nature* 321:522 (1986)) and a variant thereof, including "reshaping" (Verhoeyen, et al., 1988 *Science* 239:1534-1536; Riechmann, et al., 1988 *Nature* 332:323-337; Tempest, et al., *Bio/Technol* 1991 9:266-271), "hyperchimerization" (Queen, et al., 1989 *Proc Natl Acad Sci USA* 86:10029-10033; Co, et al., 1991 *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2869-2873; Co, et al., 1992 *J Immunol* 148:1149-1154) y

"veneering", (Mark, et al., "Derivation of therapeutically active humanized y veneered anti-CD18 antibodies." En: Metcalf BW, Dalton BJ, eds. Cellular adhesion: molecular definition to therapeutic potential. New York: Plenum Press, 1994: 291-312) o similares para humanizar el dominio de unión no humano. Si otras regiones, como la región bisagra y los dominios de la región constante, también se derivan de fuentes no humanas, estas regiones también se pueden humanizar.

En la presente solicitud, el término "anticuerpo completamente humano" generalmente significa que todas las partes del anticuerpo (incluidas las regiones constantes, las regiones CH y CL del anticuerpo) están codificadas por genes derivados de humanos. El anticuerpo completamente humano puede reducir significativamente los efectos secundarios inmunes causados por anticuerpos heterogéneos en el cuerpo humano.

En la presente solicitud, el término "anticuerpo biespecífico (BsAbs)" generalmente se refiere a un anticuerpo o construcción de anticuerpo con especificidad dual en su brazo de unión. Los anticuerpos de origen natural son monoespecíficos y tienen la misma especificidad en sus brazos de unión a antígeno. Los anticuerpos biespecíficos se obtienen de dos fuentes diferentes y se construyen mediante ADN recombinante o tecnología de fusión celular, de modo que conservan las dos especificidades del anticuerpo original. Los anticuerpos biespecíficos llevan dos sitios de unión de antígeno diferentes. La parte Fc de un anticuerpo biespecífico es diferente de la parte Fc de cualquier anticuerpo monoespecífico parental. Dado que los anticuerpos biespecíficos tienen una especificidad dual tanto para los fármacos como para las células tumorales, teóricamente pueden provocar que la acumulación del fármaco en los tumores sea mayor que en los sitios del cuerpo que no son tumorales. La mayoría de los nuevos anticuerpos biespecíficos pueden redirigir las células efectoras citotóxicas (por ejemplo, células Tc, células NK, neutrófilos) a las células objetivo (por ejemplo, células tumorales). Los anticuerpos biespecíficos pueden bloquear simultáneamente dos mediadores/vías diferentes que desempeñan un papel único o superpuesto en la patogénesis, y también pueden aumentar la especificidad de unión al interactuar con dos, en lugar de uno, diferentes antígenos de la superficie celular. (Fanger, Michael W., and Paul M. Guyre. "Bispecific antibodies for targeted cellular cytotoxicity." Trends in biotechnology, 1991: 375-380), (Fan, Gaowei, et al. "Bispecific antibodies y their applications." Journal of hematology & oncology, 2015: 130)

En la presente solicitud, el término "homología de secuencia" generalmente significa que las secuencias de aminoácidos de proteínas homólogas tienen una similitud significativa.

En la presente solicitud, el término "epítipo" normalmente se refiere a un determinante antigénico, es decir, una parte de una molécula que es reconocida por el sistema inmunológico (por ejemplo, reconocida por un anticuerpo). Por ejemplo, los epítipos son sitios tridimensionales discretos en un antígeno reconocido por el sistema inmunológico. Un epítipo se compone normalmente de grupos de moléculas de superficie químicamente activos (por ejemplo,

aminoácidos o cadenas laterales de azúcar), y normalmente tiene características estructurales tridimensionales específicas y características de carga específicas. Los epítomos se pueden dividir en epítomos conformacionales y epítomos no conformacionales (epítomos lineales) según sus estructuras. La diferencia entre los epítomos conformacionales y los epítomos no conformacionales es que los primeros perderán la unión en presencia de solventes desnaturalizantes, mientras que los últimos no. Los epítomos que se encuentran únicamente en la superficie de sustancias antigénicas y se unen fácilmente a los receptores de reconocimiento de antígenos o anticuerpos pueden denominarse epítomos funcionales; y los epítomos que se encuentran dentro de la molécula y no son inmunogénicos pueden denominarse epítomos ocultos. Los epítomos pueden estar compuestos de residuos continuos o formados por residuos discontinuos que están próximos entre sí debido al plegamiento del polímero antigénico. Los epítomos formados por aminoácidos consecutivos en las proteínas generalmente se mantienen cuando se exponen a solventes desnaturalizantes, pero los epítomos formados por aminoácidos discontinuos generalmente se pierden después de la exposición.

En la presente solicitud, el término "fragmento de unión al antígeno" generalmente se refiere a una parte de un anticuerpo intacto, por ejemplo, la región de unión al antígeno y/o la región variable del anticuerpo intacto. En algunas modalidades, el fragmento de unión a antígeno puede incluir fragmentos Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂ y Fv. En algunas modalidades, los anticuerpos de la presente solicitud pueden incluir anticuerpos de cadena doble, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de un solo soporte y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Los dos fragmentos idénticos de unión a antígeno obtenidos al digerir un anticuerpo que tiene una estructura intacta con papaína (por ejemplo, eliminando la región Fc y la región bisagra) se denominan fragmentos "Fab". El fragmento Fab está compuesto por una cadena ligera intacta, una región variable de la cadena pesada (VH) y un primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión al antígeno, es decir, tiene un único sitio de unión al antígeno. Los fragmentos de anticuerpo F(ab)₂ se produjeron inicialmente como pares de fragmentos Fab unidos mediante una cisteína. El fragmento F(ab')₂ único y grande obtenido al digerir un anticuerpo que tiene una estructura intacta con pepsina es aproximadamente igual a dos fragmentos Fab unidos mediante disulfuro y que tienen diferentes actividades de unión al antígeno, y aún es capaz de reticular el antígeno. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab en que tienen varios residuos adicionales en el extremo carboxi del dominio CH1, que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra de un anticuerpo. El fragmento Fv está compuesto por los dominios VL y VH de un brazo del anticuerpo.

En la presente solicitud, el término "variante" generalmente se refiere a una secuencia de aminoácidos que tiene sustancialmente la misma función (por ejemplo, una capacidad de unirse específicamente al PD-L1) y al menos el 85% (por ejemplo, al menos el 85%, al menos el 90%, al

menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99%, o al menos 100%) de identidad de secuencia. En algunas modalidades, la variante de una secuencia de aminoácidos es una secuencia de aminoácidos que tiene sustancialmente la misma función (por ejemplo, capaz de unirse específicamente a PD-L1), e incluye uno o más (por ejemplo, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10 o más) sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos.

En la presente solicitud, el término "identidad" generalmente se refiere al porcentaje del número de los mismos residuos de aminoácidos en el número de todos los residuos de aminoácidos cuando se compara la secuencia candidata con la secuencia de péptido o polipéptido específico.

En la presente solicitud, el término "IgG" generalmente se refiere a una inmunoglobulina G. IgG es una de las inmunoglobulinas humanas, y otras incluyen IgA, Ig M, IgD e IgE. La IgG es el principal componente de anticuerpos del suero y representa aproximadamente el 75% de la Ig en suero. Según la diferencia de antigenidad en la cadena y de la molécula de IgG, la IgG humana tiene cuatro subtipos: IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4. La IgG juega un papel importante en la inmunidad. En la presente solicitud, el término "IgG1" generalmente se refiere al subtipo con la mayor proporción de IgG, que tiene una mayor afinidad por los receptores Fc.

En la presente solicitud, el término "molécula de ácido nucleico" generalmente se refiere a una forma aislada de nucleótidos, desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o sus análogos de cualquier longitud aislados de su entorno natural o sintetizados artificialmente.

En la presente solicitud, el término "vector" generalmente se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de autorreplicarse en un hospedero adecuado, que transfiere la molécula de ácido nucleico insertada a las células hospederas y/o entre las células hospederas. El vector puede incluir un vector que se usa principalmente para insertar ADN o ARN en las células, un vector que se usa principalmente para replicar ADN o ARN y un vector que se usa principalmente para la expresión de la transcripción y/o traducción de ADN o ARN. El vector también incluye un vector que tiene múltiples funciones descritas anteriormente. El vector puede ser un polinucleótido que se puede transcribir y traducir en un polipéptido cuando se introduce en una célula hospedera adecuada. Generalmente, cultivando una célula hospedera adecuada que contiene el vector, el vector puede producir el producto de expresión deseado.

En la presente solicitud, el término "célula hospedera" generalmente se refiere a un plásmido o vector que puede incluir o ha incluido la molécula de ácido nucleico de la presente solicitud, o una célula individual, línea celular o cultivo celular que puede expresar el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente solicitud. La célula hospedera puede incluir la progenie de una única célula hospedera. Debido a mutaciones naturales, accidentales y deliberadas, las células de la progenie no pueden ser exactamente iguales a las células parentales originales en morfología o

genoma, siempre que puedan expresar el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo de la presente solicitud. La célula hospedera puede obtenerse transfectando células in vitro mediante el uso del vector de la presente solicitud. La célula hospedera pueden ser células procariotas (por ejemplo, E. Coli) y también pueden ser células eucariotas (por ejemplo, Células de levadura, como células COS, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células HEK293, COS-1 células, células NS0 o células de mieloma). En algunas modalidades, la célula hospedera es una célula de mamífero. Por ejemplo, la célula de mamífero puede ser una célula CHO-K1. En la presente solicitud, el término "célula hospedera recombinante" normalmente se refiere a una célula en la que se introduce un vector de expresión recombinante. La célula hospedera recombinante no solo incluye una célula específica, sino que también incluye la progenie de tales células.

En la presente solicitud, el término "cáncer" generalmente se refiere o describe un estado fisiológico de un mamífero que se caracteriza típicamente por trastornos de la proliferación o supervivencia celular. Los ejemplos de cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer, linfoma, tumor de células maternas, sarcoma y leucemia y tumor linfóide maligno. Por ejemplo, puede ser linfoma.

En la presente solicitud, el término "entre" generalmente significa que el C-terminal de un cierto fragmento de aminoácido está directa o indirectamente unido al N-terminal-terminal del primer fragmento de aminoácido, y el N-terminal del mismo es directa o indirectamente unido al C-terminal del segundo fragmento de aminoácido. En la cadena ligera, por ejemplo, el N-terminal de L-FR2 está directa o indirectamente unido al C-terminal de la LCDR1, y el C-terminal de L-FR2 está directa o indirectamente unido a N-terminal de la LCDR2. Para otro ejemplo, el N-terminal de la L-FR3 está directa o indirectamente vinculado al C-terminal de la LCDR2, y el C-terminal de la L-FR3 está directa o indirectamente enlazado al N-terminal de la LCDR3. En la cadena pesada, por ejemplo, el N-terminal del H-FR2 está directa o indirectamente unido al C-terminal de la HCDR1, y el C-terminal del H-FR2 está directa o indirectamente unido al N-terminal de la HCDR2. Para otro ejemplo, el N-terminal de la H-FR3 está directa o indirectamente vinculado al C-terminal de la HCDR2, y el C-terminal de la H-FR3 está directa o indirectamente enlazado al N-terminal de la HCDR3.

En la presente solicitud, el término "aproximadamente" generalmente se refiere a una variación en un intervalo del valor dado $\pm 0.5\%$ - $\pm 10\%$, tal como, una variación en un intervalo del valor dado $\pm 0.5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 1.5\%$, $\pm 2\%$, $\pm 2.5\%$, $\pm 3\%$, $\pm 3.5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 4.5\%$, $\pm 5\%$, $\pm 5.5\%$, $\pm 6\%$, $\pm 6.5\%$, $\pm 7\%$, $\pm 7.5\%$, $\pm 8\%$, $\pm 8.5\%$, $\pm 9\%$, $\pm 9.5\%$ o $\pm 10\%$.

En la presente solicitud, el término "incluye" generalmente se refiere al significado de incluir, resumir, tener o contener. En algunos casos, también se expresa como un significado de "ser" o "consistir en".

Anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo del mismo

En un aspecto, la presente solicitud proporciona un anticuerpo o un fragmento de

unión a antígeno o una variante del mismo que se une a una proteína PD-L1 con un valor K_D de 3×10^{-9} M o menos (por ejemplo, el valor K_D no es mayor que aproximadamente 3×10^{-9} M, no mayor que aproximadamente 2×10^{-9} M, no mayor que aproximadamente 1×10^{-9} M, no mayor que aproximadamente 9×10^{-10} M, no mayor que aproximadamente 8×10^{-10} M, no superior a aproximadamente 7×10^{-10} M, no superior a aproximadamente 6×10^{-10} M, no superior a aproximadamente 5×10^{-10} M, no superior a aproximadamente 4×10^{-10} M, no superior a aproximadamente 3×10^{-10} M, no superior a aproximadamente 2×10^{-10} M, no superior a 1×10^{-10} M, no superior a aproximadamente 9×10^{-11} M, no superior a aproximadamente 8×10^{-11} M, no superior a aproximadamente 7×10^{-11} M, no superior a aproximadamente 6×10^{-11} M, no superior a aproximadamente 1×10^{-11} M o menos). Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo puede unirse a una proteína PD-L1 con un valor de K_D inferior a 8×10^{-11} M

El anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud pueden inhibir la unión de PD-L1 a PD-1.

El anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede aliviar o tratar enfermedades asociadas a tumores. El tumor incluye cáncer de colon.

En la presente solicitud, el anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en anticuerpo monoclonal, anticuerpo de cadena sencilla, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado y anticuerpo completamente humano.

En la presente solicitud, el fragmento de unión al antígeno puede seleccionarse del grupo que consiste en el fragmento Fab, Fab', F(ab)₂ y Fv.

En la presente solicitud, la variante puede ser una secuencia de aminoácidos que tiene sustancialmente las mismas funciones (por ejemplo, puede unirse específicamente a PD-L1) y tiene al menos 85% o más (por ejemplo, al menos aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% o más) de identidad de secuencia. En algunas modalidades, la variante de la secuencia de aminoácidos tiene básicamente la misma función (por ejemplo, capaz de unirse específicamente a PD-L1), e incluye una secuencia de aminoácidos obtenida por la adición, delección o sustitución de uno o más (por ejemplo, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10 o más) aminoácidos. Para otro ejemplo, la variante de la presente solicitud puede seleccionarse del siguiente grupo: una proteína o polipéptido que sufre sustitución, delección o adición de uno o más aminoácidos en el anticuerpo o el fragmento para la unión al antígeno del mismo; y una proteína o polipéptido que tiene más del 85% (por ejemplo, al menos aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%,

aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% o más) de identidad de secuencia con el anticuerpo o el fragmento para la unión al antígeno del mismo.

En algunas modalidades, el anticuerpo de la presente solicitud puede incluir una
 5 cadena ligera de anticuerpo o un fragmento de la misma que incluye una LCDR1, y la LCDR1 incluye una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 53: TGTX₁SX₂VGGYX₃X₄VS; en donde X₁ es S, R o V; X₂ es D, E o S; X₃ es N o R; X₄ es Y o E, y en donde la LCDR1 se determina de acuerdo al índice del número Kabat del anticuerpo. Por ejemplo, la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma puede incluir LCDR1, y la LCDR1 incluye la siguiente secuencia de aminoácidos o una variante
 10 de la misma: SEQ ID NO: 54-58.

En algunas modalidades, la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma puede incluir LCDR2 que incluye una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 59: X₁NSX₂RPS, en donde X₁ es G o E; X₂ es N o I, y en donde la LCDR2 se determina de acuerdo al índice del número Kabat del anticuerpo. Por ejemplo, la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la
 15 misma puede incluir LCDR2 que incluye la siguiente secuencia de aminoácidos o una variante de la misma: SEQ ID NO: 60-61.

En algunas modalidades, la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma puede incluir LCDR3 que incluye una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 62: QSYDSSLGX₁V, en donde X₁ es S o T, y en donde la LCDR3 se determina de acuerdo al índice del
 20 número Kabat del anticuerpo. Por ejemplo, la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma puede incluir LCDR3 que incluye una secuencia de aminoácidos o una variante de la misma seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 64.

En algunas modalidades, la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma puede incluir además regiones marco L-FR1, L-FR2, L-FR3, y L-FR4. Por ejemplo, el C-terminal de la L-FR1 se puede enlazar directa o indirectamente al N-terminal de la LCDR1, y la L-FR1 incluye una
 25 secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 71. La L-FR2 se encuentra entre la LCDR1 y la LCDR2, y la L-FR2 incluye una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 72. La L-FR3 se encuentra entre la LCDR2 y la LCDR3, y la L-FR3 incluye una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 73-75. El N-terminal de la L-FR4 está enlazado directa o indirectamente al C-terminal de
 30 la LCDR3, y la L-FR4 incluye una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 76. En algunas modalidades, las regiones marco se seleccionan del grupo que consta de secuencias de marco consenso humanas y secuencias de línea germinal humana.

En algunas modalidades, la cadena ligera o el fragmento de la misma del anticuerpo de la presente solicitud incluye una región variable de cadena ligera VL, y la región variable de cadena
 35 ligera VL incluye una secuencia de aminoácidos o una variante de la misma seleccionada del grupo

que consta de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 41.

En el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud, la cadena ligera del anticuerpo o un fragmento de la misma puede incluir además una región constante humana, y la región constante humana incluye una región constante Igλ humana.

En la presente solicitud, la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma puede incluir una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 42.

En la presente solicitud, el anticuerpo de la presente solicitud puede incluir una cadena pesada de anticuerpo o un fragmento de la misma, en donde la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma puede incluir HCDR1, y la HCDR1 puede incluir una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de aquellas mostradas en SEQ ID NO: 45: X₁Y₁AIS, en donde X₁ es S o T, y en donde la HCDR1 se determina de acuerdo al índice del número Kabat del anticuerpo. Por ejemplo, la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma puede incluir HCDR1, y la HCDR1 incluye una secuencia de aminoácidos o una variante de la misma seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 47.

En la presente solicitud, la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma puede incluir HCDR2, y la HCDR2 incluye la siguiente secuencia de aminoácidos o una variante de la misma: SEQ ID NO: 48, y en donde la HCDR2 se determina de acuerdo al índice del número Kabat del anticuerpo.

En la presente solicitud, la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma puede incluir HCDR3, y la HCDR3 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de aquellas mostradas en SEQ ID NO: 49: TMX₁X₂YX₃X₄GNX₅DY, en donde X₁ es D, E o G, X₂ es G o E, X₃ es S o G, X₄ es Y o F, X₅ es F o Y, y en donde la HCDR3 se determina de acuerdo al índice del número Kabat del anticuerpo. Por ejemplo, la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma puede incluir HCDR3, y la HCDR3 incluye la siguiente secuencia de aminoácidos o una variante de la misma: SEQ ID NO: 50-52.

En algunas modalidades, la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma incluye además regiones marco H-FR1, H-FR2, H-FR3, y H-FR4. Por ejemplo, el C-terminal de H-FR1 está enlazado directa o indirectamente al N-terminal de HCDR1, y la H-FR1 puede incluir una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66 y SEQ ID NO: 67. La H-FR2 se encuentra entre la HCDR1 y la HCDR2, y la H-FR2 puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 68. La H-FR3 se encuentra entre la HCDR2 y la HCDR3, y la H-FR3 puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 69. El N-terminal de H-FR4 está enlazado directa o indirectamente al C-terminal de HCDR3, y la H-FR4 puede incluir una secuencia

de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 70. En algunas modalidades, las regiones marco se seleccionan del grupo que consta de secuencias de marco consenso humanas y secuencias de línea germinal humana.

La cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma de la presente solicitud puede incluir una región variable de cadena pesada VH, y la región variable de cadena pesada VH puede incluir una secuencia de aminoácidos o una variante de la misma seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 31, y SEQ ID NO: 35. En el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud, la cadena pesada de anticuerpo o un fragmento de la misma puede incluir además una región constante humana. Por ejemplo, la región constante humana puede incluir una región constante IgG humana. Por ejemplo, la región constante IgG humana puede incluir una región constante IgG1 humana.

En algunas modalidades, la cadena pesada de anticuerpo o un fragmento de la misma puede incluir una secuencia de aminoácidos o una variante de la misma seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 32, y SEQ ID NO: 36.

