

ANTICUERPOS PARA UN LIGANDO 1 DE MUERTE PROGRAMADA (PD-L1) Y SU APLICACIÓN

La presente solicitud reivindica prioridad de la Solicitud de Patente de China Nro. 201810575543.4, presentada el 6 de junio de 2018, con título ANTICUERPOS PARA UN LIGANDO 1 DE MUERTE PROGRAMADA (PD-L1) Y SU APLICACIÓN, cuyo contenido se incorpora aquí en su totalidad como referencia.

Campo de la invención

La presente invención hace referencia al campo biomédico, y revela específicamente anticuerpos en contra del ligando 1 de muerte programada (PD-L1) y sus aplicaciones, particularmente, en el tratamiento o prevención de enfermedades relacionadas con el PD-L1.

Antecedentes

El ligando 1 de muerte programada (PD-L1) es un miembro de la familia de receptores CD28, que incluye CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1 and BTLA. Los primeros miembros de esta familia, CD28 e ICOS, fueron descubiertos por tener la función de mejorar la proliferación de las células T luego de agregar anticuerpos monoclonales. Se han identificado dos ligandos de glicoproteínas de superficie celular para PD-1, PD-L1 y PD-L2. Se ha demostrado que luego de unirse al PD-1, ellos disminuyen la activación de las células T y la secreción de citoquina. El PD-L1 (B7-H1) y el PD-L2 (B7-DC) son homólogos de B7, que pueden unirse al PD-1 pero no se unen a otros miembros de la familia CD28.

La expresión de PD-L1 se ha encontrado en varios cánceres de humanos y de ratones, incluyendo el cáncer de pulmón, el cáncer de ovario, el cáncer de colon, el melanoma y mieloma múltiple. Los resultados han demostrado que el PD-L1, el cual es altamente expresado por células tumorales, puede incrementar la apoptosis de las células T por lo que juega un papel importante en el escape inmune de tumores. Los investigadores hallaron que la línea celular tumoral P815 transfectada con el gen PD-L1 puede resistir la lisis de los CTL específicos *in vitro*, y después de la inoculación en ratones, presenta mayor tumorigenicidad e invasividad. Estas características biológicas se pueden revertir bloqueando el PD-L1. En los ratones *knockout* con gen PD-1, se bloquea la ruta PD-L1/PD-1, y las células tumorales inoculadas no pueden formar tumores. También se ha sugerido que el PD-L1 puede estar relacionado con la inflamación de la mucosa intestinal, y la inhibición del PD-L1 evita la enfermedad atrófica relacionada con la colitis.

Algunos anticuerpos contra el PD-L1 han sido desarrollados en el arte previo, como en el documento MDX-1105 (WO2007/005874), Tecentriq (Atezolizumab), etc. No obstante, en la

técnica existe la necesidad de anticuerpos anti-PD-L1 que puedan unirse al PD-L1 con alta afinidad y que pueda bloquear la unión del PD-1 con el PD-L1.

Resumen de la invención

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo contra el PD-L1 (anticuerpo PD-L1) o un fragmento de unión a antígeno de este, en el que el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno reconoce específicamente y se une al PD-L1.

En una realización, el anticuerpo PD-L1 comprende el Anticuerpo B10 Anti-PD-L1, Anticuerpo B11 Anti-PD-L1, Anticuerpo H12 Anti-PD-L1 o una combinación de estos, particularmente, el Anticuerpo B11 de PD-L1.

En una realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno puede reconocer y unirse específicamente al PD-L1, en el que la afinidad es 1×10^{-9} M o menos, preferiblemente 5×10^{-10} M o menos, más preferiblemente 1×10^{-10} M o menos.

En un aspecto, se proporciona un Anticuerpo B10 contra PD-L1 (también conocido como Anticuerpo B10 PD-L1 o Anticuerpo B10 en este documento) o un fragmento de unión a antígeno de este,

donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena liviana y una región variable de la cadena pesada, en donde

la región variable de la cadena pesada comprende:

H-CDR1, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1,

H-CDR2, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2, y

H-CDR3, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 3;

la región variable de la cadena liviana comprende:

L-CDR1, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5,

L-CDR2, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 6, y

L-CDR3, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 7.

En una realización, el Anticuerpo B10 PD-L1 comprende una región variable de la cadena pesada, en el que la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO:4 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o más de identidad de secuencia de la SEQ ID NO: 4.

En otra realización, el Anticuerpo B10 PD-L1 comprende una región variable de la cadena liviana, en el que la región variable de la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO:8 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o más de identidad de secuencia de la SEQ ID NO: 8.

En otro aspecto, se proporciona un Anticuerpo B11 contra PD-L1 (también conocido como Anticuerpo B11 PD-L1 o Anticuerpo B11 en este documento) o un fragmento de unión a antígeno de este,

donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena liviana y una región variable de la cadena pesada, en donde

la región variable de la cadena pesada comprende:

H-CDR1, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 9,

H-CDR2, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 10, y

H-CDR3, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 11;

la región variable de la cadena liviana comprende:

L-CDR1, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 13,

L-CDR2, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 14, y

L-CDR3, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 15.

En una realización, el Anticuerpo B11 PD-L1 comprende una región variable de la cadena pesada, en el que la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO:12 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o más de identidad de secuencia de la SEQ ID NO: 12.

En otra realización, el Anticuerpo B11 PD-L1 comprende una región variable de la cadena liviana, en el que la región variable de la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO:16 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o más de identidad de secuencia de la SEQ ID NO: 16.

En otra realización, el Anticuerpo B11 PD-L1 comprende una cadena pesada, en el que la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO:28 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o más

de identidad de secuencia de la SEQ ID NO: 28.

En otra realización, el Anticuerpo B11 PD-L1 comprende una cadena liviana, en el que la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos como se muestran en la SEQ ID NO: 27 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o más de identidad de secuencia de la SEQ ID NO: 27.

En otro aspecto, se proporciona un Anticuerpo H12 contra PD-L1 (también conocido como Anticuerpo H12 PD-L1 o Anticuerpo H12 en este documento) o un fragmento de unión a antígeno de este,

donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena liviana y una región variable de la cadena pesada, en donde

la región variable de la cadena pesada comprende:

H-CDR1, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 17,

H-CDR2, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 18, y

H-CDR3, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 19;

la región variable de la cadena liviana comprende:

L-CDR1, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 21,

L-CDR2, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 22, y

L-CDR3, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 23.

En otra realización, el Anticuerpo H12 PD-L1 comprende una región variable de la cadena pesada, en el que la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 20 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o más de identidad de secuencia de la SEQ ID NO: 20.

En otra realización, el Anticuerpo H12 PD-L1 comprende una región variable de la cadena liviana, en el que la región variable de la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 24 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o más de identidad de secuencia de la SEQ ID NO: 24.

En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con la presente invención o su fragmento de unión a antígeno y un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización, el anticuerpo comprende el

Anticuerpo B10 PD-L1, el Anticuerpo B11 PD-L1, el Anticuerpo H12 PD-L1 o una combinación de estos, particularmente, el Anticuerpo B11 de PD-L1.

En un aspecto, se proporciona el uso del anticuerpo o de su fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la invención o de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad neoplásica.

En otro aspecto, se proporciona un método para tratar una enfermedad neoplásica, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno según la invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención.

En otro aspecto, se proporciona el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la invención o de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención, para su uso en el tratamiento de una enfermedad neoplásica.

En una realización, el anticuerpo mencionado comprende el Anticuerpo B10 PD-L1, el Anticuerpo B11 PD-L1, el Anticuerpo H12 PD-L1 o una combinación de estos, particularmente, el Anticuerpo B11 de PD-L1.

Aún en otra realización, la enfermedad neoplásica es un tumor positivo para PD-L1. En otra realización, el tumor positivo para PD-L1 es cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, melanoma o mieloma, particularmente cáncer colorrectal o cáncer de pulmón de células no pequeñas.

En algunas realizaciones, el método o uso anterior comprende además la administración de otra terapia antitumoral, por ejemplo, la administración de un agente quimioterapéutico, un anticuerpo dirigido a otro antígeno específico de tumor o radioterapia.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada, que codifica el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención. En otro aspecto, se proporciona un vector de expresión, que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención. En otro aspecto, se proporciona una célula huésped, que se transforma con la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención o el vector de expresión de acuerdo con la invención.

Breve Descripción de los Dibujos

Figura 1: Curva de unión de anticuerpos candidatos.

Figura 2: Resultados de ELISA del Anticuerpo B10, B11 y H12.

Figura 3: Resultados de la activación de células T, aumento de los niveles de expresión de IFN γ e IL-2 por el Anticuerpo B10, B11, H12.

Figura 4: Resultados de bloquear la unión entre hPD-L1 y hPD-1 mediante el Anticuerpo B11.

Figura 5: Resultados de bloquear la interacción entre CD80 and PD-L1 mediante el Anticuerpo B11.

Figura 6: Resultados de la actividad biológica celular del Anticuerpo B11.

Figura 7: Resultados de la inhibición del crecimiento tumoral mediante el Anticuerpo B11.

Figura 8: Resultados de la inhibición de la actividad tumoral mediante el Anticuerpo B11.