En algunas modalidades, el anticuerpo de la presente solicitud incluye una cadena ligera de anticuerpo o un fragmento de la misma que incluye LCDR1, y la LCDR1 incluye una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 53: TGTX₁SX₂VGGYX₃X₄VS; en donde X₁ es S, R o V; X₂ es D, E o S; X₃ es N o R; X₄ es Y o E, y en donde la LCDR1 se determina de acuerdo al índice del número Kabat del anticuerpo. Por ejemplo, la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma puede incluir LCDR1, y la LCDR1 incluye una secuencia de aminoácidos o una variante de la misma seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 54-58. La cadena ligera de anticuerpo o el fragmento de la misma incluye LCDR2 que incluye una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 59: X₁NSX₂RPS, en donde X₁ es G o E; X₂ es N o I, y en donde la LCDR2 se determina de acuerdo al índice del número Kabat del anticuerpo. Por ejemplo, la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma puede incluir LCDR2 que incluye una secuencia de aminoácidos o una variante de la misma seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 60-61. La cadena ligera de anticuerpo o el fragmento de la misma incluye LCDR3 que incluye una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 62: QSYDSSLGX₁V, en donde X₁ es S o T, y en donde la LCDR3 se determina de acuerdo al índice del número Kabat del anticuerpo. Por ejemplo, la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma puede incluir LCDR3 que incluye una secuencia de aminoácidos o una variante de la misma seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 63-64. Además, el anticuerpo de la presente solicitud incluye una cadena pesada de anticuerpo o un fragmento de la misma que incluye una HCDR1, y la HCDR1 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de aquellas mostradas en SEQ ID NO: 45: X₁YAIS, en donde X₁ es S o T, y en donde la HCDR1 se determina de acuerdo al índice del número Kabat del anticuerpo. Por ejemplo, la cadena pesada de anticuerpo o el

fragmento de la misma puede incluir HCDR1, y la HCDR1 incluye una secuencia de aminoácidos o una variante de la misma seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 47. Por ejemplo, la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma puede incluir HCDR2, y la HCDR2 incluye la siguiente secuencia de aminoácidos o una variante de la misma: SEQ ID NO: 48, y en donde

5 la HCDR2 se determina de acuerdo al índice del número Kabat del anticuerpo. Para otro ejemplo, la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma incluye HCDR3, y la HCDR3 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de aquella mostrada en SEQ ID NO: 49: $TMX_1X_2YX_3X_4GNX_5DY$, en donde X_1 es D, E o G, X_2 es G o E, X_3 es S o G, X_4 es Y o F, X_5 es F o Y, y en donde la HCDR3 se determina de acuerdo al índice del número Kabat del anticuerpo. La cadena pesada del anticuerpo o

10 el fragmento del mismo puede incluir HCDR3, y el HCDR3 incluye la siguiente secuencia de aminoácidos o una variante de la misma: SEQ ID NO: 50-52.

La secuencia de aminoácidos de la LCDR1 del anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede incluir SEQ ID NO: 54 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 60 o una variante de

15 la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 63 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR1 puede incluir SEQ ID NO: 46; la secuencia de aminoácidos de la HCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 48 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la HCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 50 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-

20 002 o un anticuerpo con la misma LCDR1-3 y HCDR1-3 con éste. En algunos casos, la secuencia de aminoácidos de la L-FR1 del anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo puede incluir SEQ ID NO: 71 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR2 puede incluir SEQ ID NO: 72 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR3 puede incluir SEQ ID NO: 73 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR4

25 puede incluir SEQ ID NO: 76 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la H-FR1 puede incluir SEQ ID NO: 65 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR2 puede incluir SEQ ID NO: 68 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR3 puede incluir SEQ ID NO: 69 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la H-FR4 puede incluir SEQ ID NO: 70 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de

30 unión al antígeno o la variante del mismo puede incluir un anticuerpo que tenga la misma LCDR1-3, HCDR1-3, L-FR1-4 y H-FR1-4 que el anticuerpo YN-002. En algunas modalidades, la cadena ligera del anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede incluir una región variable de cadena ligera, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera puede incluir SEQ ID NO: 4 o una variante de la misma; y donde la cadena pesada puede

35 incluir una región variable de cadena pesada, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de

cadena pesada puede incluir SEQ ID NO: 2 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-002 o un anticuerpo que tiene la misma región variable de cadena ligera y región variable de cadena pesada con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede incluir una cadena ligera y una cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se muestra en SEQ ID NO: 8 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada se muestra en SEQ ID NO: 6. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-002 o tener la misma cadena ligera y cadena pesada con éste.

En algunas modalidades, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud compite con un anticuerpo de referencia para unirse a la proteína PD-L1 (por ejemplo, proteína PD-L1 humana). El anticuerpo de referencia puede incluir LCDR1-3 y HCDR1-3, y la secuencia de aminoácidos de la LCDR1 puede incluir SEQ ID NO: 54 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 60 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 63 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR1 puede incluir SEQ ID NO: 46 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la HCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 48 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la HCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 50 o una variante de la misma. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia puede incluir el anticuerpo YN-002 o un anticuerpo con la misma LCDR1-3 y HCDR1-3 con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia incluye L-FR1-4 y H-FR1-4, y la secuencia de aminoácidos de la L-FR1 puede incluir SEQ ID NO: 71 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR2 puede incluir SEQ ID NO: 72 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR3 puede incluir SEQ ID NO: 73 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR4 puede incluir SEQ ID NO: 76 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la H-FR1 puede incluir SEQ ID NO: 65 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR2 puede incluir SEQ ID NO: 68 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR3 puede incluir SEQ ID NO: 69 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR4 puede incluir SEQ ID NO: 70 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo puede incluir el anticuerpo YN-002 o un anticuerpo con la misma LCDR1-3, HCDR1-3, L-FR1-4 y H-FR1-4 con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia puede incluir una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera puede incluir SEQ ID NO: 4 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada puede incluir SEQ ID NO: 2 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo de referencia puede incluir el anticuerpo

YN-002 o un anticuerpo que tiene la misma región variable de cadena ligera y región variable de cadena pesada con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia puede incluir una cadena ligera y una cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se puede mostrar en SEQ ID NO: 8, y la secuencia de aminoácidos de cadena pesada se puede mostrar en SEQ ID NO: 6. Por ejemplo, el anticuerpo de referencia puede incluir el anticuerpo YN-002 o tener la misma cadena ligera y cadena pesada con éste.

En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de la LCDR1 del anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede incluir SEQ ID NO: 54 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 60 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 63 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR1 puede incluir SEQ ID NO: 46 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la HCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 48 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la HCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 50 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-003 o un anticuerpo con la misma LCDR1-3 y HCDR1-3 con éste. En algunos casos, la secuencia de aminoácidos de la L-FR1 del anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo puede incluir SEQ ID NO: 71 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR2 puede incluir SEQ ID NO: 72 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR3 puede incluir SEQ ID NO: 74 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR4 puede incluir SEQ ID NO: 76 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la H-FR1 puede incluir SEQ ID NO: 66 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR2 puede incluir SEQ ID NO: 68 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR3 puede incluir SEQ ID NO: 69 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la H-FR4 puede incluir SEQ ID NO: 70 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-003 o un anticuerpo con el mismo LCDR1-3, HCDR1-3, L-FR1-4 y H-FR1-4 además de eso. En algunas modalidades, la cadena ligera del anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede incluir una región variable de cadena ligera, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera puede incluir SEQ ID NO: 11 o una variante de la misma; y donde la cadena pesada puede incluir una región variable de cadena pesada, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada puede incluir SEQ ID NO: 9 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-003 o un anticuerpo que tiene la misma región variable de cadena ligera y región variable de cadena pesada con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede

incluir una cadena ligera y una cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se muestra en SEQ ID NO: 15 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada se muestra en SEQ ID NO: 13. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-003 o tener la misma cadena ligera y cadena pesada con éste.

5 En algunas modalidades, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud compite con un anticuerpo de referencia para unirse a la proteína PD-L1 (por ejemplo, proteína PD-L1 humana). El anticuerpo de referencia puede incluir LCDR1-3 y HCDR1-3, y la secuencia de aminoácidos de la LCDR1 puede incluir SEQ ID NO: 54 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 60 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 63 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR1 puede incluir SEQ ID NO: 46 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la HCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 48 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la HCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 50 o una variante de la misma. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia puede incluir el anticuerpo YN-003 o un anticuerpo con la misma LCDR1-3 y HCDR1-3 con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia incluye L-FR1-4 y H-FR1-4, y la secuencia de aminoácidos de la L-FR1 puede incluir SEQ ID NO: 71 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR2 puede incluir SEQ ID NO: 72 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR3 puede incluir SEQ ID NO: 74 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR4 puede incluir SEQ ID NO: 76 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la H-FR1 puede incluir SEQ ID NO: 66 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR2 puede incluir SEQ ID NO: 68 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR3 puede incluir SEQ ID NO: 69 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR4 puede incluir SEQ ID NO: 70 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo puede incluir el anticuerpo YN-003 o un anticuerpo con la misma LCDR1-3, HCDR1-3, L-FR1-4 y H-FR1-4 con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia puede incluir una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera puede incluir SEQ ID NO: 11 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada puede incluir SEQ ID NO: 9 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo de referencia puede incluir el anticuerpo YN-003 o un anticuerpo que tiene la misma región variable de cadena ligera y región variable de cadena pesada con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia puede incluir una cadena ligera y una cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se puede mostrar en SEQ ID NO: 15 y la secuencia de aminoácidos de cadena pesada se puede mostrar en SEQ ID NO: 13. Por ejemplo, el anticuerpo de referencia puede incluir el anticuerpo YN-003 o tener la misma cadena ligera y cadena pesada con

éste.

En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de la LCDR1 del anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede incluir SEQ ID NO: 55 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 60 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 64 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR1 puede incluir SEQ ID NO: 47 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la HCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 48 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la HCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 51 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-035 o un anticuerpo con la misma LCDR1-3 y HCDR1-3 con éste. En algunos casos, la secuencia de aminoácidos de la L-FR1 del anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo puede incluir SEQ ID NO: 71 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR2 puede incluir SEQ ID NO: 72 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR3 puede incluir SEQ ID NO: 74 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR4 puede incluir SEQ ID NO: 76 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la H-FR1 puede incluir SEQ ID NO: 67 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR2 puede incluir SEQ ID NO: 68 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR3 puede incluir SEQ ID NO: 69 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la H-FR4 puede incluir SEQ ID NO: 70 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-035 o un anticuerpo con el mismo LCDR1-3, HCDR1-3, L-FR1-4 y H-FR1-4 además de eso. En algunas modalidades, la cadena ligera del anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede incluir una región variable de cadena ligera, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera puede incluir SEQ ID NO: 33 o una variante de la misma; y donde la cadena pesada puede incluir una región variable de cadena pesada, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada puede incluir SEQ ID NO: 31 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-035 o un anticuerpo que tiene la misma región variable de cadena ligera y región variable de cadena pesada con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede incluir una cadena ligera y una cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se muestra en SEQ ID NO: 34 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada se muestra en SEQ ID NO: 32. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-035 o tener la misma cadena ligera y cadena pesada con éste.

En algunas modalidades, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante

del mismo de la presente solicitud compite con un anticuerpo de referencia para unirse a la proteína PD-L1 (por ejemplo, proteína PD-L1 humana). El anticuerpo de referencia puede incluir LCDR1-3 y HCDR1-3, y la secuencia de aminoácidos del LCDR1 puede incluir SEQ ID NO: 55 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 60 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 64 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR1 puede incluir SEQ ID NO: 47 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la HCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 48 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la HCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 51 o una variante de la misma. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia puede incluir el anticuerpo YN-035 o un anticuerpo con la misma LCDR1-3 y HCDR1-3 con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia incluye L-FR1-4 y H-FR1-4, y la secuencia de aminoácidos de la L-FR1 puede incluir SEQ ID NO: 71 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR2 puede incluir SEQ ID NO: 72 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR3 puede incluir SEQ ID NO: 74 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR4 puede incluir SEQ ID NO: 76 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la H-FR1 puede incluir SEQ ID NO: 67 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR2 puede incluir SEQ ID NO: 68 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR3 puede incluir SEQ ID NO: 69 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR4 puede incluir SEQ ID NO: 70 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo puede incluir el anticuerpo YN-035 o un anticuerpo con la misma LCDR1-3, HCDR1-3, L-FR1-4 y H-FR1-4 con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia puede incluir una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera puede incluir SEQ ID NO: 33 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada puede incluir SEQ ID NO: 31 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo de referencia puede incluir el anticuerpo YN-035 o un anticuerpo que tiene la misma región variable de cadena ligera y región variable de cadena pesada con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia puede incluir una cadena ligera y una cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se puede mostrar en SEQ ID NO: 34 y la secuencia de aminoácidos de cadena pesada se puede mostrar en SEQ ID NO: 32. Por ejemplo, el anticuerpo de referencia puede incluir el anticuerpo YN-035 o tener la misma cadena ligera y cadena pesada con éste.

En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de la LCDR1 del anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede incluir SEQ ID NO: 55 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 60 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR3 puede incluir SEQ ID

NO: 64 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR1 puede incluir SEQ ID NO: 47 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la HCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 48 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la HCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 52 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-036 o un anticuerpo con la misma LCDR1-3 y HCDR1-3 con éste. En algunos casos, la secuencia de aminoácidos de la L-FR1 del anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo puede incluir SEQ ID NO: 71 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR2 puede incluir SEQ ID NO: 72 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR3 puede incluir SEQ ID NO: 74 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR4 puede incluir SEQ ID NO: 76 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la H-FR1 puede incluir SEQ ID NO: 67 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR2 puede incluir SEQ ID NO: 68 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR3 puede incluir SEQ ID NO: 69 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la H-FR4 puede incluir SEQ ID NO: 70 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-036 o un anticuerpo con el mismo LCDR1-3, HCDR1-3, L-FR1-4 y H-FR1-4 además de eso. En algunas modalidades, la cadena ligera del anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede incluir una región variable de cadena ligera, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera puede incluir SEQ ID NO: 33 o una variante de la misma; y donde la cadena pesada puede incluir una región variable de cadena pesada, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada puede incluir SEQ ID NO: 35 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-036 o un anticuerpo que tiene la misma región variable de cadena ligera y región variable de cadena pesada con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede incluir una cadena ligera y una cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se muestra en SEQ ID NO: 34 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada se muestra en SEQ ID NO: 36. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-036 o tener la misma cadena ligera y cadena pesada con éste.

En algunas modalidades, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud compite con un anticuerpo de referencia para unirse a la proteína PD-L1 (por ejemplo, proteína PD-L1 humana). El anticuerpo de referencia puede incluir LCDR1-3 y HCDR1-3, y la secuencia de aminoácidos de la LCDR1 puede incluir SEQ ID NO: 55 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 60 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 64 o una variante de la

misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR1 puede incluir SEQ ID NO: 47 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la HCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 48 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 52 o una variante de la misma. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia puede incluir el anticuerpo YN-036 o un anticuerpo con la misma LCDR1-3 y HCDR1-3 con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia incluye L-FR1-4 y H-FR1-4, y la secuencia de aminoácidos de la L-FR1 puede incluir SEQ ID NO: 71 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR2 puede incluir SEQ ID NO: 72 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR3 puede incluir SEQ ID NO: 74 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR4 puede incluir SEQ ID NO: 76 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la H-FR1 puede incluir SEQ ID NO: 67 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR2 puede incluir SEQ ID NO: 68 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR3 puede incluir SEQ ID NO: 69 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR4 puede incluir SEQ ID NO: 70 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo puede incluir el anticuerpo YN-036 o un anticuerpo con la misma LCDR1-3, HCDR1-3, L-FR1-4 y H-FR1-4 con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia puede incluir una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera puede incluir SEQ ID NO: 33 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada puede incluir SEQ ID NO: 35 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo de referencia puede incluir el anticuerpo YN-036 o un anticuerpo que tiene la misma región variable de cadena ligera y región variable de cadena pesada con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia puede incluir una cadena ligera y una cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se puede mostrar en SEQ ID NO: 34 y la secuencia de aminoácidos de cadena pesada se puede mostrar en SEQ ID NO: 36. Por ejemplo, el anticuerpo de referencia puede incluir el anticuerpo YN-036 o tener la misma cadena ligera y cadena pesada con éste.

En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de la LCDR1 del anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede incluir SEQ ID NO: 56 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 61 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 64 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR1 puede incluir SEQ ID NO: 47 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la HCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 48 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 52 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-037 o un anticuerpo con la misma LCDR1-3 y

HCDR1-3 con éste. En algunos casos, la secuencia de aminoácidos de la L-FR1 del anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo puede incluir SEQ ID NO: 71 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR2 puede incluir SEQ ID NO: 72 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR3 puede incluir SEQ ID NO: 75 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR4 puede incluir SEQ ID NO: 76 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la H-FR1 puede incluir SEQ ID NO: 67 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR2 puede incluir SEQ ID NO: 68 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR3 puede incluir SEQ ID NO: 69 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la H-FR4 puede incluir SEQ ID NO: 70 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-037 o un anticuerpo con el mismo LCDR1-3, HCDR1-3, L-FR1-4 y H-FR1-4 además de eso. En algunas modalidades, la cadena ligera del anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede incluir una región variable de cadena ligera, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera puede incluir SEQ ID NO: 37 o una variante de la misma; y donde la cadena pesada puede incluir una región variable de cadena pesada, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada puede incluir SEQ ID NO: 35 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-037 o un anticuerpo que tiene la misma región variable de cadena ligera y región variable de cadena pesada con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede incluir una cadena ligera y una cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se muestra en SEQ ID NO: 38 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada se muestra en SEQ ID NO: 36. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-037 o tener la misma cadena ligera y cadena pesada con éste.

En algunas modalidades, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud compete con un anticuerpo de referencia para unirse a la proteína PD-L1 (por ejemplo, proteína PD-L1 humana). El anticuerpo de referencia puede incluir LCDR1-3 y HCDR1-3, y la secuencia de aminoácidos de la LCDR1 puede incluir SEQ ID NO: 56 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 61 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 64 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR1 puede incluir SEQ ID NO: 47 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la HCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 48 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 52 o una variante de la misma. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia puede incluir el anticuerpo YN-037 o un anticuerpo con la misma LCDR1-3 y HCDR1-3 con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo de

referencia incluye L-FR1-4 y H-FR1-4, y la secuencia de aminoácidos de la L-FR1 puede incluir SEQ ID NO: 71 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR2 puede incluir SEQ ID NO: 72 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR3 puede incluir SEQ ID NO: 75 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR4 puede incluir SEQ ID NO: 76 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la H-FR1 puede incluir SEQ ID NO: 67 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR2 puede incluir SEQ ID NO: 68 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR3 puede incluir SEQ ID NO: 69 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la H-FR4 puede incluir SEQ ID NO: 70 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo puede incluir el anticuerpo YN-037 o un anticuerpo con la misma LCDR1-3, HCDR1-3, L-FR1-4 y H-FR1-4 con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia puede incluir una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera puede incluir SEQ ID NO: 37 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada puede incluir SEQ ID NO: 35 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo de referencia puede incluir el anticuerpo YN-037 o un anticuerpo que tiene la misma región variable de cadena ligera y región variable de cadena pesada con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia puede incluir una cadena ligera y una cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se puede mostrar en SEQ ID NO: 38 y la secuencia de aminoácidos de cadena pesada se puede mostrar en SEQ ID NO: 36. Por ejemplo, el anticuerpo de referencia puede incluir el anticuerpo YN-037 o tener la misma cadena ligera y cadena pesada con éste.