Descripción Detallada

Definición

En el presente contexto, a menos que se especifique lo contrario, los términos científicos y técnicos que aquí se emplean tienen significados comúnmente conocidos por una persona experta en la técnica. Además, la química de proteínas y ácidos nucleicos, la biología molecular, el cultivo de células y tejidos, la microbiología, los términos relacionados con la inmunología y los procedimientos de laboratorio aquí utilizados son términos y procedimientos de rutina ampliamente utilizados en el campo. Al mismo tiempo, para comprender mejor la invención, se proporcionan las siguientes definiciones y explicaciones.

Como se utiliza en el presente documento, "al menos uno" o "uno o más" puede significar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más.

Como se utiliza en este documento, el término "anticuerpo" se refiere a la inmunoglobulina y al fragmento de inmunoglobulina, ya sea natural o parcial o totalmente producido de manera sintética (por ejemplo, recombinante), que comprende cualquier fragmento que comprende al menos parte de la región variable de una molécula de inmunoglobulina y que conserva la especificidad de unión de la inmunoglobulina de longitud completa. Por tanto, un anticuerpo incluye cualquier proteína que tenga un dominio de unión que sea homólogo o sustancialmente homólogo a un dominio de unión al antígeno de inmunoglobulina (sitio de unión del anticuerpo). Un anticuerpo incluye un fragmento de anticuerpo. Como se utiliza en el presente documento, el término anticuerpo comprende anticuerpo sintético, anticuerpo recombinante, anticuerpo multi específico (por ejemplo, anticuerpo biespecífico), anticuerpo humano, anticuerpo no humano, anticuerpo humanizado, anticuerpo quimérico, anticuerpo intracelular y fragmento de anticuerpo, como por ejemplo, el fragmento Fab, el Fragmento Fab', el fragmento F(ab')₂, el fragmento Fv, el Fv unido por disulfuro (dsFv), el fragmento Fd, el fragmento Fd', el Fv monocatenario (scFv), el Fab monocatenario (scFab), el diacuerpo, el anticuerpo de anti-idiotipo (anti-Id), o el fragmento de unión a antígeno, entre otros, de cualquiera de los anticuerpos anteriores. Los anticuerpos aquí proporcionados incluyen cualquier tipo de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG, IgM, IgD, IgE, IgA e IgY), cualquier miembro de clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o de subclase (por ejemplo, IgG2a e IgG2b). En una realización preferida, el anticuerpo de acuerdo con la invención es un anticuerpo humano.

Como se utiliza en el presente documento, un "fragmento de anticuerpo" o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo se refiere a cualquier parte de un anticuerpo de longitud

completa, que es más corta que la longitud completa, pero al menos comprende parte de la región variable del anticuerpo que se une al antígeno (tal como una o más CDR o uno o más sitios de unión de los anticuerpos) y, por lo tanto, retiene la especificidad de unión y al menos parte de la capacidad de unión específica del anticuerpo de longitud completa. Por tanto, un fragmento de unión a antígeno hace referencia a un fragmento de anticuerpo, que comprende la parte de unión a antígeno que se une al mismo antígeno que el anticuerpo del que se deriva el fragmento de anticuerpo. Un fragmento de anticuerpo incluye un derivado de anticuerpo producido por tratamiento enzimático de un anticuerpo de longitud completa y un derivado producido sintéticamente, tal como un derivado producido de forma recombinante. Un anticuerpo incluye un fragmento de anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv monocatenario (scFv), Fv, dsFv, diacuerpo, fragmentos Fd y Fd' y otros fragmentos, incluidos los fragmentos modificados (véase, por ejemplo, *Methods in Molecular Biology*, Vol 207: *Recombinant Antibodies for Cancer Therapy Methods and Protocols* (2003); Capítulo 1; pág. 3 a 25, Kipriyanov). El fragmento puede incluir múltiples cadenas unidas entre sí, por ejemplo, mediante un enlace disulfuro o mediante un enlazador peptídico. Un fragmento de anticuerpo generalmente contiene al menos, o aproximadamente, 50 aminoácidos, y normalmente al menos, o aproximadamente, 200 aminoácidos. Un fragmento de unión a antígeno incluye cualquier fragmento de anticuerpo que cuando se inserta en la estructura del anticuerpo (por ejemplo, reemplazando una región correspondiente), obtiene un anticuerpo que se une inmuno específicamente al antígeno.

Como se utiliza en el presente documento, un “anticuerpo convencional” hace referencia a un anticuerpo que incluye dos cadenas pesadas (las cuales pueden designarse como H y H') y dos cadenas livianas (las cuales pueden designarse como L y L') y dos sitios de unión a antígeno, en donde cada una de las cadenas pesadas puede ser una cadena pesada de inmunoglobulina de longitud completa o cualquiera de sus regiones funcionales que retiene la capacidad de unión antígeno (por ejemplo, la cadena pesada incluye, entre otras, la cadena V_H, la cadena V_H-C_H1 y la cadena V_H-C_H1-C_H2-C_H3), y cada una de las cadenas livianas puede ser una cadena liviana de longitud completa o cualquier región funcional (por ejemplo, una cadena liviana incluye, entre otras, una cadena V_L y una cadena V_L-C_L). Cada una de las cadenas pesadas (H y H') está emparejada con una cadena liviana (L y L', respectivamente).