En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de la LCDR1 del anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede incluir SEQ ID NO: 57 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 61 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 64 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR1 puede incluir SEQ ID NO: 47 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la HCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 48 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 52 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-038 o un anticuerpo con la misma LCDR1-3 y HCDR1-3 con éste. En algunos casos, la secuencia de aminoácidos de la L-FR1 del anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo puede incluir SEQ ID NO: 71 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR2 puede incluir SEQ ID NO: 72 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR3 puede incluir SEQ ID NO: 75 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR4 puede incluir SEQ ID NO: 76 o una variante de la

misma; y la secuencia de aminoácidos de la H-FR1 puede incluir SEQ ID NO: 67 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR2 puede incluir SEQ ID NO: 68 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR3 puede incluir SEQ ID NO: 69 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la H-FR4 puede incluir SEQ ID NO: 70 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-038 o un anticuerpo con la misma LCDR1-3, HCDR1-3, L-FR1-4 y H-FR1-4 con éste. En algunas modalidades, la cadena ligera del anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede incluir una región variable de cadena ligera, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera puede incluir SEQ ID NO: 39 o una variante de la misma; y donde la cadena pesada puede incluir una región variable de cadena pesada, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada puede incluir SEQ ID NO: 35 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-038 o un anticuerpo que tiene la misma región variable de cadena ligera y región variable de cadena pesada con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede incluir una cadena ligera y una cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se muestra en SEQ ID NO: 40 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada se muestra en SEQ ID NO: 36. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-038 o tener la misma cadena ligera y cadena pesada con éste.

En algunas modalidades, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud compite con un anticuerpo de referencia para unirse a la proteína PD-L1 (por ejemplo, proteína PD-L1 humana). El anticuerpo de referencia puede incluir LCDR1-3 y HCDR1-3, y la secuencia de aminoácidos de la LCDR1 puede incluir SEQ ID NO: 57 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 61 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 64 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR1 puede incluir SEQ ID NO: 47 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la HCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 48 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 52 o una variante de la misma. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia puede incluir el anticuerpo YN-038 o un anticuerpo con la misma LCDR1-3 y HCDR1-3 con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia incluye L-FR1-4 y H-FR1-4, y la secuencia de aminoácidos de la L-FR1 puede incluir SEQ ID NO: 71 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR2 puede incluir SEQ ID NO: 72 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR3 puede incluir SEQ ID NO: 75 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR4 puede incluir SEQ ID NO: 76 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la H-FR1 puede incluir SEQ ID NO: 67 o

una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR2 puede incluir SEQ ID NO: 68 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR3 puede incluir SEQ ID NO: 69 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la H-FR4 puede incluir SEQ ID NO: 70 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo puede incluir el anticuerpo YN-038 o un anticuerpo con la misma LCDR1-3, HCDR1-3, L-FR1-4 y H-FR1-4 con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia puede incluir una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera puede incluir SEQ ID NO: 39 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada puede incluir SEQ ID NO: 35 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo de referencia puede incluir el anticuerpo YN-038 o un anticuerpo que tiene la misma región variable de cadena ligera y región variable de cadena pesada con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia puede incluir una cadena ligera y una cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se puede mostrar en SEQ ID NO: 40 y la secuencia de aminoácidos de cadena pesada se puede mostrar en SEQ ID NO: 36. Por ejemplo, el anticuerpo de referencia puede incluir el anticuerpo YN-038 o tener la misma cadena ligera y cadena pesada con éste.

En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de la LCDR1 del anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede incluir SEQ ID NO: 58 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 61 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 64 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR1 puede incluir SEQ ID NO: 47 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la HCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 48 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 52 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-039 o un anticuerpo con la misma LCDR1-3 y HCDR1-3 con éste. En algunos casos, la secuencia de aminoácidos de la L-FR1 del anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo puede incluir SEQ ID NO: 71 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR2 puede incluir SEQ ID NO: 72 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR3 puede incluir SEQ ID NO: 75 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR4 puede incluir SEQ ID NO: 76 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la H-FR1 puede incluir SEQ ID NO: 67 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR2 puede incluir SEQ ID NO: 68 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR3 puede incluir SEQ ID NO: 69 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la H-FR4 puede incluir SEQ ID NO: 70 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo puede

incluir el anticuerpo YN-039 o un anticuerpo con el mismo LCDR1-3, HCDR1-3, L-FR1-4 y H-FR1-4 además de eso. En algunas modalidades, la cadena ligera del anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede incluir una región variable de cadena ligera, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera puede incluir SEQ ID NO: 41 o una variante de la misma; y donde la cadena pesada puede incluir una región variable de cadena pesada, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada puede incluir SEQ ID NO: 35 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-039 o un anticuerpo que tiene la misma región variable de cadena ligera y región variable de cadena pesada con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede incluir una cadena ligera y una cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se muestra en SEQ ID NO: 42 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada se muestra en SEQ ID NO: 36. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-039 o tener la misma cadena ligera y cadena pesada con éste.

En algunas modalidades, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud compite con un anticuerpo de referencia para unirse a la proteína PD-L1 (por ejemplo, proteína PD-L1 humana). El anticuerpo de referencia puede incluir LCDR1-3 y HCDR1-3, y la secuencia de aminoácidos de la LCDR1 puede incluir SEQ ID NO: 58 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 61 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 64 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR1 puede incluir SEQ ID NO: 47 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la HCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 48 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 52 o una variante de la misma. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia puede incluir el anticuerpo YN-039 o un anticuerpo con la misma LCDR1-3 y HCDR1-3 con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia incluye L-FR1-4 y H-FR1-4, y la secuencia de aminoácidos de la L-FR1 puede incluir SEQ ID NO: 71 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR2 puede incluir SEQ ID NO: 72 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR3 puede incluir SEQ ID NO: 75 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la L-FR4 puede incluir SEQ ID NO: 76 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la H-FR1 puede incluir SEQ ID NO: 67 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR2 puede incluir SEQ ID NO: 68 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la H-FR3 puede incluir SEQ ID NO: 69 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la H-FR4 puede incluir SEQ ID NO: 70 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede incluir el anticuerpo YN-039 o un anticuerpo con la misma LCDR1-3, HCDR1-3, L-FR1-4 y H-

FR1-4 con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia puede incluir una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera puede incluir SEQ ID NO: 41 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada puede incluir SEQ ID NO: 35 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo de referencia puede incluir el anticuerpo YN-039 o un anticuerpo que tiene la misma región variable de cadena ligera y región variable de cadena pesada con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia puede incluir una cadena ligera y una cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se puede mostrar en SEQ ID NO: 42 y la secuencia de aminoácidos de cadena pesada se puede mostrar en SEQ ID NO: 36. Por ejemplo, el anticuerpo de referencia puede incluir el anticuerpo YN-039 o tener la misma cadena ligera y cadena pesada con éste.

En la presente solicitud, la proteína PD-L1 es seleccionada del grupo que consta de proteína PD-L1 humana, proteína PD-L1 de mono y proteína PD-L1 murino.

En otro aspecto, la presente solicitud además proporciona un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno o una variante de la misma que se une a una proteína CD137 con una K_D de menos de 5×10^{-9} M (por ejemplo, una K_D de no mayor de aproximadamente 5×10^{-9} M, no mayor de aproximadamente 4×10^{-9} M, no mayor de aproximadamente 3×10^{-9} M, no mayor de aproximadamente 2×10^{-9} M, no mayor de aproximadamente 1×10^{-9} M o no mayor de aproximadamente 1×10^{-10} M o menos). Por ejemplo, se une a una proteína CD137 con una K_D de menos de 3×10^{-9} M.

El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede aliviar o tratar tumores. Por ejemplo, el tumor puede incluir cáncer de colon.

En la presente solicitud, el anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en anticuerpo monoclonal, anticuerpo de cadena sencilla, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado y anticuerpo completamente humano.

En la presente solicitud, el fragmento de unión al antígeno puede seleccionarse del grupo que consiste en el fragmento Fab, Fab', F(ab)₂ y Fv.

En la presente solicitud, la variante puede ser una secuencia de aminoácidos que tiene sustancialmente la misma función (por ejemplo, una capacidad de unirse específicamente al CD137) y tiene al menos 85% o más (por ejemplo, al menos aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% o más) de identidad de secuencia con la misma. En algunas modalidades, la variante de la secuencia de aminoácidos es una secuencia de aminoácidos que tiene sustancialmente la misma función (por ejemplo, una capacidad de unirse específicamente a CD137), y sobre la base

incluye además la adición, delección o sustitución de uno o más (por ejemplo, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10 o más) aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo puede incluir una cadena ligera de anticuerpo o un fragmento de la misma. Por ejemplo, la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma puede incluir LCDR1, y la LCDR1 puede incluir la siguiente secuencia de aminoácidos o una variante de la misma: SEQ ID NO: 80. Por ejemplo, la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma puede incluir LCDR2 que incluye la siguiente secuencia de aminoácidos o una variante de la misma: SEQ ID NO: 81. Para otro ejemplo, la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma incluye LCDR3 o una variante de la misma, y la LCDR3 puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 82.

En algunas modalidades, as al anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo, la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma incluye además regiones marco L-FR1, L-FR2, L-FR3 y L-FR4. Por ejemplo, el C-terminal de la L-FR1 está enlazado directa o indirectamente al N-terminal de la LCDR1, y la L-FR1 puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 89. La L-FR2 se encuentra entre la LCDR1 y la LCDR2, y la L-FR2 puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 90. La L-FR3 se encuentra entre la LCDR2 y la LCDR3, y la L-FR3 puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 91. El N-terminal de la L-FR4 está enlazado directa o indirectamente al C-terminal de la LCDR3, y la L-FR4 puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 92.

En algunas modalidades, as al anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo, la cadena ligera del anticuerpo o un fragmento de la misma incluye una región variable de cadena ligera VL, y la región variable de cadena ligera VL puede incluir la siguiente secuencia de aminoácidos o una variante de la misma: SEQ ID NO: 20.

En la presente solicitud, la cadena ligera del anticuerpo o un fragmento de la misma puede incluir además una región constante humana, y la región constante humana incluye una región constante Igλ humana.

En la presente solicitud, la cadena ligera o el fragmento de la misma del anticuerpo puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23.

En algunas modalidades, el anticuerpo puede incluir una cadena pesada de anticuerpo o un fragmento de la misma. La cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma incluye HCDR1, y la HCDR1 puede incluir la siguiente secuencia de aminoácidos o una variante de la misma: SEQ ID NO: 77. La cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma incluye HCDR2, y la HCDR2 puede incluir la siguiente secuencia de aminoácidos o una variante de la misma: SEQ ID NO: 78. La cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma incluye HCDR3, y la HCDR3 puede incluir la siguiente secuencia de aminoácidos o una variante de la misma: SEQ ID NO: 79.

En algunas modalidades, la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma puede incluir además regiones marco H-FR1, H-FR2, H-FR3 y H-FR4. El C-terminal de H-FR1 está enlazado directa o indirectamente al N-terminal de HCDR1, y la H-FR1 puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 84-85. La H-FR2 se encuentra entre la HCDR1 y la HCDR2, y la H-FR2 puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 86. La H-FR3 se encuentra entre la HCDR2 y la HCDR3, y la H-FR3 puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 87. El N-terminal de H-FR4 está enlazado directa o indirectamente al C-terminal de HCDR3, y la H-FR4 puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 88.

La cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma de la presente solicitud incluye una región variable de cadena pesada VH, y la región variable de cadena pesada VH puede incluir una secuencia de aminoácidos o una variante de la misma seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 25.

En el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud, la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma puede incluir además una región constante humana. Por ejemplo, la región constante humana puede incluir una región constante IgG humana. Por ejemplo, la región constante IgG humana puede incluir una región constante IgG1 humana.

En la presente solicitud, la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma puede incluir una secuencia de aminoácidos o una variante de la misma seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 27.

En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de la LCDR1 del anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede incluir SEQ ID NO: 80 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 81 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 82 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR1 puede incluir SEQ ID NO: 77 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la HCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 78 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 79 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-005 o un anticuerpo con la misma LCDR1-3 y HCDR1-3 con éste. En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede incluir SEQ ID NO: 20 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada puede incluir SEQ ID NO: 18 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-005 o un anticuerpo que tiene la misma región variable de cadena ligera y región

variable de cadena pesada con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede incluir una cadena ligera y una cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se puede mostrar en SEQ ID NO: 23 y la secuencia de aminoácidos de cadena pesada se puede mostrar en SEQ ID NO: 21. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-005 o tener la misma cadena ligera y cadena pesada con éste.

En algunas modalidades, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud compite con un anticuerpo de referencia para unirse a la proteína CD137 (por ejemplo, proteína CD137 humana). El anticuerpo de referencia puede incluir LCDR1-3 y HCDR1-3, y la secuencia de aminoácidos de la LCDR1 puede incluir SEQ ID NO: 80 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 81 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 82 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR1 puede incluir SEQ ID NO: 77 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la HCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 78 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 79 o una variante de la misma. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia puede incluir el anticuerpo YN-005 o un anticuerpo con la misma LCDR1-3 y HCDR1-3 con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia puede incluir una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera puede incluir SEQ ID NO: 20 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada puede incluir SEQ ID NO: 18 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo de referencia puede incluir el anticuerpo YN-005 o un anticuerpo que tiene la misma región variable de cadena ligera y región variable de cadena pesada con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia puede incluir una cadena ligera y una cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se puede mostrar en SEQ ID NO: 23 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada se puede mostrar en SEQ ID NO: 21. Por ejemplo, el anticuerpo de referencia puede incluir el anticuerpo YN-005 o tener la misma cadena ligera y cadena pesada con éste.

En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de la LCDR1 del anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede incluir SEQ ID NO: 80 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 81 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 82 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR1 puede incluir SEQ ID NO: 77 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la HCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 78 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 79 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la

variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-006 o un anticuerpo con la misma LCDR1-3 y HCDR1-3 con éste. En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede incluir SEQ ID NO: 20 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada puede incluir SEQ ID NO: 25 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-006 o un anticuerpo que tiene la misma región variable de cadena ligera y región variable de cadena pesada con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede incluir una cadena ligera y una cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se puede mostrar en SEQ ID NO: 23 y la secuencia de aminoácidos de cadena pesada se puede mostrar en SEQ ID NO: 27. Por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo puede incluir el anticuerpo YN-006 o tener la misma cadena ligera y cadena pesada con éste.

En algunas modalidades, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud compite con un anticuerpo de referencia para unirse a la proteína CD137 (por ejemplo, proteína CD137 humana). El anticuerpo de referencia puede incluir LCDR1-3 y HCDR1-3, y la secuencia de aminoácidos de la LCDR1 puede incluir SEQ ID NO: 80 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 81 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 82 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR1 puede incluir SEQ ID NO: 77 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la HCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 78 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 79 o una variante de la misma. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia puede incluir el anticuerpo YN-006 o un anticuerpo con la misma LCDR1-3 y HCDR1-3 con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia puede incluir una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera puede incluir SEQ ID NO: 20 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada puede incluir SEQ ID NO: 25 o una variante de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo de referencia puede incluir el anticuerpo YN-006 o un anticuerpo que tiene la misma región variable de cadena ligera y región variable de cadena pesada con éste. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia puede incluir una cadena ligera y una cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se puede mostrar en SEQ ID NO: 23 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada se puede mostrar en SEQ ID NO: 27. Por ejemplo, el anticuerpo de referencia puede incluir el anticuerpo YN-006 o tener la misma cadena ligera y cadena pesada con éste.

En la presente solicitud, la proteína CD137 puede incluir una proteína CD137 humana.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona además un anticuerpo biespecífico que se une a una proteína PD-L1 a una K_D de menos de 2×10^{-9} M (por ejemplo, una K_D de no más de aproximadamente 2×10^{-9} M, no mayor de aproximadamente 1×10^{-9} M, no mayor de aproximadamente 1×10^{-10} M o no mayor de aproximadamente 8×10^{-11} M o menos), y se une a una proteína CD137 con una K_D de menos de 8×10^{-9} M (por ejemplo, una K_D no mayor de aproximadamente 8×10^{-9} M, no mayor de aproximadamente 7×10^{-9} M, no mayor de aproximadamente 6×10^{-9} M, no mayor de aproximadamente 5×10^{-9} M, no mayor de aproximadamente 4×10^{-9} M, no mayor de aproximadamente 3×10^{-9} M, no mayor de aproximadamente 2×10^{-9} M, no mayor de aproximadamente 1×10^{-9} M o no mayor de aproximadamente 1×10^{-10} M o menos).

En la presente solicitud, la proteína PD-L1 se selecciona del grupo que consiste en proteína PD-L1 humana, proteína PD-L1 de mono y proteína PD-L1 murino; y la proteína CD137 incluye una proteína CD137 humana.

En la presente solicitud, el anticuerpo biespecífico incluye un primer resto de direccionamiento que se une específicamente a la proteína PD-L1, en el que el primer radical de direccionamiento puede incluir el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo que se une al PD-L1.

Por ejemplo, el fragmento de unión a antígeno en el primer resto de direccionamiento puede seleccionarse del grupo que consiste en el fragmento Fab, Fab', F(ab)₂ y Fv. Para otro ejemplo, la variante en el primer resto de direccionamiento puede seleccionarse del grupo que consiste en una proteína o polipéptido que experimenta la sustitución, delección o adición de uno o más aminoácidos en el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y una proteína o polipéptido que tiene 85% o más (por ejemplo, al menos aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99% o más) de identidad de secuencia con el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo. El anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo puede ser el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo que se une a la proteína PD-L1.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une a la proteína PD-L1 en el anticuerpo biespecífico puede incluir una cadena ligera o un fragmento de la misma. Por ejemplo, la cadena ligera o el fragmento de la misma incluye LCDR1-3, y la secuencia de aminoácidos de la LCDR1 es SEQ ID NO: 54-58; la secuencia de aminoácidos de la LCDR2 es SEQ ID NO: 60-61; y la secuencia de aminoácidos de la LCDR3 es seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 63-64. En algunas modalidades, la cadena ligera o el fragmento de la misma puede incluir una región variable de cadena

ligera, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera se puede seleccionar del grupo que consta de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 41. En algunas modalidades, la cadena ligera o el fragmento del mismo del anticuerpo puede incluir una región constante humana, y la región constante humana incluye una región constante Igλ humana.

En algunas modalidades, la cadena ligera o el fragmento de la misma puede incluir una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 42.

En algunas modalidades, el anticuerpo de unión a la proteína PD-L1 puede incluir una cadena pesada o un fragmento de la misma. Por ejemplo, la cadena pesada o el fragmento de la misma incluye HCDR1-3, y la secuencia de aminoácidos de la HCDR1 es seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 46-47; la secuencia de aminoácidos de la HCDR2 es SEQ ID NO: 48; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR3 es SEQ ID NO: 50-52.

En algunas modalidades, la cadena pesada o el fragmento de la misma puede incluir una región variable de cadena pesada, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada se puede seleccionar del grupo que consta de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 35.

En algunas modalidades, la cadena pesada o el fragmento de la misma puede incluir además una región constante humana, y la región constante humana puede incluir una región constante IgG humana. Por ejemplo, la región constante IgG humana es una región constante IgG1 humana.

En algunas modalidades, la cadena pesada o el fragmento de la misma puede incluir una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 36.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico incluye un segundo resto de dirección que se une específicamente a la proteína CD137, en el que el segundo radical de dirección puede incluir un anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo que se une a la proteína CD137. En algunas modalidades, el fragmento de unión al antígeno se selecciona del grupo que consiste en el fragmento Fab, Fab', F(ab)₂ y Fv. En algunas modalidades, la variante se selecciona del grupo que consiste en una proteína o polipéptido que experimenta la sustitución, delección o adición de uno o más aminoácidos en el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo; y una proteína o polipéptido que tiene 85% o más (por ejemplo, al menos aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99% o más) de identidad de secuencia con el

anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une a la proteína CD137 puede incluir una cadena ligera o un fragmento de la misma. Por ejemplo, la cadena ligera o el fragmento de la misma incluye LCDR1-3, y la secuencia de aminoácidos de la LCDR1-3 pueden ser secuencialmente
 5 SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81 y SEQ ID NO: 82. En algunas modalidades, la cadena ligera o el fragmento de la misma puede incluir una región variable de cadena ligera, y la región variable de cadena ligera incluye una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 20.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une a la proteína CD137 puede incluir una cadena pesada o un fragmento de la misma. En algunas modalidades, la cadena pesada o el
 10 fragmento de la misma del anticuerpo puede incluir HCDR1-3, y las secuencias de aminoácidos de la HCDR1-3 puede ser secuencialmente SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78 y SEQ ID NO: 79. En algunas modalidades, la cadena pesada o el fragmento de la misma del anticuerpo puede incluir una región variable de cadena pesada, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada se puede seleccionar del grupo que consta de SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 25.

15 En algunas modalidades, el anticuerpo que se une a la proteína CD137 puede incluir un scFv, y el scFv puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 83.

En la presente solicitud, el anticuerpo biespecífico puede incluir una primera cadena polipeptídica y una segunda cadena polipeptídica, en la que la primera cadena polipeptídica puede incluir la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína PD-L1, la región
 20 variable de la cadena pesada de el anticuerpo que se une a la proteína CD137 y la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que se une a la proteína CD137; y la segunda cadena polipeptídica puede incluir la región variable de cadena ligera del anticuerpo que se une a la proteína PD-L1.

Por ejemplo, en la primera cadena polipeptídica, la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína PD-L1 puede estar ubicada en el N-terminal de la región
 25 variable de la cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína CD137, y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína CD137 puede estar ubicada en el N-terminal de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que se une a la proteína CD137. Por otro ejemplo, en la primera cadena polipeptídica, la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína PD-L1 puede estar ubicada en el N-terminal de la región variable de la cadena
 30 ligera del anticuerpo que se une a la proteína CD137, y la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que se une a la proteína CD137 puede estar ubicada en el N-terminal de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína CD137.

Por ejemplo, en la primera cadena polipeptídica, la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que se une a la proteína CD137 y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo
 35 que se une a la proteína CD137 constituyen scFv. Por ejemplo, scFv puede incluir una secuencia de

aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 83.

La primera cadena polipeptídica puede incluir además una región constante de IgG humana. Por ejemplo, la región constante de IgG humana puede ser una región constante de IgG1 humana.

5 En algunas modalidades, la región constante de IgG humana puede estar ubicada en el extremo C de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína PD-L1 y puede ubicarse en el N-terminal de la región variable de la cadena ligera de el anticuerpo que se une a la proteína CD137; Alternativamente, la región constante de IgG humana puede estar ubicada en el C-terminal de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína PD-L1 y
10 puede ubicarse en el N-terminal de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína CD137.

En algunas modalidades, la primera cadena polipeptídica puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44.

En algunas modalidades, la segunda cadena polipeptídica puede incluir además una
15 región constante Igλ humana.

En la presente solicitud, la segunda cadena polipeptídica puede incluir la siguiente secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 15 y la SEQ ID NO: 34.

Por ejemplo, en el primer resto de dirección del anticuerpo biespecífico de la presente solicitud, la secuencia de aminoácidos de la LCDR1 se puede seleccionar del grupo que consta de SEQ
20 ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR2 se puede seleccionar del grupo que consta de SEQ ID NO: 60 y SEQ ID NO: 61 o una variante del mismo; la secuencia de aminoácidos de la LCDR3 se puede seleccionar del grupo que consiste en SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 64 o una variante del mismo; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR1 se puede seleccionar del grupo que consiste en SEQ ID
25 NO: 46 y SEQ ID NO: 47 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la HCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 48 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR3 se puede seleccionar del grupo que consta de SEQ ID NO: 50-52 o una variante de la misma. En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud se puede seleccionar
30 del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 41 o una variante del mismo; y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada se puede seleccionar del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 35 o una variante de la misma. En algunas modalidades, el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede incluir una
35 cadena ligera y una cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera puede ser una

secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 42, y la secuencia de aminoácidos de cadena pesada puede ser una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 36.

5 Por ejemplo, en el segundo grupo de direccionamiento del anticuerpo biespecífico de la presente solicitud, la secuencia de aminoácidos de la LCDR1 puede incluir SEQ ID NO: 80 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 81 o una variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la LCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 82 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR1 puede incluir SEQ ID NO: 77 o una
10 variante de la misma; la secuencia de aminoácidos de la HCDR2 puede incluir SEQ ID NO: 78 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de la HCDR3 puede incluir SEQ ID NO: 79 o una variante de la misma. En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede incluir SEQ ID NO: 20 o una variante de la misma; y la secuencia de aminoácidos de
15 la región variable de cadena pesada puede ser aquella seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 25 o sus variantes. En algunas modalidades, el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de la presente solicitud puede incluir una cadena ligera y una cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se puede mostrar en SEQ ID NO: 23 y la secuencia de aminoácidos de cadena pesada se puede mostrar en SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO:
20 27.

Por ejemplo, en el anticuerpo biespecífico de la presente solicitud, el primer polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 30, y el segundo polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 15. El anticuerpo biespecífico puede incluir el anticuerpo YN-007 o un anticuerpo con el mismo primer polipeptido y segundo
25 polipeptido, en donde, el primer polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 25, una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 20 y una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13; y el segundo polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 15.

Para otro ejemplo, en el anticuerpo biespecífico de la presente solicitud, el primer
30 polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 43, y el segundo polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 34. El anticuerpo biespecífico puede incluir el anticuerpo YN-051 o un anticuerpo con el mismo primer polipeptido y segundo polipeptido. En donde, el primer polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 25, una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 20 y una
35 secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 32; y el segundo polipéptido puede incluir una

secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 34.

Para otro ejemplo, en el anticuerpo biespecífico de la presente solicitud, el primer polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 44, y el segundo polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 34. El anticuerpo biespecífico puede incluir el anticuerpo YN-052 o un anticuerpo con el mismo primer polipeptido y segundo polipeptido. En donde, el primer polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 25, una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 20 y una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 36; y el segundo polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 34.

Por ejemplo, en el anticuerpo biespecífico de la presente solicitud, el primer polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 30, y el segundo polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 15. El anticuerpo biespecífico puede incluir el anticuerpo YN-007 o un anticuerpo con el mismo primer polipeptido y segundo polipeptido. En donde, el primer polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 27, una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23 y una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13; y el segundo polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 15.

Para otro ejemplo, en el anticuerpo biespecífico de la presente solicitud, el primer polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 43, y el segundo polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 34. El anticuerpo biespecífico puede incluir el anticuerpo YN-051 o un anticuerpo con la misma primer polipeptido y segundo polipeptido. En donde, el primer polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 32, una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 27, una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23; y el segundo polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 34.

Para otro ejemplo, en el anticuerpo biespecífico de la presente solicitud, el primer polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 44, y el segundo polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 34. El anticuerpo biespecífico puede incluir el anticuerpo YN-052 o un anticuerpo con el mismo primer polipeptido y segundo polipeptido. En donde, el primer polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 36, una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 27, una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23; y el segundo polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 34.

Ácido nucleico, vector, célula hospedera y método de preparación

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona además una o más moléculas de

ácido nucleico aisladas que pueden codificar el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo, o el anticuerpo biespecífico de la presente solicitud. Por ejemplo, cada molécula de ácido nucleico de una o más moléculas de ácido nucleico puede codificar el anticuerpo completo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, o codificar una porción del mismo (por ejemplo, uno o más de HCDR1-3, LCDR1-3, VL, VH, cadena ligera o cadena pesada).

La molécula de ácido nucleico de la presente solicitud puede aislarse. Por ejemplo, puede producirse o sintetizarse mediante los siguientes métodos: (i) amplificación in vitro, como amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), (ii) recombinación clonal, (iii) purificación, como fraccionamiento por digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel, o (iv) síntesis, tal como, por síntesis química. En algunas modalidades, el ácido nucleico aislado es una molécula de ácido nucleico preparada mediante la tecnología del ADN recombinante.

En la presente solicitud, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo puede prepararse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, que incluyen, entre otros, PCR de extensión solapada utilizando la operación de fragmentos de restricción u oligonucleótidos sintéticos. Para operaciones específicas, consulte Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; y Ausube, et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York N.Y., 1993.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona uno o más vectores e incluye una o más moléculas de ácido nucleico de la presente solicitud. Cada vector puede incluir una o más de las moléculas de ácido nucleico. Además, el vector puede incluir además otros genes, tales como genes marcadores que permitan seleccionar este vector en una célula hospedera apropiada y en condiciones apropiadas. Además, el vector puede incluir además un elemento de control de la expresión que permite que la región codificante se exprese correctamente en una célula hospedera apropiada. Dichos elementos de control son bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, pueden incluir promotores, sitios de unión a ribosomas, potenciadores y otros elementos de control para regular la transcripción de genes o la traducción de ARNm, etc. En algunas modalidades, la secuencia de control de expresión es un elemento regulador. La estructura específica de la secuencia de control de la expresión puede variar según la función de la especie o los tipos de células, pero normalmente incluye la secuencia 5' no transcrita y la secuencia 5' y 3' no traducida implicada en el inicio de la transcripción y traducción, como caja TATA, secuencia rematada, secuencia CAAT, etc. Por ejemplo, la secuencia de control de la expresión 5' no transcrita puede incluir la región promotora que puede incluir una secuencia promotora para el control transcripcional del ácido nucleico funcionalmente unido. Una o más moléculas de ácido nucleico descritas en la presente solicitud pueden unirse operativamente al elemento de control de la expresión.

El vector puede incluir, por ejemplo, plásmido, cósmido, virus, fago u otros vectores comúnmente usados en ingeniería genética, por ejemplo, el vector es un vector de expresión.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona una célula, que puede incluir la molécula de ácido nucleico de la presente solicitud y/o el vector descrito en la presente solicitud. La
 5 célula puede ser una célula hospedera. En algunas modalidades, cada célula hospedera puede incluir una molécula de ácido nucleico o un vector descrito en la presente solicitud. En algunas modalidades, cada célula hospedera puede incluir múltiples (por ejemplo, dos o más) moléculas de ácido nucleico o vectores descritos en la presente solicitud. Por ejemplo, el vector de la presente solicitud puede introducirse en la célula hospedera, por ejemplo, una célula eucariota, por ejemplo, una célula derivada
 10 de plantas, células de hongos o levaduras, etc. El vector de la presente solicitud puede introducirse en la célula hospedera mediante métodos conocidos en la técnica, tales como electroporación, transfección con lipofectina, transfección con lipofectamina y similares.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona una o más células hospederas, que incluyen la molécula de ácido nucleico o el vector.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona un método para preparar el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo, o el anticuerpo biespecífico. El método puede incluir cultivar la célula hospedera de la presente solicitud en condiciones que permitan que se exprese el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o variante del mismo, o el anticuerpo biespecífico, y opcionalmente recolectar el anticuerpo, fragmento de unión al antígeno o variante del
 15 mismo. Por ejemplo, es posible utilizar un medio apropiado, una temperatura apropiada, un tiempo de cultivo, etc., y estos métodos son entendidos por los expertos en la técnica.

Composición farmacéutica, uso

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona una composición farmacéutica que puede incluir el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo, o el anticuerpo biespecífico, la molécula de ácido nucleico, el vector y/o la célula hospedera y, opcionalmente, un
 25 adyuvante aceptable farmacéuticamente.

El adyuvante farmacéuticamente aceptable puede incluir tampones, antioxidantes, conservantes, polipéptidos de bajo peso molecular, proteínas, polímeros hidrófilos, aminoácidos, azúcares, quelantes, contraiones, complejos metálicos y/o tensoactivos no iónicos y similares.

En la presente solicitud, la composición farmacéutica se puede formular para administración oral, administración intravenosa, administración intramuscular, administración in situ en el sitio del tumor, inhalación, administración rectal, administración vaginal, administración transdérmica o administración vía depósito subcutáneo.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona el uso del anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo, o el anticuerpo biespecífico, la molécula de ácido nucleico,
 35

el vector, la célula hospedera y/o la composición farmacéutica en la fabricación de un fármaco para aliviar o tratar tumores. Entre otros, los tumores incluyen cáncer de colon.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona un método para mejorar la función de las células T, incluida la administración del anticuerpo que se une a la proteína PD-L1, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo, el anticuerpo que se une a la proteína CD137, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo, o el anticuerpo biespecífico, la molécula de ácido nucleico, el vector, la célula hospedera y/o la composición farmacéutica a un sujeto que lo necesite. De ellos, las células T son células T disfuncionales asociadas a tumores.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona un método para inhibir la unión de la proteína PD-L1 a la proteína PD-1 que incluye administrar el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo, o el anticuerpo biespecífico, la molécula de ácido nucleico, la vector, la célula hospedera y/o la composición farmacéutica a un sujeto que lo necesite.

En la presente solicitud, la posición del anticuerpo CDR puede determinarse de acuerdo con el método de definición de anticuerpo de Kabat.

La presente solicitud incluye además las siguientes modalidades:

1. Un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno o una variante del mismo que se une a una proteína PD-L1 con una K_D de 3×10^{-9} M o menos.

2. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con la modalidad 1, que se une a una proteína PD-L1 con una K_D de 8×10^{-11} M o menos.

3. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 1-2, que inhibe la unión de PD-L1 a PD-1.

4. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 1-3, es capaz de aliviar o tratar enfermedades asociadas a tumores.

5. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con la modalidad 4, en donde el tumor incluye cáncer de colon.

6. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 1-5, en donde el anticuerpo es seleccionada del grupo que consta de anticuerpo monoclonal, anticuerpo de cadena sencilla, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado y anticuerpo completamente humano.

7. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 1-6, en donde el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consta del fragmento Fab, Fab', F(ab)₂ y Fv.

8. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 1-7, en donde la variante es seleccionada del grupo

que consta de:

1) una proteína o polipéptido obtenido por sustitución, delección o adición de uno o más aminoácidos en el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno; y

2) una proteína o polipéptido que tiene 90% o más de identidad de secuencia como el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno.

9. El anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 1-8, que compite con un anticuerpo de referencia que se une a la proteína PD-L1, en el que el anticuerpo de referencia incluye una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, la región variable de la cadena ligera del anticuerpo de referencia incluye LCDR1-3, la región variable de la cadena ligera del anticuerpo de referencia incluye LCDR1-3, y la LCDR1 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 54-58; la LCDR2 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 60-61; y la LCDR3 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 63-64; y la región variable de cadena pesada del anticuerpo de referencia incluye HCDR1-3, la HCDR1 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 46-47; la HCDR2 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 48; y la HCDR3 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 50-52.

10. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con la modalidad 9, en donde la región variable de cadena ligera del anticuerpo de referencia incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 41, y la región variable de cadena pesada del anticuerpo de referencia incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 35.

11. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 9-10, en donde la cadena ligera del anticuerpo de referencia incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 42; y la cadena pesada del anticuerpo de referencia incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 36.

12. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con las modalidades 1-11, en donde el anticuerpo incluye una cadena ligera de anticuerpo o un fragmento de la misma que incluye a LCDR1, y la LCDR1 incluye una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 53: TGTX₁SX₂VGGYX₃X₄VS; en donde X₁ es S, R o V; X₂ es D, E o S; X₃ es N o R; X₄ es Y o E, y en donde la LCDR1 se determina de acuerdo al índice del número Kabat del

anticuerpo.

13. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con la modalidad 12, en donde la LCDR1 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 54-58.

5 14. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 11-13, en donde la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma incluye una LCDR2 que incluye una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 59: X_1NSX_2RPS , en donde X_1 es G o E; X_2 es N o I, y en donde la LCDR2 se determina de acuerdo al índice del número Kabat del anticuerpo.

10 15. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con la modalidad 14, en donde la LCDR2 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 60-61.

15 16. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 11-15, en donde la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma incluye una LCDR3 que incluye una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 62: $QSYDSSLGX_1V$, en donde X_1 es S o T, y en donde la LCDR3 se determina de acuerdo al índice del número Kabat del anticuerpo.

20 17. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 11-16, en donde la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma incluye además regiones marco L-FR1, L-FR2, L-FR3, y L-FR4.

18. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con la modalidad 17, en donde las regiones marco se seleccionan del grupo que consta de secuencias de marco consenso humanas y secuencias de línea germinal humana.

25 19. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 17-18, en donde el C-terminal de la L-FR1 está enlazado directa o indirectamente al N-terminal de la LCDR1, y la L-FR1 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 71.

30 20. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 17-19, en donde la L-FR2 se encuentra entre la LCDR1 y la LCDR2, y la L-FR2 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 72.

35 21. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 17-20, en donde la L-FR3 se encuentra entre la LCDR2 y la LCDR3, y la L-FR3 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 73-75.

22. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 17-21, en donde el N-terminal de la L-FR4 está enlazado directa o indirectamente al C-terminal de la LCDR3, y la L-FR4 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 76.
- 5 23. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 12-22, en donde la cadena ligera del anticuerpo o un fragmento de la misma incluye una región variable de cadena ligera VL, y la región variable de cadena ligera VL incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 41.
- 10 24. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 12-23, en donde la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma incluye además una región constante humana, y la región constante humana incluye una región constante Igλ humana.
- 15 25. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 12-24, en donde la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 42.
- 20 26. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 1-25, en donde el anticuerpo incluye una cadena pesada de anticuerpo o un fragmento de la misma que incluye HCDR1, y la HCDR1 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de aquellas mostradas en SEQ ID NO: 45: X₁Y₁AIS, en donde X₁ es S o T, y en donde la HCDR1 se determina de acuerdo al índice del número Kabat del anticuerpo.
- 25 27. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con la modalidad 26, en donde la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma incluye HCDR2, la HCDR2 incluye una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 48, y en donde la HCDR2 se determina de acuerdo al índice del número Kabat del anticuerpo.
- 30 28. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 26-27, en donde la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma incluye HCDR3, y la HCDR3 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de aquella mostrada en SEQ ID NO: 49: TMX₁X₂YX₃X₄GNX₅DY, en donde X₁ es D, E o G, X₂ es G o E, X₃ es S o G, X₄ es Y o F, X₅ es F o Y, y en donde la HCDR3 se determina de acuerdo al índice del número Kabat del anticuerpo.
- 35 29. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con la modalidad 28, en donde la HCDR3 incluye una secuencia de aminoácidos

seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 50-52.

30. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 26-29, en donde la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma incluye además regiones marco H-FR1, H-FR2, H-FR3, y H-FR4.

5 31. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con la modalidades 30, en donde las regiones marco se seleccionan del grupo que consta de secuencias de marco consenso humanas y secuencias de línea germinal humana.

32. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 30-31, en donde el C-terminal de H-FR1 está enlazado directa o indirectamente al N-terminal de HCDR1, y la H-FR1 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 65-67.

33. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 30-32, en donde la H-FR2 se encuentra entre la HCDR1 y la HCDR2, y la H-FR2 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 68.

34. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 30-33, en donde la H-FR3 se encuentra entre la HCDR2 y la HCDR3, y la H-FR3 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 69.

20 35. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 30-34, en donde el N-terminal de H-FR4 está enlazado directa o indirectamente al C-terminal de HCDR3, y la H-FR4 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 70.

25 36. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 26-35, en donde la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma incluye una región variable de cadena pesada VH, y la región variable de cadena pesada VH incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 35.

30 37. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 26-36, en donde la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma incluye además una región constante humana, y la región constante humana incluye una región constante IgG1 humana.

35 38. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 26-37, en donde la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de

SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 36.

39. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 1-38, en donde la proteína PD-L1 es seleccionada del grupo que consta de proteína PD-L1 humana, proteína PD-L1 de mono y proteína PD-L1 murino.

5 40. Un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno o una variante del mismo que se une a una proteína CD137 con una K_D de 5×10^{-9} M o menos.

41. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con la modalidad 40, que se une a una proteína CD137 con una K_D de 3×10^{-9} M o menos.

10 42. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 40-41, que tiene una actividad agonística de CD137.

43. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 40-42, es capaz de aliviar o tratar tumores.

44. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con la modalidad 43, en donde el tumor incluye cáncer de colon.

15 45. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 40-44, en donde el anticuerpo es seleccionada del grupo que consta de anticuerpo monoclonal, anticuerpo de cadena sencilla, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado y anticuerpo completamente humano.

20 46. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 40-45, en donde el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consta del fragmento Fab, Fab', F(ab)₂ y Fv.

47. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 40-46, en donde la variante es seleccionada del grupo que consta de:

25 1) una proteína o polipéptido obtenido por sustitución, delección o adición de uno o más aminoácidos en el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo; y

2) una proteína o polipéptido que tiene 90% o más de identidad de secuencia como el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo.

30 48. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 40-47, que compite con un anticuerpo de referencia para unirse a la proteína CD137, en donde el anticuerpo de referencia incluye una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, la región variable de cadena ligera del anticuerpo de referencia incluye LCDR1-3, y la secuencia de aminoácidos de la LCDR1 -3 se muestran secuencialmente en SEQ ID NO: 80-82, y la región variable de cadena pesada del anticuerpo de
35 referencia incluye HCDR1-3, y las secuencias de aminoácidos de la HCDR1-3 se muestran

secuencialmente en SEQ ID NO: 77-79.

49. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con la modalidad 48, en donde la región variable de cadena ligera del anticuerpo de referencia incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de aquella mostrada en SEQ ID NO: 20, y la región variable de cadena pesada del anticuerpo de referencia incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de aquellas mostradas en SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 25.

50. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 48-49, en donde la cadena ligera del anticuerpo de referencia incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de aquella mostrada en SEQ ID NO: 23; y la cadena pesada del anticuerpo de referencia incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de aquellas mostradas en SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 27.

51. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 40-50, en donde el anticuerpo incluye una cadena ligera de anticuerpo o un fragmento de la misma.

52. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con la modalidad 51, en donde la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma incluye a LCDR1, y la LCDR1 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de aquella mostrada en SEQ ID NO: 80.

53. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 51-52, en donde la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma incluye LCDR2, y la LCDR2 incluye una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 81.

54. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 51-53, en donde la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma incluye LCDR3, y la LCDR3 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de aquella mostrada en SEQ ID NO: 82.

55. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 51-54, en donde la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma incluye además regiones marco L-FR1, L-FR2, L-FR3 y L-FR4.

56. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con la modalidad 55, en donde las regiones marco se seleccionan del grupo que consta de secuencias de marco consenso humanas y secuencias de línea germinal humana.

57. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 55-56, en donde el C-terminal de la L-FR1 está enlazado directa o indirectamente al N-terminal de la LCDR1, y la L-FR1 incluye una secuencia de

aminoácidos seleccionada de aquella mostrada en SEQ ID NO: 89.

58 El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 55-57, en donde la L-FR2 se encuentra entre la LCDR1 y la LCDR2, y la L-FR2 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de aquella mostrada en
5 SEQ ID NO: 90.

59. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 55-58, en donde la L-FR3 se encuentra entre la LCDR2 y la LCDR3, y la L-FR3 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de aquella mostrada en
SEQ ID NO: 91.

10 60. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 55-59, en donde el N-terminal de la L-FR4 está enlazado directa o indirectamente al C-terminal de la LCDR3, y la L-FR4 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de aquella mostrada en SEQ ID NO: 92.

61. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 51-60, en donde la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma incluye una región variable de cadena ligera VL, y la región variable de cadena ligera VL incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de aquella mostrada en SEQ ID NO: 20.
15

62. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 51-61, en donde la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma incluye además una región constante humana y la región constante humana incluye una región constante Igλ humana.
20

63. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 51-62, en donde la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de la misma incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de aquella mostrada en
25 SEQ ID NO: 23.

64. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 40-63, en donde el anticuerpo incluye una cadena pesada de anticuerpo o un fragmento de la misma.

65. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con la modalidad 64, en donde la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma incluye una HCDR1, y la HCDR1 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de aquella mostrada en SEQ ID NO: 77.
30

66. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 64-65, en donde la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma incluye una HCDR2, y la HCDR2 incluye una secuencia de aminoácidos
35

seleccionada de aquella mostrada en SEQ ID NO: 78.

67. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 64-66, en donde la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma incluye una HCDR3, y la HCDR3 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de aquella mostrada en SEQ ID NO: 79.

68. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 64-67, en donde la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma incluye además regiones marco H-FR1, H-FR2, H-FR3 y H-FR4.

69. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con la modalidad 68, en donde las regiones marco se seleccionan del grupo que consta de secuencias de marco consenso humanas y secuencias de línea germinal humana.

70. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 68-69, en donde el C-terminal de H-FR1 está enlazado directa o indirectamente al N-terminal de HCDR1, y la H-FR1 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de aquella mostrada en SEQ ID NO: 84-85.

71. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 68-70, en donde la H-FR2 se encuentra entre la HCDR1 y la HCDR2, y la H-FR2 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de aquella mostrada en SEQ ID NO: 86.

72. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 68-71, en donde la H-FR3 se encuentra entre la HCDR2 y la HCDR3, y la H-FR3 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de aquella mostrada en SEQ ID NO: 87.

73. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 68-72, en donde el N-terminal de H-FR4 está enlazado directa o indirectamente al C-terminal de HCDR3, y la H-FR4 incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de aquella mostrada en SEQ ID NO: 88.

74. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 68-73, en donde la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma incluye una región variable de cadena pesada VH, y la región variable de cadena pesada VH incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de aquella mostrada en SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 25.

75. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 64-74, en donde la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma incluye además una región constante humana, y la región constante humana

incluye una región constante IgG humana.

76. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con la modalidad 75, en donde la región constante IgG incluye una región constante IgG1 humana.

5 77. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 64-76, en donde la cadena pesada de anticuerpo o el fragmento de la misma incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de aquella mostrada en SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 27.

10 78. El anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 40-77, en donde la proteína CD137 incluye una proteína CD137 humana.

79. Un anticuerpo biespecífico que se une a una proteína PD-L1 con una K_D de 2×10^{-9} M o menos y se une a una proteína CD137 a una K_D de 8×10^{-9} M o menos.

15 80. El anticuerpo biespecífico de conformidad con las modalidades 30 que incluye un primer radical de direccionamiento que se une específicamente a la proteína PD-L1, en donde el primer radical de direccionamiento incluye el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 1-39.

20 81. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las modalidades 30-31 que incluye un segundo radical de direccionamiento que se une específicamente a la proteína CD137, en donde el segundo radical de direccionamiento incluye el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo de conformidad con cualquiera de las modalidades 40-78.

25 82. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las modalidades 79-81 que incluye una primera cadena de polipéptido y una segunda cadena de polipéptido, en donde la primera cadena polipeptídica incluye la región variable de cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína PD-L1, la región variable de cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína CD137, y la región variable de cadena ligera del anticuerpo que se une a la proteína CD137; y la segunda cadena polipeptídica incluye la región variable de cadena ligera del anticuerpo que se une a la proteína PD-L1.

30 83. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la modalidad 82, en donde en la primera cadena polipeptídica, la región variable de cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína PD-L1 se encuentra en el N-terminal de la región variable de cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína CD137, y la región variable de cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína CD137 se encuentra en el N-terminal de la región variable de cadena ligera del anticuerpo que se une a la proteína CD137; alternativamente, la región variable de cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína PD-L1 se encuentra en el N-terminal de la región variable de cadena ligera

35

del anticuerpo que se une a la proteína CD137, y la región variable de cadena ligera del anticuerpo que se une a la proteína CD137 se encuentra en el N-terminal de la región variable de cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína CD137.

84. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las modalidades 82-83, en donde la región variable de cadena ligera del anticuerpo que se une a la proteína CD137 y la región variable de cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína CD137 en la primera cadena polipeptídica constituye scFv.

85. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las modalidades 82-84, en donde la primera cadena polipeptídica incluye además una región constante IgG humana, y la región constante IgG humana se encuentra en el C-terminal de la región variable de cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína PD-L1 y se encuentra en el N-terminal de la región variable de cadena ligera del anticuerpo que se une a la proteína CD137; alternatively, la región constante IgG humana se encuentra en el C-terminal de la región variable de cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína PD-L1 y se encuentra en el N-terminal de la región variable de cadena pesada del anticuerpo que se une a la proteína CD137.

86. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las modalidades 82-85, en donde la primera cadena polipeptídica incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44.

87. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las modalidades 82-86, en donde la segunda cadena polipeptídica incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 34.

88. Una o más moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de cualquiera de las modalidades 1-39, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de cualquiera de las modalidades 40-78, o el anticuerpo biespecífico de cualquiera de las modalidades 79-87.

89. A vector que incluye la molécula de ácido nucleico de conformidad con la modalidad 88.

90. Una célula que incluye la molécula de ácido nucleico de conformidad con la modalidad 88 o el vector de conformidad con la modalidad 89.

91. Un método para preparar el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de cualquiera de las modalidades 1-39, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de cualquiera de las modalidades 40-78, o el anticuerpo biespecífico de cualquiera de las modalidades. 79-87, incluido el cultivo de la célula según la modalidad 90 en condiciones que permitan la expresión del anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de cualquiera de las modalidades 1-39, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o

la variante del mismo de cualquier de las modalidades 40-78, o el anticuerpo biespecífico de cualquiera de las modalidades 79-87.

5 92. Una composición farmacéutica que incluye el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de cualquiera de las modalidades 1-39, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de cualquiera de las modalidades 40-78, o el anticuerpo biespecífico de cualquiera de modalidades 79-87, la molécula de ácido nucleico de la modalidad 88, el vector de la modalidad 89 y/o la célula de las modalidades 90 y, opcionalmente, un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

10 93. Uso del anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de cualquiera de las modalidades 1-39, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de cualquiera de las modalidades 40-78, o el anticuerpo biespecífico de cualquiera de las modalidades 79- 87, la molécula de ácido nucleico de la modalidad 88, el vector de la modalidad 89, la célula de la modalidad 90 y/o la composición farmacéutica de la modalidad 92 en la fabricación de un fármaco para aliviar o tratar tumores.

15 94. Uso de acuerdo con la modalidad 93, en el que el tumor incluye cáncer de colon.

20 95. Un método para inhibir la unión de la proteína PD-L1 a la proteína PD-1, que incluye la administración del anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de cualquiera de las modalidades 1-39, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de cualquiera de las modalidades 40-78, o el anticuerpo biespecífico de cualquiera de las modalidades 79-87, la molécula de ácido nucleico de la modalidad 88, el vector de la modalidad 89, la célula de la modalidad 90 y/o la composición farmacéutica de las modalidades 92.

25 96. Un método para mejorar la función de las células T, que incluye la administración del anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de cualquiera de las modalidades 1-39, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la variante del mismo de cualquiera de las modalidades 40-78, o el anticuerpo biespecífico de cualquiera de las modalidades 79-87, la molécula de ácido nucleico de la modalidad 88, el vector de la modalidad 89, la célula de la modalidad 90 y/o la composición farmacéutica de la modalidad 92.

30 Sin limitarse a ninguna teoría, los siguientes ejemplos son sólo para ilustrar los métodos de trabajo del aparato, método y sistema de la presente solicitud, pero no para limitar el alcance de la presente invención de la solicitud.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Cribado del anticuerpo anti-PD-L1 mediante el uso de la biblioteca de anticuerpos de fagos

5

Se usó proteína PD-L1-Fc humana (Origincell Therapeutics Co., Ltd.) como antígeno para clasificar la biblioteca de anticuerpos humanos naturales de fagos (Origincell Therapeutics Co., Ltd.). El tubo ELISA se revistió con un regulador de pH CBS que contenía 20 µg/ml (la primera y la 10 segunda rondas) o 10 µg/ml (la tercera y la cuarta rondas) de proteína PD-L1 a 4°C durante la noche. A continuación, se lavó el tubo con regulador de pH PBS. Se añadió leche desnatada en polvo al 10% para bloquear el tubo de ELISA, y luego se añadió 1 ml de fago bloqueado y se incubó a temperatura ambiente ($20 \pm 5^\circ\text{C}$) durante 1 hora. Después de lavar a fondo con PBST, se añadieron 800 µl de una solución regulador de pH Gly-HCl a pH 2.2 para elución, y luego se añadieron inmediatamente 400 µl 15 de una solución regulador de pH Tris-HCl a pH 8.0 para la neutralización. Luego, la mezcla se añadió a 20 ml de E. coli SS320 en la fase de crecimiento logarítmico con un valor de DO de aproximadamente 0.8, se mezcló bien y se mantuvo a 37°C durante 1 hora. Se tomaron 500 µl de solución microbiana para medir el título de fagos y se usó glicerina para proteger a los microbianos, y la solución microbiana restante se usó para recubrir la placa y se cultivó a 37°C durante la noche. Al día siguiente, las bacterias 20 de la placa se inocularon proporcionalmente a 80 ml de medio 2YT-Amp, de modo que la solución microbiana tuviera un valor de DO de 0.2 y se cultivaron durante varias horas. Cuando el valor de DO alcanzó 0.8, se añadieron 160 µl de fago auxiliar, se mezcló bien y se mantuvo a 37°C durante 1 hora. Luego, se agregaron antibióticos IPTG y Kan y se cultivaron con agitación a 250 rpm a 30°C durante la noche. Posteriormente, se recogió el sobrenadante para la precipitación del fago mediante una 25 solución de PEG/NaCl, que se resuspendió en 1.5 ml de regulador de pH PBS para el cribado de enriquecimiento.

Se recubrieron placas de ELISA de 96 pozos con soluciones que contenían 1 µg/ml de proteína PD-L1-Fc humana (Origincell Therapeutics Co., Ltd.) y proteína PD-L1-Fc de ratón (M5251, comprada a ACROBiosystems Inc.) a 4°C durante la noche. A continuación, la placa se bloqueó con 30 leche desnatada en polvo al 10% en sitios de unión inespecíficos. Después de un lavado completo, se tomó el sobrenadante del fago monoclonal y se añadió a las placas de 96 pozos y se incubó a 37°C durante 2 horas. Después de un lavado a fondo, se añadió a cada pozo anticuerpo anti-M13 marcado con HRP (27-9421-01, GE healthcare) y se hizo reaccionar a 37°C durante 45 minutos. Después de lavar a fondo, se añadió TMB a cada pozo para el desarrollo del color. Después de reaccionar a temperatura 35 ambiente ($20 \pm 5^\circ\text{C}$) durante 5-10 minutos, se añadió ácido sulfúrico a cada pozo para detener la

reacción. Se utiliza un lector de microplacas para medir el valor de DO de cada pozo a 450 nm.

Se identificó mediante ELISA un clon de anticuerpo de fago 1B10 que podría unirse específicamente tanto a PD-L1 humana como a PD-L1 de ratón. Los resultados de la secuenciación muestran que la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada VH del anticuerpo de fago 1B10 se muestra en SEQ ID NO: 1, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada VH del anticuerpo del fago 1B10 se muestra en SEQ ID NO: 2; la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera VL del anticuerpo del fago 1B10 se muestra en SEQ ID NO: 3, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera VL del anticuerpo del fago 1B10 se muestra en SEQ ID NO: 4.

10

EJEMPLO 2

Expresión y purificación del anticuerpo anti-PD-L1 completamente humano intacto

Se diseñó un cebador para la amplificación por PCR del VH del anticuerpo de fago 1B10, y el producto de PCR se clonó mediante recombinación en el vector pCMV-IgG1NDL que se digirió doblemente con AgeI y SalI. Se diseñó un cebador de diseño para la amplificación por PCR del VL del anticuerpo de fago 1B10, y el producto de PCR se clonó mediante recombinación en un vector pCMV- λ que se digirió doblemente con AgeI y BsiWI. Después de secuenciar exactamente, los vectores de expresión de cadena pesada y cadena ligera se cotransfectaron en células 293F para expresión transitoria, y se purificaron mediante columna proteína A para obtener un anticuerpo IgG1, λ intacto del anticuerpo fago 1B10. Este anticuerpo anti-PD-L1 completamente humano se denominó YN-002.

Los resultados de la secuenciación muestran que la secuencia de nucleótidos del VH que codifica el anticuerpo YN-002 se muestra en SEQ ID NO: 1, y la secuencia de aminoácidos de VH del anticuerpo YN-002 se muestra en SEQ ID NO: 2. La secuencia de nucleótidos de VL que codifica el anticuerpo YN-002 se muestra en SEQ ID NO: 3, y la secuencia de aminoácidos de VL del anticuerpo YN-002 se muestra en SEQ ID NO: 4. La secuencia de nucleótidos de la cadena pesada que codifica el anticuerpo YN-002 se muestra en SEQ ID NO: 5, y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de YN-002 se muestra en SEQ ID NO: 6. La secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera del anticuerpo YN-002 se muestra en SEQ ID NO: 7, y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo YN-002 se muestra en SEQ ID NO: 8.

30

EJEMPLO 3

Versión de línea germinal del anticuerpo anti-PD-L1 completamente humano YN-002

35

Al comparar la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada del anticuerpo YN-

002 con la secuencia de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocida, se confirmó que la cadena pesada del anticuerpo YN-002 usaba el segmento VH de la línea germinal humanaIGHV1-69*09, el segmento D de la línea germinal humana línea germinalIGHD5 -18*01, y segmento JH de la línea germinal humanaIGHJ4*02.

5 Al comparar la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera del anticuerpo YN-002 con la secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humana conocida, se confirmó que la cadena ligera del anticuerpo YN-002 usaba el segmento VL de la línea germinal humana IGLV2-14*01, y segmento JL de la línea germinal humana IGLJ2*01.

La secuencia de la región CDR del anticuerpo YN-002 se analizó mediante el sistema
10 Kabat (ver la figura 1).

Los resultados de la secuenciación muestran que las secuencias de aminoácidos de la LCDR1-3 del anticuerpo YN-002 se muestran en SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 60 y SEQ ID NO: 63, respectivamente; y las secuencias de aminoácidos de HCDR1-3 se muestran en SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48 y SEQ ID NO: 50, respectivamente.

15 Para minimizar la inmunogenicidad del anticuerpo YN-002, algunos residuos de aminoácidos podrían mutarse de nuevo a la secuencia de la línea germinal. El anticuerpo YN-003 es una versión de la línea germinal del anticuerpo YN-002, que se prepara mutando un aminoácido en la región FR1 de la región variable de la cadena pesada YN-002 de nuevo a la secuencia de la línea germinal y mutando 1 aminoácido en la región FR2 y 6 aminoácidos en la región FR3 en la región
20 variable de la cadena ligera YN-002 de regreso a la secuencia de la línea germinal (ver la figura 1). El vector de expresión de cadena pesada del anticuerpo anti-PD-L1 completamente humano YN-003 se obtiene mediante mutagénesis dirigida al sitio usando un kit de mutación (Tiangen Point Mutation Kit, KM101) basado en el plásmido de expresión de cadena pesada YN-002 construido anteriormente. El vector de expresión de la cadena ligera YN-003 se obtiene mediante mutagénesis dirigida al sitio
25 utilizando un kit de mutación (Tiangen Point Mutation Kit, KM101) basado en el plásmido de expresión de la cadena ligera YN-002.

La secuencia de aminoácidos del anticuerpo YN-003 VH se muestra en SEQ ID NO: 9, que se puede obtener mutando un residuo de aminoácido en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo YN-002 VH. La secuencia de nucleótidos que codifica YN-003 VH se muestra en SEQ ID NO:
30 10. La secuencia de aminoácidos del anticuerpo YN-003 VL se muestra en SEQ ID NO: 11, que puede obtenerse mutando 7 residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo YN-002 VL, y la secuencia de nucleótidos correspondiente a YN-003VL se muestra en SEQ ID NO: 12. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo YN-003 se muestra en SEQ ID NO: 13; la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de YN-003 se muestra en SEQ ID NO: 14;
35 la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo YN-003 se muestra en SEQ ID NO: 15;

y la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera del anticuerpo YN-003 se muestra en SEQ ID NO: 16.

Para la expresión y purificación del anticuerpo YN-003, consulte los pasos de expresión y purificación del anticuerpo YN-002 en el ejemplo 2.

5

EJEMPLO 4

Prueba de afinidad de unión del anticuerpo anti-PD-L1

La afinidad de unión del anticuerpo YN-002 y el anticuerpo YN-003 a las proteínas PD-L1 recombinantes humanas, *Macaca fascicularis*, de ratón y caninas se midió mediante un analizador de interacción molecular (Octet RED384, adquirido de Pall ForteBio Analytics Co., Limitado.). Las siguientes proteínas se marcaron con biotina (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin, Pierce, 21327): PD-L1-Fc recombinante humana, *Macaca fascicularis* PD-L1-Fc recombinante (90251-C02H, adquirido de Sino Biological Inc.), PD-L1-Fc de ratón recombinante (M5251, adquirido de ACROBiosystems Inc.), PD-L1-Fc de perro recombinante (70110-D02H, adquirido de Sino Biological Inc.). La cinética de unión antígeno-anticuerpo se analizó mediante una tecnología de interferencia de biopelícula (BLI), utilizando un analizador de interacción molecular (Octet RED384, adquirido de Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) Y utilizando un regulador de pH PBS que contiene 0.1% de BSA y 0.02% de Tween. 20. Se fijó una proteína antigénica acoplada a biotina con una concentración de 50 nM con el sensor SA (Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) y se unió a 1500 rpm durante 10 minutos; luego se unió con la solución de anticuerpo doblemente diluida a 1500 rpm durante 10 minutos; y finalmente se disocia a 1500 rpm durante 10 minutos. Los resultados obtenidos serían analizados por el software Octet Data Analysis 9.0 (Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) para dar K_D , K_{aso} (1/MS) y K_{diso} (1/s).