Como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo de longitud completa se refiere a un anticuerpo que tiene dos cadenas pesadas de longitud completa (por ejemplo, V_H-C_H1-C_H2-C_H3 o V_H-C_H1-C_H2-C_H3-C_H4) y dos cadenas livianas de longitud completa (V_L-C_L) y una región bisagra. Por ejemplo, un anticuerpo producido naturalmente por células B secretoras de anticuerpos y un anticuerpo producido sintéticamente con los mismos dominios.

Como se utiliza en el presente documento, un dsFv se refiere a un Fv con enlaces disulfuro intramoleculares diseñados que estabilizan el par V_H-V_L.

Como se utiliza en este documento, un fragmento Fab es un fragmento de anticuerpo obtenido al digerir una inmunoglobulina de longitud completa con papaína o, por ejemplo, un fragmento con la misma estructura sintetizado por un método recombinante. Un fragmento Fab contiene una cadena liviana (que comprende V_L y C_L) y otra cadena que contiene un dominio variable de la cadena pesada (V_H) y un dominio de región constante de la cadena pesada (C_H1).

Como se utiliza en el presente documento, un fragmento $F(ab')_2$ es un fragmento de anticuerpo obtenido de la digestión de pepsina de inmunoglobulinas con un pH de 4,0 - 4,5, o, por ejemplo, un fragmento con la misma estructura sintetizado por un método recombinante. Un fragmento $F(ab')_2$ básicamente contiene dos fragmentos Fab, donde cada parte de la cadena pesada contiene varios aminoácidos adicionales, incluyendo las cisteínas que forman un enlace disulfuro que conecta los dos fragmentos.

Como se utiliza en el presente documento, un fragmento Fab' es un fragmento que contiene la mitad del fragmento $F(ab')_2$ (una cadena pesada y una cadena liviana).

Como se utiliza en el presente documento, un fragmento scFv se refiere a un fragmento de anticuerpo que comprende una cadena liviana variable (V_L) y una cadena pesada variable (V_H) conectadas covalentemente en cualquier orden mediante un enlazador polipeptídico. La longitud del enlazador permite un puente sustancialmente no interferente de los dos dominios variables. Un enlazador a modo de ejemplo son los residuos $(Gly-Ser)_n$ dispersos con algunos residuos de Glu o Lys para aumentar la solubilidad.

Como se utiliza en el presente documento, un dominio variable o una región variable es un dominio de Ig específico de una cadena pesada o cadena liviana del anticuerpo, que comprende secuencias de aminoácidos que varían entre diferentes anticuerpos. Cada cadena liviana y cada cadena pesada tienen un dominio de región variable V_L y V_H , respectivamente. Los dominios variables proporcionan especificidad de antígeno y, por lo tanto, son responsables del reconocimiento de antígenos. Cada región variable comprende una CDR y una región marco (FR), y la CDR es parte del dominio del sitio de unión al antígeno.

Como se utiliza en el presente documento, "dominio de unión a antígeno" y "sitio de unión a antígeno" se utilizan como sinónimos para referirse al dominio dentro del anticuerpo que reconoce e interactúa físicamente con el antígeno cognado. Una molécula de anticuerpo natural convencional de longitud completa tiene dos sitios de unión al antígeno convencionales, cada uno de los cuales contiene una parte de la región variable de la cadena pesada y una parte de la región variable de la cadena liviana. El sitio de unión al antígeno convencional contiene un bucle que conecta las cadenas β antiparalelas en el dominio de la región variable. El sitio de unión al antígeno puede contener otras partes del dominio de la región variable. Cada sitio de unión a antígeno convencional contiene 3 regiones hipervariables de la cadena pesada y 3 regiones hipervariables de la cadena liviana. La región hipervariable también se denomina región determinante de complementariedad (CDR).

Como se utiliza en el presente documento, "región hipervariable", "HV", "región determinante de complementariedad" y "CDR" y "CDR del anticuerpo" pueden usarse indistintamente y se refieren a cada una de las múltiples partes en las regiones variables que juntas forman el sitio de unión al antígeno del anticuerpo. Cada dominio de región variable contiene 3 CDR, designadas como CDR1, CDR2 y CDR3. Por ejemplo, un dominio de región variable de la cadena liviana contiene 3 CDR, designadas como L-CDR1 (o VL CDR1), L-CDR2 (o VL CDR2) y L-CDR3 (o VL CDR3); un dominio de región variable de la cadena pesada contiene 3 CDR, designadas como H-CDR1 (o VH CDR1), H-CDR2 (o VH CDR2) y H-CDR3 (o VH CDR3). Las 3 CDR en la región variable son discontinuas a lo largo de la secuencia lineal de aminoácidos pero están cerca en el polipéptido plegado. Las CDR están ubicadas en el bucle que conecta las cadenas paralelas de láminas β de los dominios variables. Como se describe en el presente documento, una persona experta en la técnica conoce y puede identificar las CDR basándose en la numeración de Kabat o Chothia (véase, por ejemplo, Kabat, E.A. *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Publicación de los NIH nro. 91-3242, y Chothia, C. *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917).