Los resultados de la afinidad de unión medida de los anticuerpos anti-PD-L1 YN-002 a YN-003 se muestran en los cuadros 1-4.

CUADRO 1

Afinidad de unión del anticuerpo PD-L1 a PD-L1-Fc humano

Anticuerpo	PD-L1-Fc-Biotina humana		
	k_{aso} (1/MS)	k_{diso} (1/s)	K_D (M)
YN-002	6.69×10^5	5.94×10^{-4}	8.88×10^{-10}
YN-003	1.50×10^6	6.11×10^{-4}	4.08×10^{-10}

30

CUADRO 2**Afinidad de unión del anticuerpo PD-L1 al PD-L1-Fc de ratón**

Anticuerpo	PD-L1-Fc-Biotina de ratón		
	k_{aso} (1/Ms)	k_{diso} (1/s)	K_D (M)
YN-002	9.77×10^5	1.68×10^{-3}	1.72×10^{-9}
YN-003	1.03×10^6	9.97×10^{-4}	9.96×10^{-10}

CUADRO 3**Afinidad de unión del anticuerpo PD-L1 a Macaca fascicularis PD-L1-Fc**

Anticuerpo	PD-L1-Fc-Biotina Macaca Fascicularis		
	k_{aso} (1/Ms)	k_{diso} (1/s)	K_D (M)
YN-002	1.77×10^6	1.90×10^{-3}	1.07×10^{-9}
YN-003	2.08×10^6	1.36×10^{-3}	6.54×10^{-10}

CUADRO 4**Afinidad de unión del anticuerpo PD-L1 al PD-L1-Fc de perro**

Anticuerpo	PD-L1-Fc-Biotina de perro		
	k_{aso} (1/Ms)	k_{diso} (1/s)	K_D (M)
YN-002	1.02×10^6	7.59×10^{-4}	7.43×10^{-10}
YN-003	8.64×10^5	5.14×10^{-4}	5.94×10^{-10}

EJEMPLO 5**El anticuerpo PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 humano y PD-1 humana**

La proteína PD-1-Fc humana (ACROBiosystems Inc., H5257) se marcó con biotina (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin, Pierce, 21327). La PD-1-Fc humano marcado con una concentración subsaturada de biotina se añadió a 1×10^6 /ml de las células CHO que expresaban de forma estable el PD-L1 humano, y luego se añadió cada anticuerpo diluido en una proporción de cinco, se mezcló bien y se incubado (4°C, 1 hora). Después del lavado de las células, se añadió el conjugado de estreptavidina R-PE (tecnología de vida, SA10041) y se incubó (4°C, 30 min). Después del lavado de las células, se detectó la intensidad de la fluorescencia mediante un citómetro de flujo (Intellicyt iQue Screener). Los resultados se muestran en la figura 2: tanto YN-002 como YN-003 pueden inhibir eficazmente la unión de PD-1 humana a células CHO que expresan PD-L1 humana..

EJEMPLO 6

El anticuerpo PD-L1 inhibe la unión de Macaca fascicularis PD-L1 a Macaca fascicularis PD-1

5 La capacidad de los anticuerpos anti-PD-L1 YN-002 e YN-003 para bloquear la unión de Macaca fascicularis PD-L1-Fc (Sino Biological Inc., 90251-C02H) a Macaca fascicularis PD-1-Fc (Sino Biological Inc., 90311-C02H) se evaluó mediante el instrumento Octet RED384 ((Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.). Primero, el Macaca fascicularis PD-1-Fc se marcó con biotina (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin, Pierce, 21327). El análisis cinético de unión del anticuerpo PD-L1 para inhibir la unión de Macaca

10 fascicularis PD-L1 a Macaca fascicularis PD-1 se realizó mediante la tecnología de interferencia de biopelícula (BLI), utilizando el analizador de interacción molecular del instrumento fortebio octet RED384 (PALL) (ambos el antígeno y el anticuerpo se diluyeron con BSA al 0.1% y Tween 20 al 0.02% en un regulador de pH PBS). Se fijó un PD-1-Fc humano recombinante acoplado con biotina 100 nM con el sensor SA a 1500 rpm/min y se unió durante 10 min. La Macaca fascicularis PD-L1 a una

15 concentración final de 75 nM se mezcló con una solución de anticuerpo diluida tres veces, se incubó durante 60 minutos y luego se combinó en la máquina durante 10 minutos a 1500 rpm/min y finalmente se disoció durante 10 minutos a 1500 rpm/min. Los resultados obtenidos estarán sujetos al análisis de datos mediante el software Octet Data Analysis 9.0 (Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.). Los resultados se muestran en la figura 3: tanto YN-002 como YN-003 pueden inhibir eficazmente la unión

20 de Macaca fascicularis PD-L1-Fc a Macaca fascicularis PD-1-Fc.

EJEMPLO 7

Anticuerpo PD-L1 que inhibe la unión de PD-L1 de ratón a PD-1 de ratón

25 Se marcó PD-1-Fc de ratón (ACROBiosystems Inc., M5259) con biotina (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin, Pierce, 21327), se añadió PD-1-Fc de ratón marcado con una concentración subsaturada de biotina en Se añadió 1×10^6 /ml de células CHO que expresaban de forma estable PD-L1 de ratón, y luego se añadió cada anticuerpo diluido en una proporción de cinco veces, se mezcló bien y se incubó (4°C, 1 hora). Después del lavado de las células, se añadió el conjugado de

30 estreptavidina R-PE (tecnología de vida, SA10041) y se incubó (4°C, 30 min). Después del lavado de las células, se detectó la intensidad de la fluorescencia mediante un citómetro de flujo (Intellicyt iQue Screener). Los resultados se muestran en la figura 4: tanto YN-002 como YN-003 pueden inhibir eficazmente la unión de PD-1 de ratón a las células CHO que expresan PD-L1 de ratón.

EJEMPLO 8

Estudios del efecto antitumoral del anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 en ratones portadores de cáncer de colon

5 El día 0, se inocularon subcutáneamente ratones hembra C57BL/6 de 6-8 semanas de edad con 3×10^6 células de cáncer colorrectal de ratón MC38 (Shanghai Linyuan Biological Technology Co., Ltd.). El día 3, los ratones se dividieron uniformemente en 7 grupos con 8-9 ratones en cada grupo. Los ratones portadores de tumores en cada grupo fueron inyectados intraperitonealmente con la proteína IgG-Fc del anticuerpo humano (10 mg/kg, dos veces por semana, dos semanas en total), anticuerpo YN-003 (10 mg/kg, dos veces por semana, dos semanas en total), Atezolizumab (10 mg/kg, dos veces por semana, dos semanas en total), respectivamente. Los ratones de cada grupo se observaron regularmente para determinar el cambio de peso corporal y tamaño del tumor. Los resultados experimentales muestran: en comparación con la IgG1-Fc de control, tanto YN-003 como Atezolizumab pueden inhibir eficazmente el crecimiento tumoral, en donde el efecto antitumoral de YN-003 es más significativo (figura 5).

EJEMPLO 9

Detección de anticuerpos anti-CD137 por biblioteca de anticuerpos de fagos

20 La proteína CD137 (comprada de Sino Biological Inc.) se usó como antígeno para clasificar la biblioteca de anticuerpos humanos naturales de fagos (Origincell Therapeutics Co., Ltd.). El tubo ELISA se revistió con un regulador de pH CBS que contenía 20 µg/ml (la primera y la segunda rondas) o 10 µg/ml (la tercera y la cuarta rondas) de proteína CD137 a 4°C durante la noche. A continuación, se lavó el tubo con regulador de pH PBS. Se añadió leche desnatada en polvo al 10% para bloquear el tubo de ELISA, y luego se añadió 1 ml de fago bloqueado y se incubó a temperatura ambiente ($20 \pm 5^\circ\text{C}$) durante 1 hora. Después de lavar a fondo con PBST, se añadieron 800 µl de una solución regulador de pH Gly-HCl a pH 2.2 para elución, y luego se añadieron inmediatamente 400 µl de una solución regulador de pH Tris-HCl a pH 8.0 para la neutralización. Luego, la mezcla se añadió a 20 ml de E. coli SS320 en la fase de crecimiento logarítmico con un valor de DO de aproximadamente 0.8, se mezcló bien y se mantuvo a 37°C durante 1 hora. Se tomaron 500 µl de solución microbiana para medir el título de fagos y se usó glicerina para proteger a los microbianos, y la solución microbiana restante se usó para recubrir la placa y se cultivó a 37°C durante la noche. Al día siguiente, las bacterias de la placa se inocularon proporcionalmente a 80 ml de medio 2YT-Amp, de modo que la solución microbiana tuviera un valor de DO de 0.2 y se cultivaron durante varias horas. Cuando el valor de DO alcanzó 0.8, se añadieron 160 µl de fago auxiliar, se mezcló bien y se mantuvo a 37°C durante 1 hora.

Luego, se agregaron antibióticos IPTG y Kan y se cultivaron con agitación a 250 rpm a 30°C durante la noche. Posteriormente, se recogió el sobrenadante para la precipitación del fago mediante una solución de PEG/NaCl, que se resuspendió en 1.5 ml de regulador de pH PBS para el cribado de enriquecimiento.

5 Se recubrieron placas de ELISA de 96 pozos con soluciones que contenían 1 µg/ml de proteína CD137 humana a 4°C durante la noche. A continuación, la placa se bloqueó con leche desnatada en polvo al 10% en sitios de unión inespecíficos. Después de un lavado completo, se tomó el sobrenadante del fago monoclonal y se añadió a las placas de 96 pozos y se incubó a 37°C durante 2 horas. Después de un lavado a fondo, se añadió a cada pozo anticuerpo anti-M13 marcado con HRP
10 (27-9421-01, GE healthcare) y se hizo reaccionar a 37°C durante 45 minutos. Después de lavar a fondo, se añadió TMB a cada pozo para el desarrollo del color. Después de reaccionar a temperatura ambiente (20±5°C) durante 5-10 minutos, se añadió ácido sulfúrico a cada pozo para detener la reacción. Se utiliza un lector de microplacas para medir el valor de DO de cada pozo a 450 nm.

Se identificó mediante ELISA un clon de anticuerpo de fago 1A6 que podría unirse
15 específicamente a CD137 humano, y se obtuvieron las secuencias de los genes VH y VL mediante secuenciación. Los resultados de la secuenciación mostraron que la secuencia de nucleótidos que codifica el VH del anticuerpo del fago 1A6 se muestra en SEQ ID NO: 17, la secuencia de aminoácidos del VH del anticuerpo del fago 1A6 se muestra en SEQ ID NO: 18; la secuencia de ácidos nucleósidos que codifica la VL del anticuerpo del fago 1A6 se muestra en la SEQ ID NO: 19, y la secuencia de
20 aminoácidos de VL del anticuerpo del fago 1A6 se muestra en SEQ ID NO: 20.

EJEMPLO 10

Expresión y purificación del anticuerpo anti-CD137 completamente humano intacto

25 Se diseñó un cebador para la amplificación por PCR del VH del anticuerpo del fago 1A6. El producto de la PCR se clonó mediante recombinación en el vector pCMV-IgG2 digerido doblemente con AgeI y SalI. Se diseñó un cebador para la amplificación por PCR del VL del anticuerpo de fago 1A6, y el producto de PCR se clonó mediante recombinación en el vector pCMV-λ digerido con AgeI y BsiWI. Después de la secuenciación correcta, los vectores de expresión de cadena pesada y
30 cadena ligera se cotransfectaron en células 293F para expresión transitoria y se purificaron mediante columna proteína A. El anticuerpo λ intacto de IgG2 de 1A6, el anticuerpo anti-CD137 completamente humano, se denominó YN-005.

Los resultados de la secuenciación mostraron que la secuencia de aminoácidos del anticuerpo YN-005 VH se muestra en SEQ ID NO: 18, la secuencia de nucleótidos que codifica el
35 anticuerpo YN-005 VH se muestra en SEQ ID NO: 17; y la secuencia de aminoácidos del anticuerpo

YN-005 VL se muestra en SEQ ID NO: 20, y la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo YN-005 VL se muestra en SEQ ID NO: 19. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo YN-005 se muestra en SEQ ID NO: 21, la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada del anticuerpo YN-005 se muestra en SEQ ID NO: 22; la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo YN-005 se muestra en SEQ ID NO: 3, y la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera del anticuerpo YN-005 se muestra en SEQ ID NO: 24.

EJEMPLO 11

Versión de línea germinal del anticuerpo anti-CD137 completamente humano YN-005

10

Al comparar la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada del anticuerpo YN-005 con la secuencia de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocida, se confirmó que la cadena pesada del anticuerpo YN-005 utilizó el segmento VH de la línea germinal humana IGHV3-23*04, el segmento D de humano línea germinal IGHD7-27*01 y el segmento JH de la línea germinal humana IGHJ3*02.

15

Al comparar la secuencia de inmunoglobulina de la cadena ligera YN-005 con la secuencia conocida de la cadena ligera de la inmunoglobulina de la línea germinal humana, se confirmó que la cadena ligera del anticuerpo YN-005 utilizó el segmento VL de la línea germinal humana IGLV1-44*01 y el segmento JL de la línea germinal humana IGLJ1*01.

20

Se usó el sistema Kabat para analizar la secuencia de la región CDR del anticuerpo YN-005 (ver la figura 6), y los resultados de la secuenciación muestran que la secuencia de aminoácidos de HCDR1-3 del anticuerpo YN-005 se muestra en SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78 y SEQ ID NO: 79, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de la LCDR1-3 del anticuerpo YN-005 se muestra en SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81 y SEQ ID NO: 82, respectivamente.

25

Para minimizar la inmunogenicidad del anticuerpo YN-005, algunos residuos de aminoácidos pueden mutarse de nuevo a la secuencia de la línea germinal. El anticuerpo YN-006 es una versión de la línea germinal del anticuerpo YN-005, que se prepara mutando un aminoácido en la región FR1 en la región variable de la cadena pesada YN-005 de nuevo a la secuencia de la línea germinal (ver la figura 6). El vector de expresión de cadena pesada del anticuerpo anti-CD137 completamente humano YN-006 se obtiene mediante mutagénesis dirigida al sitio usando un kit de mutación (Tiangen Point Mutation Kit, KM101) basado en el plásmido de expresión de cadena pesada construido anteriormente de YN-005.

30

La secuenciación muestra que la secuencia de aminoácidos del anticuerpo YN-006 VH se muestra en SEQ ID NO: 25, y la secuencia de nucleótidos que codifica el VH YN-006 se muestra en SEQ ID NO: 26. La secuencia de aminoácidos del anticuerpo YN-006 VL se muestra en SEQ ID NO: 20,

35

y la secuencia de nucleótidos que codifica YN-006 VL se muestra en SEQ ID NO: 19. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo YN-006 se muestra en SEQ ID NO: 27; la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada del anticuerpo YN-006 se muestra en SEQ ID NO: 28; y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo YN-006 se muestra en SEQ ID NO: 23, y la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera YN-006 se muestra en SEQ ID NO: 24.

Para la expresión y purificación del anticuerpo YN-006, consulte los pasos específicos de expresión y purificación del anticuerpo YN-005 en el ejemplo 9.

EJEMPLO 12

Determinación de la afinidad de unión del anticuerpo anti-CD137

La afinidad de unión del anticuerpo YN-005 y el anticuerpo YN-006 a la proteína CD137-His humana recombinante (Origincell Therapeutics Co., Ltd.) Se midió mediante un analizador de interacción molecular (Octet RED384, adquirido de Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.). La cinética de unión de antígeno-anticuerpo se analizó mediante la tecnología de interferencia de biopelícula (BLI), utilizando un analizador de interacción molecular (Octet RED384, adquirido de Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) y utilizando un regulador de pH PBS que contiene 0.1% de BSA y 0.02% de Tween 20. El anticuerpo con una concentración de 50 nM se fijó con el sensor AHC y se unió a 1500 rpm durante 5 minutos; luego se unió con la solución de antígeno de proteína CD137-His recombinante doblemente diluida (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56 nM) a 1500 rpm durante 5 minutos; y finalmente se disocia a 1500 rpm durante 10 minutos. El sensor AHC se regenera mediante pulsos de glicina y luego se reutiliza. Los resultados obtenidos serían analizados por el software Octet Data Analysis 9.0 (Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) para dar K_D , K_{aso} (1/Ms) y K_{diso} (1/s). Los resultados medidos de la afinidad de unión de los anticuerpos CD137 YN-005 e YN-006 se muestran en el cuadro 5.

25

CUADRO 5

Afinidad del anticuerpo CD137 con el CD137-His humano

Anticuerpo	CD137-His		
	K_{aso} (1/Ms)	K_{diso} (1/s)	K_D (M)
YN-005	9.38×10^4	4.55×10^{-5}	4.85×10^{-10}
YN-006	9.68×10^4	1.33×10^{-5}	1.37×10^{-10}

EJEMPLO 13**Estudios del efecto antitumoral del anticuerpo monoclonal CD137 en ratones portadores de cáncer de colon**

5 El día 0, ratones hembra C57BL/6 de 6-8 semanas de edad con gen CD137 humano (ratones B-hTNFRSF9 (4-1BB), adquiridos de Beijing BioCytogen Co., Ltd.) se inocularon por vía subcutánea con 1.5×10^6 cáncer colorrectal de ratón MC38 . El día 3, los ratones se dividieron uniformemente en 3 grupos con 7 ratones en cada grupo. Los ratones portadores de tumores en cada grupo fueron inyectados intraperitonealmente con la proteína IgG-Fc del anticuerpo humano (3 mg/kg, 10 dos veces por semana, dos semanas en total), anticuerpo CD137 anticuerpo YN-006 (3 mg/kg, dos veces por semana, dos semanas en total), y el anticuerpo CD137 Utomilumab (3 mg/kg, dos veces por semana, dos semanas en total), respectivamente. Los ratones de cada grupo se observaron regularmente para determinar el cambio de peso corporal y tamaño del tumor. Los resultados experimentales muestran: en comparación con el control IgG1-Fc, tanto YN-006 como Utomilumab 15 pueden inhibir eficazmente el crecimiento tumoral, y vale la pena señalar que el efecto antitumoral de YN-006 es más significativo que el de Utomilumab (por ejemplo, como se muestra en la figura 7).

EJEMPLO 14**Construcción del anticuerpo biespecífico anti-PD-L1/CD137 YN-007**

20

El primer gen polipeptídico del anticuerpo biespecífico anti-PD-L1/CD137 YN-007 se construyó mediante un método de clonación molecular, como PCR superpuesta, mutación dirigida al sitio o similar, utilizando el gen de la cadena pesada del anticuerpo anti-PD-L1 YN-003 y los genes de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo anti-CD137 humano YN-006, y clonados por 25 combinación en el vector pCMV-IgG1AEM doblemente digerido con AgeI y BamHI para construir el vector de expresión del primer polipéptido de YN-007.

El segundo gen polipeptídico de YN-007 es el mismo que el del gen de la cadena ligera de YN-003. El vector de expresión del segundo polipéptido de YN-007 es el vector de expresión construido anteriormente de la cadena ligera de YN-003.

30 Después de la secuenciación correcta, los vectores de expresión del primer polipéptido y el segundo polipéptido se cotransfectaron en células 293F para expresión transitoria y se purificaron mediante columna de proteína A para obtener el anticuerpo biespecífico anti-PD-L1/CD137 YN-007.

La secuencia de nucleótidos que codifica el primer polipéptido del anticuerpo YN-007 se muestra en SEQ ID NO: 29, y la secuencia de aminoácidos del primer polipéptido del anticuerpo 35 YN-007 se muestra en SEQ ID NO: 30; la secuencia de nucleótidos que codifica el segundo polipéptido

del anticuerpo YN-007 se muestra en SEQ ID NO: 16, y la secuencia de aminoácidos del segundo polipéptido del anticuerpo YN-007 se muestra en SEQ ID NO: 15.

EJEMPLO 15

Determinación de la afinidad de unión del anticuerpo biespecífico anti-PD-L1/CD137 YN-007

La afinidad de unión del anticuerpo biespecífico anti-PD-L1/CD137 YN-007 a la proteína PD-L1-Fc humana recombinante y la PD-L1-Fc de ratón recombinante se midió mediante un analizador de interacción molecular (Octet RED384, adquirido de Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.). La proteína PD-L1-Fc humana recombinante y la PD-L1-Fc de ratón recombinante se marcaron con biotina (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin, Pierce, 21327). La cinética de unión de antígeno-anticuerpo se analizó mediante la tecnología de interferencia de biopelícula (BLI), utilizando un analizador de interacción molecular (Octet RED384, adquirido de Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) Y utilizando un regulador de pH PBS que contiene 0.1% de BSA y 0.02% de Tween 20. Se fijó una proteína antigénica acoplada a biotina con una concentración de 50 nM con el sensor SA (Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) y se unió a 1500 rpm durante 10 minutos; luego se unió con la solución de anticuerpo YN-007 doblemente diluida a 1500 rpm durante 10 minutos; y finalmente se disocia a 1500 rpm durante 10 minutos. Los resultados obtenidos serían analizados por el software Octet Data Analysis 9.0 (Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) para dar K_D , K_{aso} (1/Ms) y K_{diso} (1/s).

Los resultados medidos de la afinidad de unión de YN-007 a PD-L1-Fc humana se muestran en el cuadro 6.

Los resultados medidos de la afinidad de unión de YN-007 a PD-L1-Fc de ratón se muestran en el cuadro 7.

CUADRO 6

Afinidad de unión del anticuerpo biespecífico YN-007 anti-PD-L1/CD137 a la PD-L1-Fc humano

Anticuerpo	PD-L1-Fc-Biotina humana		
	K_{aso} (1/Ms)	K_{diso} (1/s)	K_D (M)
YN-007	1.13×10^6	5.92×10^{-4}	5.25×10^{-10}

CUADRO 7**Afinidad de unión del anticuerpo biespecífico YN-007 anti-PD-L1/CD137 a la PD-L1-Fc de ratón**

Anticuerpo	PD-L1-Fc-Biotina de ratón		
	K_{aso} (1/Ms)	K_{diso} (1/s)	K_D (M)
YN-007	8.1×10^5	1.09×10^{-3}	1.34×10^{-9}

La afinidad de unión del anticuerpo biespecífico anti-PD-L1/CD137 YN-007 a la proteína CD137-His humana recombinante se midió mediante un analizador de interacción molecular (Octet RED384, adquirido de Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.). La cinética de unión de antígeno-anticuerpo se analizó mediante la tecnología de interferencia de biopelícula (BLI), utilizando un analizador de interacción molecular (Octet RED384, adquirido de Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) Y utilizando un regulador de pH PBS que contiene 0.1% de BSA y 0.02% de Tween 20. El anticuerpo con una concentración de 50 nM se fijó con el sensor AHC y se unió a 1500 rpm durante 5 minutos; luego se unió con la solución de antígeno de proteína CD137-His humana recombinante doblemente diluida (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 nM) a 1500 rpm durante 5 minutos; y finalmente se disocia a 1500 rpm durante 10 minutos. El sensor AHC se regeneró mediante pulsos de glicina y luego se reutilizó. Los resultados obtenidos serían analizados por el software Octet Data Analysis 9.0 (Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) Para calcular la fuerza de unión entre el antígeno y el anticuerpo, para dar K_D , K_{aso} (1/Ms) y K_{diso} (1/s).

Los resultados medidos de la afinidad de unión del anticuerpo biespecífico anti-PD-L1/CD137 YN-007 a CD137 humano se muestran en el cuadro 8.

CUADRO 8**Afinidad de unión del anticuerpo biespecífico YN-007 anti-PD-L1 / CD137 a la CD137-His humano**

Anticuerpo	CD137-His humana		
	K_{aso} (1/Ms)	K_{diso} (1/s)	K_D (M)
YN-007	8.96×10^4	9.83×10^{-5}	1.1×10^{-9}

EJEMPLO 16**Maduración por afinidad del anticuerpo PD-L1 YN-003**

Se diseñó un cebador para construir el gen del anticuerpo de cadena sencilla (S) del anticuerpo PD-L1 YN-003 mediante PCR solapante, y se clonó en el vector fagémico pDF y se denominó pDF-YN-003 ScFv. El pDF-YN-003 ScFv se utilizó como plantilla para diseñar un cebador degenerado para aleatorizar 6 regiones CDR (incluidos algunos residuos de aminoácidos en las regiones CDR y

residuos de aminoácidos individuales en las regiones FR adyacentes a las regiones CDR) del anticuerpo. YN-003 mediante PCR superpuesta, respectivamente (como se muestra en la figura 8).

Los fragmentos del gen scFv aleatorizados en la región CDR obtenidos mediante PCR solapante se digirieron doblemente con BssHII y NheI, y luego se ligaron con el vector fagémido pDF digerido doblemente por BssHII y NheI. Se sometió a electroporación 1 µg del producto de ligación en células electrocompetentes TG1 y se recubrió con una placa 2YT+AG después de múltiples diluciones. Al día siguiente, se raspó el césped de la placa y se expandió a 300 ml de medio 2YT+Amp. Se cultivó a 37°C hasta una DO de aproximadamente 0.8. El fago auxiliar se añadió y se mezcló bien, se dejó reposar durante 1 hora y se añadió IPTG con una concentración final de 1 mM y 50 µg/ml de Kana y se agitó a 30°C durante la noche. Al día siguiente, se recogió el sobrenadante mediante centrifugación y se filtró con un filtro de 0.45. Se añadió 1/5 de volumen de PEG-NaCl para precipitar el fago y se centrifugó para recoger el precipitado. Se usó 1/10 de volumen de PBS para resuspender el precipitado, y se midió la DO₂₆₀ para calcular la pfu del fago. El producto se almacenó a 4°C. La biblioteca de anticuerpos de fagos se puede usar directamente para un cribado posterior.

La proteína PD-L1-His humana (Origincell Therapeutics Co., Ltd.) como antígeno se usó para clasificar la biblioteca de anticuerpos de fagos anterior. En tubos de ELISA, se utilizó un regulador de pH CBS para recubrir el antígeno PD-L1 (1 ml) con una concentración de 100 nM (la primera y la segunda ronda) o 5 nM (la tercera ronda) a 4°C durante la noche. Al día siguiente, se usaron 2 ml de regulador de pH PBS que contenía leche desnatada en polvo al 10% para bloquear el tubo. Se añadió al tubo 1 ml del fago bloqueado y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente; lavado con PBST 20 veces (la primera ronda), 50 veces (la segunda ronda) o 100 veces (la tercera ronda). Se añadieron 800 µl de regulador de pH Gly-HCl (pH 2.2) para la elución, y se añadieron inmediatamente 400 µl de regulador de pH Tris-HCl (pH 8.0) para la neutralización. Se añadió a 20 ml de E. coli TG1 con una DO de la fase de crecimiento logarítmica de aproximadamente 0.8, se mezcló bien y se mantuvo a 37°C durante 1 hora. Se tomaron 500 µl para determinar el título de fagos y se utilizó glicerol para proteger los microbios. El líquido microbiano restante se extendió sobre la placa y se incubó a 37°C en la incubadora durante la noche. Al día siguiente, los microbianos de la placa se rasparon y se inocularon en 80 ml de medio 2YT-Amp en una cierta proporción para permitir que la DO fuera de 0.2. La mezcla se incubó durante varias horas hasta que la DO alcanzó 0.8. Se agregaron 160 µl de fago auxiliar, se mezclaron bien y se dejaron a 37°C durante 1 h. Se agregaron antibióticos IPTG y Kan y se incubaron con agitación a 250 rpm a 30°C durante la noche. El sobrenadante se recogió y se trató con solución de PEG/NaCl para precipitar los fagos, que se resuspendieron en 1.5 ml de regulador de pH PBS. El fago resuspendido se utilizó para la siguiente ronda de selección de enriquecimiento. Después de 3 rondas de clasificación, se observó un enriquecimiento significativo. Los clones de anticuerpos de fagos clasificados se identificaron mediante ELISA: se recubrió proteína

PD-L1-His humana en una placa ELISA de 96 pozos a una concentración de 1 µg/ml a 4°C durante la noche. Luego, los sitios de unión no específicos se bloquearon con leche desnatada en polvo al 10%. Después de un lavado suficiente, se añadió el sobrenadante del fago monoclonal a una placa de 96 pozos y se incubó a 37°C durante 2 horas. Después de un lavado a fondo, se añadió anticuerpo anti-

5 M13 marcado con HRP (GE healthcare, 27-9421-01) y se hizo reaccionar a 37°C durante 45 minutos. Después de un lavado a fondo, se añadió TMB para desarrollar el color y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. Finalmente, se detuvo la reacción con ácido sulfúrico. El valor de DO de cada pozo se midió a 450 nm y el clon de anticuerpo de fago con un valor de DO450 más alto se seleccionó para la secuenciación. Después de obtener las secuencias del gen de la región

10 variable de la cadena pesada y de la cadena ligera de cada clon de anticuerpo de fago, cada anticuerpo de fago se rediseñó como un anticuerpo IgG1,λ de longitud completa: se diseñó un cebador para realizar la amplificación por PCR del VH de cada fago clon de anticuerpo, y el producto de PCR se clonó mediante recombinación con el vector de expresión de la cadena pesada del anticuerpo pCMV-IgG1NDL digerido doblemente con AgeI y SalI. Se diseñó un cebador para la amplificación por PCR del VL de

15 cada clon de anticuerpo de fago y el producto de PCR se clonó en el vector de expresión de la cadena ligera del anticuerpo pCMV-λ digerido por duplicado con AgeI y BsiWI. Después de la secuenciación correcta, los vectores de expresión de la cadena pesada y la cadena ligera de cada anticuerpo se cotransfectaron en células 293F para una expresión transitoria. Después de 7 días de cultivo en medio sin suero, se recogió el sobrenadante del cultivo celular y se purificó mediante una columna proteína

20 A para obtener la proteína del anticuerpo. El anticuerpo purificado se dializó con PBS y finalmente se cuantificó con un kit de ensayo de proteína BCA (Pierce, 23225). La afinidad de unión del anticuerpo de longitud completa anterior contra la proteína PD-L1-His humana recombinante (Origincell Therapeutics Co., Ltd.) mediante el uso de un analizador de interacción molecular (Octet RED384, adquirido de Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.). La cinética de unión de antígeno-anticuerpo se analizó

25 mediante la tecnología de interferencia de biopelícula (BLI), utilizando un analizador de interacción molecular (Octet RED384, adquirido de Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) y utilizando un regulador de pH PBS que contiene 0.1% de BSA y 0.02% de Tween20. El anticuerpo con una concentración de 50 nM se fijó con el sensor AHC y se unió a 1500 rpm durante 5 minutos; luego se unió con la solución de antígeno doblemente diluida (50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 nM) con 7 gradientes de concentración

30 a 1500 rpm durante 5 minutos, y finalmente se disoció a 1500 rpm durante 10 minutos. El sensor AHC se regeneró mediante pulsos de glicina y luego se reutilizó. Los resultados obtenidos serán analizados por el software Octet Data Analysis 9.0 (Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) Para obtener el KD, K_{aso} (1/Ms) y K_{diso} (1/s). Después de cribar los clones mutantes obtenidos con mayor afinidad, los puntos de mutación de aminoácidos con mayor afinidad en diferentes regiones CDR se combinaron usando

35 métodos como PCR superpuesta, y luego la proteína del anticuerpo se expresó y purificó de acuerdo

con el método anterior y la afinidad fue determinado. Después de múltiples rondas de selección y combinación, los 5 clones mutantes del anticuerpo YN-003 superiores con alta afinidad se denominaron anticuerpo YN-035, anticuerpo YN-036, anticuerpo YN-037, anticuerpo YN-038 y anticuerpo YN-039, respectivamente. Los valores de afinidad de los 5 anticuerpos obtenidos mediante el método anterior se muestran en el cuadro 9. Los resultados muestran que la afinidad del anticuerpo YN-035, el anticuerpo YN-036, el anticuerpo YN-037, el anticuerpo YN-038 y el anticuerpo YN-039 eran todos más altos que los anticuerpos anti-PD-L1 Atezolizumab y Avelumab.

CUADRO 9**Afinidad de unión del anticuerpo PD-L1 a PD-L1-His humana**

Anticuerpo	PD-L1-His humana						
	K_D (M)	K_D Error	$K_{activada}$ (1/Ms)	K_{aso} Error	K_{diso} (1/s)	K_{diso} Error	R^2 completo
Atezolizumab	9.16×10^{-10}	8.79×10^{-12}	3.78×10^5	1.95×10^3	3.46×10^{-4}	2.80×10^{-6}	0.9984
Avelumab	1.03×10^{-9}	9.20×10^{-12}	2.96×10^5	1.31×10^3	3.05×10^{-4}	2.37×10^{-6}	0.9991
YN-035	4.52×10^{-10}	3.54×10^{-12}	4.27×10^5	1.16×10^3	1.93×10^{-4}	1.42×10^{-6}	0.9995
YN-036	4.74×10^{-10}	4.95×10^{-12}	3.69×10^5	1.22×10^3	1.75×10^{-4}	1.73×10^{-6}	0.9994
YN-037	3.82×10^{-10}	5.66×10^{-12}	3.55×10^5	1.36×10^3	1.36×10^{-4}	1.94×10^{-6}	0.9991
YN-038	4.47×10^{-10}	4.61×10^{-12}	3.50×10^5	1.05×10^3	1.56×10^{-4}	1.54×10^{-6}	0.9995
YN-039	4.85×10^{-10}	4.41×10^{-12}	3.56×10^5	1.02×10^3	1.73×10^{-4}	1.49×10^{-6}	0.9995

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo YN-035 (YN-035 VH) es mostrada en SEQ ID NO: 31, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo YN-035 es mostrada en SEQ ID NO: 32, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo YN-035 (YN-035 VL) es mostrada en SEQ ID NO: 33, y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo YN-035 es mostrada en SEQ ID NO: 34.

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo YN-036 (YN-036 VH) es mostrada en SEQ ID NO: 35, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo YN-036 es mostrada en SEQ ID NO: 36, La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo YN-036 (YN-036VL) es mostrada en SEQ ID NO: 33, y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo YN-036 es mostrada en SEQ ID NO: 34.

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo YN-037 (YN-037 VH) es mostrada en SEQ ID NO: 35, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo YN-037 es mostrada en SEQ ID NO: 36, la secuencia de aminoácidos de la región

variable de cadena ligera del anticuerpo YN-037 (YN-037VL) es mostrada en SEQ ID NO: 37, y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo YN-037 es mostrada en SEQ ID NO: 38.

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo YN-038 (YN-038 VH) es mostrada en SEQ ID NO: 35, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo YN-038 es mostrada en SEQ ID NO: 36, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo YN-038 (YN-038VL) es mostrada en SEQ ID NO: 39, y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo YN-038 es mostrada en SEQ ID NO: 40.

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo YN-039 (YN-039VH) es mostrada en SEQ ID NO: 35, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo YN-039 es mostrada en SEQ ID NO: 36, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo YN-039 (YN-039 VL) es mostrada en SEQ ID NO: 41, y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo YN-039 es mostrada en SEQ ID NO: 42.

La figura 9 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesadas y secuencias de la línea germinal relacionada de los anticuerpos YN-003, y YN-035 a YN-039, en donde las subrayadas son las CDR determinadas según el método de definición de Kabat. La figura 10 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligeras y secuencias de la línea germinal relacionada de los anticuerpos YN-003 y YN-035 a YN-039, en donde las subrayadas son las CDR determinados según la definición de Kabat. De aquellas, la secuencia de aminoácidos de HCDR1 del anticuerpo YN-003 es mostrada en SEQ ID NO: 46, la secuencia de aminoácidos de HCDR1 de YN-035 a YN-039 es mostrada en SEQ ID NO: 47; la secuencia de aminoácidos de HCDR2 del anticuerpo YN-003 y la secuencia de aminoácidos de HCDR2 de los anticuerpos YN-035 a YN-039 es mostrada en SEQ ID NO: 48; la secuencia de aminoácidos de HCDR3 de YN-003 es mostrada en SEQ ID NO: 50; la secuencia de aminoácidos de HCDR3 de YN-035 es mostrada en SEQ ID NO: 51; y la secuencia de aminoácidos de HCDR3 de los anticuerpos YN-036 a YN-039 es mostrada en SEQ ID NO: 52.

La secuencia de aminoácidos de la LCDR1 del anticuerpo YN-003 es mostrada en SEQ ID NO: 54, la secuencia de aminoácidos de la LCDR1 de los anticuerpos YN-035 y YN-036 es mostrada en SEQ ID NO: 55, la secuencia de aminoácidos de la LCDR1 del anticuerpo YN-037 es mostrada en SEQ ID NO: 56, la secuencia de aminoácidos de la LCDR1 del anticuerpo YN-038 es mostrada en SEQ ID NO: 57, la secuencia de aminoácidos de la LCDR1 del anticuerpo YN-039 es mostrada en SEQ ID NO: 58; la secuencia de aminoácidos de la LCDR2 del anticuerpo YN-003 y los anticuerpos YN-035 a YN-036 es mostrada en SEQ ID NO: 60, la secuencia de aminoácidos de la LCDR2 de los anticuerpos YN-037 a YN-039 es mostrada en SEQ ID NO: 61; la secuencia de aminoácidos de la LCDR3 del anticuerpo YN-003 es mostrada en SEQ ID NO: 63; y la secuencia de aminoácidos de la LCDR3 de los anticuerpos YN-035 a YN-039 es mostrada en SEQ ID NO: 64.

La actividad de unión de los anticuerpos PD-L1 YN-035, YN-036, YN-037, YN-038, YN-039 a PD-L1 humana se detectó mediante citometría de flujo: a 1×10^6 /ml de las células CHO que se añadió PD-L1 humana expresado de forma estable con anticuerpos individuales PD-L1 diluidos doblemente. La mezcla se mezcló bien y se incubó a 4°C durante 1 hora. Después del lavado de células, se añadió IgG-Fc antihumano de cabra F (ab')₂ (DyLight 650) (ab98593, Abcam) y se incubó a 4°C durante 30 min. Después del lavado de las células, se detectó la intensidad de la fluorescencia mediante un citómetro de flujo (Intellicyt iQue Screener). Los resultados experimentales se muestran en la figura 11: YN-035, YN-036, YN-037, YN-038, YN-039 pueden unirse eficazmente a las células CHO que expresan PD-L1 humana.

La capacidad inhibitoria de los anticuerpos YN-035, YN-036, YN-037, YN-038, YN-039 frente a PD-L1 humana/PD-1 humana se detectó mediante citometría de flujo: la proteína PD-1-Fc humana (Origincell Therapeutics Co., Ltd.) se marcó con biotina (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin, Pierce, 21327). La PD-1-Fc humana marcada con una concentración subsaturada de biotina se añadió a 1×10^6 /ml de las células CHO que expresaban de forma estable el PD-L1 humano, y luego se añadieron inmediatamente anticuerpos individuales doblemente diluidos, se mezclaron bien y se incubaron (4°C, 1 hora). Después del lavado de las células, se añadió el conjugado de estreptavidina R-PE (tecnología de vida, SA10041) y se incubó (4°C, 30 min). Después del lavado de las células, se detectó la intensidad de la fluorescencia mediante un citómetro de flujo (Intellicyt iQue Screener). Los resultados experimentales se muestran en la figura 12: los anticuerpos PD-L1 YN-035, YN-036, YN-037, YN-038, YN-039 pueden inhibir eficazmente la unión de PD-1 humana a células CHO que expresan células humanas PD-L1.

La actividad de unión de los anticuerpos PD-L1 YN-035, YN-036, YN-037, YN-038, YN-039 a PD-L1 de ratón se detectó mediante citometría de flujo: a 1×10^6 /ml de células CHO que expresaban de manera estable se añadieron anticuerpos PD-L1 diluidos dobles individuales de PD-L1 de ratón. La mezcla se mezcló bien y se incubó a 4°C durante 1 hora. Después del lavado de células, se añadió IgG-Fc antihumano de cabra F (ab')₂ (DyLight 650) (ab98593) y se incubó a 4°C durante 30 min. Después del lavado de las células, se detectó la intensidad de la fluorescencia mediante un citómetro de flujo (Intellicyt iQue Screener). Los resultados experimentales se muestran en la figura 13: YN-035, YN-036, YN-037, YN-038, YN-039 pueden unirse eficazmente a las células CHO que expresan PD-L1 de ratón.