Como se utiliza en el presente documento, una región marco (FR) es un dominio estructural dentro del dominio de la región variable del anticuerpo ubicado en la lámina β . En términos de secuencia de aminoácidos, la región FR es relativamente más conservadora que la región hipervariable.

Como se utiliza en el presente documento, un dominio de "región constante" es un dominio en la cadena pesada o cadena liviana del anticuerpo, que contiene una secuencia de aminoácidos que está relativamente más conservada que la secuencia de aminoácidos del dominio de región variable. En una molécula de anticuerpo de longitud completa convencional, cada cadena liviana tiene un dominio de región constante (C_L) de cadena liviana única, y cada cadena pesada contiene uno o más dominios de región constante (C_H) de cadena pesada, incluyendo las C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} y C_{H4} . Los isotipos IgA, IgD e IgG de longitud completa contienen C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} y la región bisagra, mientras que el IgE e IgM contienen C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} y C_{H4} . Los dominios C_{H1} y C_L extienden el brazo Fab de la molécula de anticuerpo y, por lo tanto, son útiles para interactuar con los antígenos y girar el brazo del anticuerpo. La región constante del anticuerpo puede servir para funciones efectoras, tales como, eliminar antígenos, patógenos y toxinas unidas específicamente por el anticuerpo, entre otras, por ejemplo interactuando con diversas células, moléculas biológicas y tejidos.

Como se utiliza en el presente documento, una región funcional del dominio V_H es al menos parte del dominio V_H completo que retiene al menos parte de la especificidad de unión del dominio V_H completo (por ejemplo, reteniendo una o más CDR del dominio V_H completo), de manera que la región funcional del dominio V_H solo o en combinación con otro dominio de

anticuerpo (tal como un dominio V_L) o una región de este se una a un antígeno. La región funcional a modo de ejemplo del dominio V_H es una región que comprende una CDR1, CDR2 o CDR3 del dominio V_H .

Como se utiliza en el presente documento, una región funcional del dominio V_L es al menos parte del dominio V_L completo que retiene al menos parte de la especificidad de unión del dominio V_L completo (por ejemplo, reteniendo una o más CDR del dominio V_L completo), de manera que la región funcional del dominio V_L solo o en combinación con otro dominio de anticuerpo (tal como un dominio V_H) o una región de este se una a un antígeno. La región funcional a modo de ejemplo del dominio V_L es una región que comprende CDR1, CDR2 o CDR3 del dominio V_L .

La "afinidad" o "afinidad de unión" KD se determina a menudo midiendo la constante de asociación de equilibrio (k_a) y la constante de disociación de equilibrio (k_d) y calculando el cociente de k_d dividido por k_a ($KD = k_d/k_a$). Como se utiliza en el presente documento, "unión específica" o "unión inmuno-específica" con referencia a un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se utiliza indistintamente en este documento y se refiere a la capacidad del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno para formar uno o más enlaces no covalentes con el antígeno cognado a través de la interacción no covalente entre el anticuerpo y el sitio de unión del anticuerpo del antígeno. El antígeno puede ser un antígeno aislado o presente, por ejemplo, en células tumorales.

En una realización de acuerdo con la presente invención, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la invención se puede unir a un antígeno de interés con una afinidad de $2 \times 10^{-9}M$ o menos, $1 \times 10^{-9}M$ o menos, $9 \times 10^{-10}M$ o menos, $8 \times 10^{-10}M$ o menos, $7 \times 10^{-10}M$ o menos, $6 \times 10^{-10}M$ o menos, $5 \times 10^{-10}M$ o menos, $4 \times 10^{-10}M$ o menos, $3 \times 10^{-10}M$ o menos, $2 \times 10^{-10}M$ o menos, $1 \times 10^{-10}M$ o menos (por ejemplo, como el PD-L1 humano).

La afinidad se puede determinar fácilmente utilizando técnicas convencionales, por ejemplo, mediante diálisis de equilibrio; mediante el uso de un instrumento BIAcore 2000, utilizando los métodos generales dados por el fabricante; utilizando un antígeno de interés radioetiquetado para radioinmunoensayo o mediante otros métodos conocidos por un experto en la técnica.

Una "proteína asilada", "polipéptido aislado" o "anticuerpo aislado" significa que la proteína, el polipéptido o el anticuerpo (1) no está asociado con sus componentes naturalmente relacionados en su estado natural, (2) no contiene otras proteínas de la misma especie, (3) es expresado por células de diferentes especies o (4) no existe en la naturaleza. Por lo tanto, un polipéptido químicamente sintetizado o un polipéptido sintetizado en un sistema celular diferente de la fuente natural del polipéptido se "separará" de los componentes naturalmente relacionados. También se puede asilar de modo que la proteína sea substancialmente libre de los componentes naturales relacionados, es decir, utilizando técnicas de purificación de

proteínas conocidas en la técnica.

Una persona experta en la técnica conoce sustituciones conservadoras de aminoácidos adecuadas en un péptido o en una proteína, y generalmente se pueden realizar sin cambiar la actividad biológica de la molécula resultante. Por lo general, una persona experta en la técnica reconocerá una sola sustitución de aminoácidos en una región no esencial de un polipéptido no cambiará sustancialmente la actividad biológica (véase. Por ejemplo, Watson et al., *Molecular Biology of the Gene*, 4^o Edición, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., p.224).

Como se utiliza en el presente documento, los términos "polinucleótido" y "molécula de ácido nucleico" se refieren a un oligómero o polímero que comprende al menos dos nucleótidos enlazados o derivados de nucleótidos, incluyendo el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN) que generalmente están unidos por enlaces fosfodiéster.

Como se utiliza en el presente documento, una molécula de ácido nucleico aislada es una molécula de ácido nucleico que está separada de otras moléculas de ácido nucleico presentes en la fuente natural de la molécula de ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico "aislada" tal como una molécula de ADNc se puede preparar mediante tecnología recombinante y está sustancialmente libre de otros materiales celulares o medios de cultivo, o está sustancialmente libre de precursores u otros componentes químicos durante la síntesis química. La molécula de ácido nucleico aislada a modo de ejemplo proporcionada en el presente documento incluye la molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno proporcionado.

La "identidad" de la secuencia tiene un significado reconocido en la técnica, y el porcentaje de identidad de la secuencia entre dos moléculas o regiones de ácido nucleico o polipéptido puede calcularse usando técnicas publicadas. La identidad de secuencia se puede determinar a lo largo de la longitud completa del polinucleótido o del polipéptido o a lo largo de la región de la molécula (véase, por ejemplo, *Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, Part I, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991). Aunque existen muchos métodos para determinar la identidad entre dos polinucleótidos o polipéptidos, el término "identidad" es bien conocido por una persona experta en la técnica (Carrillo, H. & Lipman, D., *SIAM J Applied Math* 48: 1073 (1988)).

Como se utiliza en el presente documento, el término "expresión" se refiere al proceso de producir polipéptidos a través de la transcripción y traducción de polinucleótidos. El nivel de expresión de polipéptidos puede evaluarse mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, métodos para medir la cantidad de polipéptido producido por una

célula huésped. Dichos métodos pueden incluir, entre otros, la cuantificación de polipéptidos en lisados celulares con la técnica ELISA, la tinción con azul de Coomassie después de electroforesis en gel, el ensayo de proteínas de Lowry y el ensayo de proteínas de Bradford.

Como se utiliza en el presente documento, una "célula huésped" es una célula que se usa para recibir, mantener, replicar y amplificar un vector. También se puede utilizar una célula huésped para expresar el polipéptido codificado por el vector. Cuando la célula huésped se divide, el ácido nucleico contenido en el vector se replica y así el ácido nucleico se amplifica. La célula huésped puede ser una célula eucariota o una célula procariota. Las células huésped adecuadas incluyen, entre otras, células CHO, varias células COS, células HeLa, células HEK, como las células HEK 293.

Como se utiliza en el presente documento, un "vector" es un ácido nucleico replicable. Cuando el vector se transforma en una célula huésped apropiada, se pueden expresar una o más proteínas heterólogas a partir del vector. Un vector incluye aquellos que normalmente se digieren mediante enzimas de restricción y que están ligados, en los que se introduce el ácido nucleico que codifica el polipéptido o su fragmento. El vector también incluye aquellos que contienen el ácido nucleico que codifica el polipéptido. Se usa un vector para introducir el ácido nucleico que codifica el polipéptido en una célula huésped para amplificar el ácido nucleico o para expresar/mostrar el polipéptido codificado por el ácido nucleico. Un vector generalmente se mantiene libre pero puede estar diseñado para integrar el gen o una parte de este en el cromosoma del genoma. También se puede considerar un vector de un cromosoma artificial, por ejemplo, el vector artificial de levadura y el cromosoma artificial de mamífero. La selección y uso de dicho vector son bien conocidos por una persona experta en la técnica.