La capacidad inhibitoria de los anticuerpos PD-L1 YN-035, YN-036, YN-037, YN-038, YN-039 frente a PD-L1 de ratón/PD-1 de ratón se detectó mediante citometría de flujo: PD-1-Fc de ratón (Origincell Therapeutics Co., Ltd.) se marcó con biotina (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin, Pierce, 21327). La PD-1-Fc de ratón marcado con una concentración subsaturada de biotina se añadió a 1×10^6 /ml de las células CHO que expresaban de forma estable la PD-L1 de ratón, y luego se añadieron

inmediatamente anticuerpos individuales diluidos doblemente, se mezclaron bien y se incubaron (4°C, 1 hora). Después del lavado de las células, se añadió el conjugado de estreptavidina R-PE (tecnología de vida, SA10041) y se incubó (4°C, 30 min). Después del lavado de las células, se detectó la intensidad de la fluorescencia mediante un citómetro de flujo (Intellicyt iQue Screener). Los resultados se muestran en la figura 14: los anticuerpos PD-L1 YN-035, YN-036, YN-037, YN-038, YN-039 pueden inhibir eficazmente la unión de PD-1 de ratón a las células CHO que establemente expresó PD-L1 de ratón.

EJEMPLO 17

Construcción e identificación de anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/CD137 YN-051 e YN-052

El primer gen polipeptídico del anticuerpo biespecífico anti-PD-L1/CD137 YN-051 se construyó mediante un método de clonación molecular, como por ejemplo, PCR superpuesta, mutación dirigida al sitio o similar, utilizando el gen de la cadena pesada del anticuerpo anti-PD-L1 YN-035 y los genes de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo CD137 anti-humano YN-006, y clonados por recombinación en el vector pCMV-IgG1AEM doblemente digerido con AgeI y BamHI, para construir el primer vector de expresión polipeptídica de YN-051. El segundo gen polipeptídico de YN-051 es el mismo que el gen de la cadena ligera de YN-035. El segundo vector de expresión polipeptídica de YN-035 es el vector de expresión de cadena ligera de YN-035.

Después de la secuenciación correcta, el primer polipéptido y el segundo vector de expresión de polipéptido del anticuerpo biespecífico anti-PD-L1/CD137 YN-051 se cotransfectaron en células 293F para expresión transitoria. Después de cultivar en medio sin suero durante 7 días, se recogió el sobrenadante del cultivo celular y se purificó mediante una columna de proteína A para obtener la proteína del anticuerpo. El anticuerpo purificado se dializó con PBS y finalmente se cuantificó con el kit de ensayo de proteína BCA (Pierce, 23225).

La secuencia de aminoácidos del primer polipéptido de YN-051 se muestra en SEQ ID NO: 43, y la secuencia de aminoácidos del segundo polipéptido de YN-051 se muestra en SEQ ID NO: 34.

El primer gen polipeptídico del anticuerpo biespecífico anti-PD-L1/CD137 YN-052 se construyó mediante un método de clonación molecular, como por ejemplo, PCR superpuesta, mutación dirigida al sitio o similar, utilizando el gen de la cadena pesada del anticuerpo anti-PD-L1 YN-036 y los genes de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo CD137 anti-humano YN-006, y clonados por recombinación en el vector pCMV-IgG1AEM doblemente digerido con AgeI y BamHI, para construir el primer vector de expresión polipeptídica de YN-052. El segundo gen polipeptídico de YN-052 es el

mismo que el gen de la cadena ligera de YN-036. El segundo vector de expresión polipeptídica de YN-052 es el vector de expresión de cadena ligera de YN-036.

Después de la secuenciación correcta, el primer polipéptido y el segundo vector de expresión de polipéptido del anticuerpo biespecífico anti-PD-L1/CD137 YN-052 se cotransfectaron en células 293F para expresión transitoria. Después de cultivar en medio sin suero durante 7 días, se recogió el sobrenadante del cultivo celular y se purificó mediante una columna de proteína A para obtener la proteína del anticuerpo. El anticuerpo purificado se dializó con PBS y finalmente se cuantificó con el kit de ensayo de proteína BCA (Pierce, 23225).

La secuencia de aminoácidos del primer polipéptido de YN-052 se muestra en SEQ ID NO: 44, y la secuencia de aminoácidos del segundo polipéptido de YN-052 se muestra en SEQ ID NO: 34.

La afinidad de unión de los anticuerpos biespecíficos YN-051 e YN-051 anti-PD-L1/CD137 a la proteína PD-L1-His humana recombinante (Origincell Therapeutics Co., Ltd.) se midió mediante un analizador de interacción molecular (Octet RED384 , adquirido de Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.). La cinética de unión de antígeno-anticuerpo se analizó mediante la tecnología de interferencia de biopelícula (BLI), utilizando un analizador de interacción molecular (Octet RED384, adquirido de Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) Y utilizando un regulador de pH PBS que contiene 0.1% de BSA y 0.02% de Tween 20. El anticuerpo con una concentración de 50 nM se fijó con el sensor AHC y se unió a 1500 rpm durante 5 minutos; luego se unió con la solución de antígeno doblemente diluida (50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 nM) con 7 gradientes de concentración a 1500 rpm durante 5 minutos; y finalmente se disocia a 1500 rpm durante 10 minutos. El sensor AHC se regeneró mediante pulsos de glicina y luego se reutilizó. Los resultados obtenidos serían analizados por el software Octet Data Analysis 9.0 (Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) para dar K_D , $K_{activada}$ (1/Ms) y $K_{desactivada}$ (1/s). Los resultados medidos de la afinidad de unión de YN-007 a PD-L1-Fc humana se muestran en el cuadro 10.

CUADRO 10

Afinidad de unión del anticuerpo biespecífico anti-PD-L1/CD137 a la PD-L1-His humana

Anticuerpo	PD-L1-His humana						
	K_D (M)	K_D Error	K_{aso} (1/Ms)	K_{aso} Error	K_{diso} (1/s)	K_{diso} Error	R^2 completo
YN-051	5.17×10^{-10}	4.97×10^{-12}	5.32×10^5	2.54×10^3	2.75×10^{-4}	2.29×10^{-6}	0.9981
YN-052	5.72×10^{-10}	5.69×10^{-12}	4.48×10^5	2.06×10^3	2.57×10^{-4}	2.26×10^{-6}	0.9984

La afinidad de unión de los anticuerpos biespecíficos YN-051 e YN-052 anti-PD-L1/CD137 a la proteína CD137-His humana recombinante (Origincell Therapeutics Co., Ltd.) se midió mediante un analizador de interacción molecular (Octet RED384, adquirido de Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.). La cinética de unión de antígeno-anticuerpo se analizó mediante la tecnología de

interferencia de biopelícula (BLI), utilizando un analizador de interacción molecular (Octet RED384, adquirido de Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) Y utilizando un regulador de pH PBS que contiene 0.1% de BSA y 0.02% de Tween 20. El anticuerpo con una concentración de 50 nM se fijó con el sensor AHC y se unió a 1500 rpm durante 5 minutos; luego se unió con la solución de antígeno de proteína CD137-His humana recombinante doblemente diluida (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 nM) a 1500 rpm durante 5 minutos; y finalmente se disocia a 1500 rpm durante 10 minutos. El sensor AHC se regeneró mediante pulsos de glicina y luego se reutilizó. Los resultados obtenidos serían analizados por el software Octet Data Analysis 9.0 (Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) para dar K_D , K_{aso} (1/Ms) y K_{diso} (1/s).

Los resultados medidos de la afinidad de unión de los anticuerpos biespecíficos YN-051 e YN-052 anti-PD-L1/CD137 a CD137 humana se muestran en el cuadro 11.

CUADRO 11

Afinidad de unión del anticuerpo biespecífico anti-PD-L1/CD137 a la CD137-His humana

Anticuerpo	4-1BB-His humana						
	K_D (M)	K_D Error	kasó (1/Ms)	kasó Error	kdis (1/s)	kdis error	R ² completo
YN-051	1.64×10^{-9}	3.93×10^{-11}	8.99×10^4	7.25×10^2	1.47×10^{-4}	3.33×10^{-6}	0.9981
YN-052	2.08×10^{-9}	4.36×10^{-11}	8.37×10^4	6.93×10^2	1.74×10^{-4}	3.35×10^{-6}	0.9982

La cepa de células de mama humana MDA-MB-231 (Biblioteca de células de la Academia China de Ciencias de Shanghai) expresa en gran medida la molécula PD-L1 humana. La unión de los anticuerpos PD-1 YN-035, YN-036 y los anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/CD137 YN-051 e YN-052 a las células MDA-MB-231 se detectó mediante citometría de flujo: a 1×10^6 /ml de células MDA-MB-231 se añadieron anticuerpos individuales doblemente diluidos, respectivamente, se mezclaron bien y se incubaron a 4°C durante 1 hora. Después del lavado celular, se añadió IgG-Fc antihumano de cabra F (ab')₂ (DyLight 650) (ab98593, abcam) y se incubó a 4°C durante 30 min. Después del lavado de las células, se detectó la intensidad de la fluorescencia mediante un citómetro de flujo (Intellicyt iQue Screener). Los resultados experimentales se muestran en la figura 15: YN-035, YN-036, YN-051 e YN-052 pueden unirse eficazmente a las células MDA-MB-231.

La actividad de unión de los anticuerpos PD-1 YN-035, YN-036 y los anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/CD137 YN-051 e YN-052 a PD-L1 humana se detectó mediante citometría de flujo: a 1×10^6 /ml de las células CHO que expresaron de forma estable PD-L1 humana se les añadieron anticuerpos individuales diluidos doblemente, respectivamente, se mezclaron bien y se incubaron a 4°C durante 1 hora. Después del lavado celular, se añadió IgG-Fc antihumano de cabra F (ab')₂ (DyLight 650) (ab98593, abcam) y se incubó a 4°C durante 30 min. Después del lavado de las células, se detectó la intensidad de la fluorescencia mediante un citómetro de flujo (Intellicyt iQue Screener). Los resultados experimentales se muestran en la figura 16: YN-035, YN-036, YN-051, YN-052, YN-007 pueden unirse eficazmente a las células CHO que expresan PD-L1 humana.

Se detectó la capacidad inhibidora de los anticuerpos PD-1 YN-035, YN-036 y los anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/CD137 YN-051, YN-052, YN-007 frente a PD-L1 humana/PD-1 humana. por citometría de flujo: la proteína PD-1-Fc humana se marcó con biotina (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin, Pierce, 21327). La PD-1-Fc humana marcada con una concentración subsaturada de biotina se añadió a 1×10^6 /ml de las células CHO que expresaban de forma estable el PD-L1 humano, y luego se añadieron inmediatamente anticuerpos individuales doblemente diluidos, se mezclaron bien y se incubaron (4°C , 1 hora). Después del lavado de las células, se añadió el conjugado de estreptavidina R-PE (tecnología de vida, SA10041) y se incubó (4°C , 30 min). Después del lavado de las células, se detectó la intensidad de la fluorescencia mediante un citómetro de flujo (Intellicyt iQue Screener). Los resultados experimentales se muestran en la figura 17: los anticuerpos de PD-L1 YN-035, YN-036, YN-051, YN-052, YN-007 pueden inhibir eficazmente la unión de PD-1 humana a las células CHO que expresan PD-L1 humana.

La actividad de unión de los anticuerpos PD-1 YN-035, YN-036 y los anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/CD137 YN-007, YN-051 e YN-052 a PD-L1 de ratón se detectó mediante citometría de flujo: a 1×10^6 /ml de las células CHO que expresaban de forma estable PD-L1 de ratón se añadieron anticuerpos individuales diluidos doblemente, respectivamente, se mezclaron bien y se incubaron a 4°C durante 1 hora. Después del lavado celular, se añadió IgG-Fc antihumano de cabra F (ab')₂ (DyLight 650) (ab98593, abcam) y se incubó a 4°C durante 30 min. Después del lavado de las células, se detectó la intensidad de la fluorescencia mediante un citómetro de flujo (Intellicyt iQue Screener). Los resultados experimentales se muestran en la figura 18: YN-035, YN-036, YN-051, YN-052, YN007 pueden unirse eficazmente a las células CHO que expresan PD-L1 de ratón.

Se detectó la capacidad inhibitoria de los anticuerpos PD-1 YN-035, YN-036 y los anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/CD137 YN-007, YN-051 e YN-052 frente a PD-L1 de ratón/PD-1 de ratón por citometría de flujo: la PD-1-Fc de ratón marcada con biotina (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin, Pierce, 21327). La PD-1-Fc de ratón marcado con una concentración subsaturada de biotina se añadió a 1×10^6 /ml de células CHO que expresaban de forma estable PD-L1 de ratón, y luego se añadieron inmediatamente anticuerpos individuales diluidos doblemente, se mezclaron bien y se incubaron (4°C , 1 hora). Después del lavado de las células, se añadió el conjugado de estreptavidina R-PE (tecnología de vida, SA10041) y se incubó (4°C , 30 min). Después del lavado de las células, se detectó la intensidad de la fluorescencia mediante un citómetro de flujo (Intellicyt iQue Screener). Los resultados se muestran en la figura 19: los anticuerpos PD-L1 YN-035, YN-036, YN-051, YN-052, YN-007 pueden inhibir eficazmente la unión de PD-1 de ratón a las células CHO que expresan PD-L1 de ratón.

La actividad de unión del anticuerpo CD137 YN-006 y los anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/CD137 YN-007, YN-051 e YN-052 a CD137 de humano se detectó mediante citometría de flujo: a 1×10^6 /ml de células 293T que expresan de forma estable el CD137 humano, se añadieron

anticuerpos individuales diluidos doblemente, respectivamente, se mezclaron bien y se incubaron a 4°C durante 1 hora. Después del lavado celular, se añadió IgG-Fc antihumano de cabra F(ab')₂ (DyLight 650) (ab98593, abcam) y se incubó a 4°C durante 30 min. Después del lavado de las células, se detectó la intensidad de la fluorescencia mediante un citómetro de flujo (Intellicyt iQue Screener). Los resultados experimentales se muestran en la figura 20: YN-006, YN-007, YN-051 e YN-052 pueden unirse eficazmente a las células 293T que expresan CD137 humana.

EJEMPLO 18

Análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE)

10

Después de ser purificados como anteriormente, los anticuerpos YN-003, YN-006, YN-007, YN-035, YN-036, YN-051, YN-052 se midieron por SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras para su pesos moleculares. Los resultados se muestran en las figuras 21A y 21B: en condiciones no reductoras (como se muestra en la figura 21A), los anticuerpos monoclonales YN-003, YN006, YN-035 e YN-036 se presentan todos como una banda con un peso molecular de aproximadamente 150 kDa, mientras que los anticuerpos biespecíficos YN-007, YN -051, YN-052 son todos presentados como una banda con un peso molecular de aproximadamente 200 kDa. En condiciones reductoras (como se muestra en la figura 21B), los anticuerpos monoclonales YN-003, YN006, YN-035 e YN-036 se presentan todos como dos bandas con un peso molecular de aproximadamente 55 kDa y 25 kDa, mientras que los anticuerpos biespecíficos YN-007, YN-051, YN-052 se presentan todos como dos bandas con un peso molecular de aproximadamente 75 kDa y 25 kDa.

20

EJEMPLO 19

Actividad agonista del anticuerpo biespecífico anti-PD-L1/CD137 (ensayo de actividad luciferasa)

25

Se prepararon células 293T que expresan CD137 humano y el gen indicador de luciferasa NFκB integrado de forma estable. Las células se recolectaron, lavaron y resuspendieron en medio completo sin rojo fenol (medio DMEM que contenía suero bovino fetal al 10%, regulador de pH HEPES, aminoácidos no esenciales y L-glutamina) a una densidad de 6 x 10⁵ células/ml. Se colocaron placas de 96 pozos (adquiridas en PerkinElmer) y se añadieron 50 µl de suspensión celular a cada pozo. Se añadió un anticuerpo reticulado (anti-IgG humana Fc de cabra) en una proporción de 2.5: 1, luego YN-006 (10 µg/ml), YN-035 (10 µg/ml), YN-035 + YN-006 (10 µg/ml+10 µg/ml), YN-051 (10 µg/ml), YN-003 + YN006 (10 µg/ml+10 µg/ml), YN-007 (10 µg/ml) y anticuerpo de control IgG Fc (10

35

µg/ml) se añadieron, respectivamente, y se incubaron a 37°C durante 5 horas. Posteriormente, se añadieron 75 µl de reactivo Bright-Glo luciferasa (adquirido en Promega) y se midió la actividad luciferasa con un lector de microplacas (adquirido en Tecan). Se comparó la relación de los valores de fluorescencia celular de cada grupo celular tratado con anticuerpo con respecto al grupo no tratado con anticuerpo (ver la figura 22). Los resultados muestran que, en comparación con el control IgG Fc, YN-006, YN035 + YN006, YN003 + YN006, YN-007, YN-051 todos tienen una actividad agonista obvia, mientras que el anticuerpo anti-PD-L1 YN-035 no (ver la figura 22).

EJEMPLO 20

Estudios del efecto antitumoral del anticuerpo biespecífico anti-PD-L1/CD137 en ratones portadores de cáncer de colon

El día 0, ratones hembra C57BL/6 de 6-8 semanas de edad con ratones 4-1BB humanos (B-hTNFRSF9 (4-1BB), adquiridos en Beijing Biocytogen Co., Ltd.) se inocularon por vía subcutánea con 3×10^6 MC38 de ratón colorrectal células cancerosas (Shanghai Linyuan Biotechnology Co., Ltd.). El día 6, los ratones se dividieron uniformemente en 8 grupos. Los ratones portadores de tumores de cada grupo fueron inyectados intraperitonealmente con PBS (dos veces por semana, dos semanas en total), proteína IgG-Fc humana de anticuerpo de control (7.5 mg/kg, dos veces por semana, dos semanas en total), anticuerpo CD137 YN -006 (3 mg/kg, dos veces por semana, dos semanas en total), PD-L1 anticuerpo YN-035 (7.5 mg/kg, dos veces por semana, dos semanas en total), anticuerpo CD137 anticuerpo YN-006 (3 mg/kg, dos veces por semana, dos semanas en total) + anticuerpo PD-L1 YN-035 (7.5 mg/kg, dos veces por semana, dos semanas en total), anticuerpo biespecífico anti-PD-L1/CD137 YN-051 (7.5 mg/kg, dos veces por semana, dos semanas en total), anticuerpo anti-PD-L1 Atezolizumab (7.5 mg/kg, dos veces por semana, dos semanas en total) y anticuerpo anti-PD-L1 Avelumab (7.5 mg/kg, dos veces por semana, dos semanas en total), respectivamente. Excepto que el grupo de PBS incluía 5 ratones, cada uno de los 7 grupos restantes incluía 6 ratones. Los ratones de cada grupo se observaron regularmente para determinar el cambio de peso corporal y tamaño del tumor. Los resultados experimentales se muestran en la figura 23 y el cuadro 12. La figura 23 muestra que YN006, YN035, YN006 + YN035, YN051, Atezolizumab y Avelumab tienen todos una actividad antitumoral significativa en comparación con el grupo PBS o el grupo IgG-Fc humano del anticuerpo de control. Entre ellos, las actividades antitumorales de YN006 + YN035 y YN051 son significativamente más fuertes que las de YN006, YN035, Atezolizumab y Avelumab. El cuadro 12 muestra que al final del experimento con animales, 5 ratones en el grupo YN051 tuvieron una regresión completa de los tumores, mientras que solo 1 ratón en el grupo YN006 + YN035 tuvo una regresión total de los tumores, lo que indica que el efecto terapéutico de YN051 fue mejor que el

de YN006 + YN035.

CUADRO 12

Número de ratones en los que se eliminan completamente los tumores de cada grupo

Anticuerpo	Número de ratones en los que los tumores se eliminaron por completo/número total de animales de experimentación en cada grupo
PBS	0/5
IgG1 Fc de humano	0/6
Atezolizumab	0/6
Avelumab	0/6
YN-006	0/6
YN-035	1/6
YN-006+YN-035	1/6
YN-051	5/6

5 La descripción detallada anterior se proporciona a modo de explicación y ejemplos, y no pretende limitar el alcance de las reivindicaciones adjuntas. En la actualidad, una variedad de cambios en las modalidades enumeradas en este documento son obvios para los seres humanos con conocimientos ordinarios en la técnica, y están dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas y sus soluciones equivalentes.