Como se utiliza en el presente documento, un vector también incluye un "vector de virus" o un "vector viral". Un vector viral es un virus diseñado que está unido de manera operable a un gen extranjero para transferirlo (como vehículo o transportador) al interior de una célula.

Como se utiliza en el presente documento, un "vector de expresión" incluye un vector que puede expresar ADN, el cual se une de manera operable a una secuencia reguladora, por ejemplo, una región promotora que puede afectar la expresión de dichos fragmentos de ADN. Dichos fragmentos adicionales pueden incluir secuencias promotoras y terminadoras, y pueden incluir opcionalmente uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores selectivos, potenciadores, señales de poliadenilación, etc. El vector de expresión se deriva generalmente de ADN plasmídico o viral o puede contener ambos elementos. Por lo tanto, un vector de expresión se refiere a una construcción de ADN o ARN recombinante, como plásmido, bacteriófago, virus recombinante u otros vectores, cuando se introduce en las células hospedadoras apropiadas, lo que da como resultado la expresión del ADN clonado. Los vectores de expresión apropiados son bien conocidos por una persona experta en la técnica e incluyen aquellos que pueden replicarse en células eucariotas o procariotas y aquellos que permanecen

libres o que están integrados en el genoma de la célula huésped.

Como se utiliza en el presente documento, "tratar" a un sujeto que padece una enfermedad o condición patológica significa que los síntomas del sujeto se alivian parcial o completamente o permanecen sin cambios después del tratamiento. Por lo tanto, el tratamiento incluye la prevención, el tratamiento o la cura. La prevención se refiere a prevenir una posible enfermedad o a prevenir el deterioro de la progresión de los síntomas o de la enfermedad. El tratamiento también incluye proveer cualquier uso farmacéutico de cualquier anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno y la composición aquí provista.

Como se utiliza en el presente documento, un "efecto terapéutico" se refiere al efecto que causa el tratamiento de un sujeto, el cambio usualmente alivia o mejora los síntomas de una enfermedad o condición de la enfermedad o cura la enfermedad o la condición de la enfermedad.

Como se utiliza en el presente documento, la "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de una sustancia, compuesto, material o composición que contiene un compuesto que es al menos suficiente para producir un efecto terapéutico luego de la administración a un sujeto, Por tanto, es la cantidad necesaria para prevenir, curar, mejorar, bloquear o bloquear parcialmente los síntomas de una enfermedad o trastorno. Asimismo, como se utiliza en el presente documento, una "cantidad profilácticamente efectiva" o "dosis profilácticamente efectiva" se refiere a la cantidad de una sustancia, compuesto, material o composición que contiene un compuesto, que cuando se administra a un sujeto, tendrá el efecto preventivo esperado, por ejemplo, prevenir o retrasar la aparición o recurrencia de una enfermedad o síntoma, reducir la posibilidad de aparición o recurrencia de una enfermedad o síntoma. No es necesario que se obtenga una dosis eficaz preventiva completa mediante la administración de una dosis y solo puede ocurrir después de una serie de dosis administradas. Por tanto, la cantidad profilácticamente eficaz se puede administrar en una o más administraciones.

Como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un mamífero, un ser humano, por ejemplo.

El número de anticuerpo utilizado en este documento (como el B10, el B11, el H12) solo se utiliza para distinguir o identificar anticuerpos o productos y no pretende indicar que dicha identificación sea una característica del anticuerpo o producto según la invención. Un experto en la técnica comprenderá que, por ejemplo, con el propósito de diferenciación o identificación, otro anticuerpo o producto también puede usar dicha identificación, pero no se refiere al mismo anticuerpo o producto o equivalente. De manera similar, los números o identificaciones similares usados en los ejemplos son solo por conveniencia de ilustración. Las características descritas en las reivindicaciones adjuntas describen el anticuerpo o producto de acuerdo con la invención.

Anticuerpos de acuerdo con la invención

Se proporciona un anticuerpo contra el PD-L1 (anticuerpo PD-L1) o un fragmento de unión a antígeno de este, en el que el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno reconoce específicamente y se une al PD-L1.

En una realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno puede reconocer y unirse específicamente al PD-L1, en el que la afinidad (KD) es 1×10^{-9} M o menos, preferiblemente 5×10^{-10} M o menos, más preferiblemente 1×10^{-10} M o menos.

En otra realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno tiene al menos uno de los siguientes:

1) bloquear la interacción entre el PD-L1 y el PD-1; 2) bloquear la interacción entre el PD-L1 y el CD80; 3) activar las células T; 4) inhibir el crecimiento tumoral.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la invención puede unirse específicamente al PD-L1 (por ejemplo, PD-L1 humano) y bloquear su interacción con el PD-1.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la invención puede unirse específicamente al PD-L1 (por ejemplo, PD-L1 humano) y bloquear su interacción con el CD80.

En algunas realizaciones, los tumores de interés incluyen, entre otros, los descritos a continuación para la enfermedad neoplásica. En algunas otras realizaciones, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la invención puede inhibir el crecimiento tumoral al menos inhibiendo el 10 %, preferiblemente al menos aproximadamente el 20 %, más preferiblemente al menos aproximadamente el 30 %, más preferiblemente al menos aproximadamente el 40 %, más preferiblemente al menos aproximadamente 50 %, más preferiblemente al menos aproximadamente 60 %, más preferiblemente al menos aproximadamente 70 %, más preferiblemente al menos aproximadamente 80 %.

En una realización, el anticuerpo PD-L1 comprende el Anticuerpo B10 PD-L1, Anticuerpo B11 PD-L1, Anticuerpo H12 PD-L1 o una combinación de estos, particularmente Anticuerpo B11 PD-L1.

Anticuerpo B10

En un aspecto, se proporciona el Anticuerpo B10 contra PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno de este,

donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena liviana y una región variable de la cadena pesada, en donde

la región variable de la cadena pesada comprende:

H-CDR1, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1,

H-CDR2, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2, y

H-CDR3, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 3;

la región variable de la cadena liviana comprende:

L-CDR1, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5,

L-CDR2, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 6, y

L-CDR3, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 7.

En otra realización, el Anticuerpo B10 PD-L1 comprende una región variable de la cadena pesada (VH),

en donde la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o más de identidad de secuencia de la SEQ ID NO: 4.

En otra realización, el Anticuerpo B10 PD-L1 comprende una región variable de la cadena liviana (VL),

en donde la región variable de la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos como se muestran en la SEQ ID NO: 8 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o más de identidad de secuencia de la SEQ ID NO: 8.

Aún en otra realización, el Anticuerpo B10 PD-L1 comprende una región constante de la cadena pesada (CH),

en donde la región constante de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 26 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o más de identidad de secuencia de la SEQ ID NO: 26.

Aún en otra realización, el Anticuerpo B10 PD-L1 comprende una región constante de la cadena liviana (CL),

en donde la región constante de la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos como se muestran en la SEQ ID NO: 25 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o más de identidad de secuencia de la SEQ ID NO: 25.

Anticuerpo B11

En otro aspecto, se proporciona el Anticuerpo B11 contra PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno de este,

donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena liviana y una región variable de la cadena pesada, en donde

la región variable de la cadena pesada comprende:

H-CDR1, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 9,

H-CDR2, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 10, y

H-CDR3, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 11;

la región variable de la cadena liviana comprende:

L-CDR1, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 13,

L-CDR2, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 14, y

L-CDR3, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 15.

En una realización, el Anticuerpo B11 PD-L1 comprende una región variable de la cadena pesada (VH),

en donde la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 12 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o más de identidad de secuencia de la SEQ ID NO: 12.

En una realización, el Anticuerpo B11 PD-L1 comprende una región variable de la cadena liviana (VL),

en donde la región variable de la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos como se muestran en la SEQ ID NO: 16 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o más de identidad de secuencia de la SEQ ID NO: 16.

En una realización preferida, el Anticuerpo B11 PD-L1 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) y una región variable de la cadena liviana (VL),

en donde la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 12; la región variable de la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 16.

Aún en otra realización, el Anticuerpo B11 PD-L1 comprende una región constante de la cadena pesada (CH),

en donde la región constante de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 26 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o más de identidad de secuencia de la SEQ ID NO: 26.

Aún en otra realización, el Anticuerpo B11 PD-L1 comprende una región constante de la cadena liviana (CL),

en donde la región constante de la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos como se muestran en la SEQ ID NO: 25 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o más de identidad de secuencia de la SEQ ID NO: 25.

En otra realización específica, el Anticuerpo B11 PD-L1 comprende una cadena pesada, en donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 28 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o más de identidad de secuencia de la SEQ ID NO: 28.

En otra realización específica, el Anticuerpo B11 PD-L1 comprende una cadena liviana, en donde la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos como se muestran en la SEQ ID NO: 27 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o más de identidad de secuencia de la SEQ ID NO: 27.

En una realización particularmente preferida, el Anticuerpo B11 PD-L1 comprende una cadena pesada y una cadena liviana,

en donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 28, y la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 27.

Anticuerpo H12

En otro aspecto, se proporciona el Anticuerpo H12 contra PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno de este,

donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena liviana y una región variable de la cadena pesada, en donde

la región variable de la cadena pesada comprende:

H-CDR1, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 17,

H-CDR2, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 18, y

H-CDR3, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 19;

la región variable de la cadena liviana comprende:

L-CDR1, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 21,

L-CDR2, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 22, y

L-CDR3, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 23.

En otra realización, el Anticuerpo H12 PD-L1 comprende una región variable de la cadena pesada,

en donde la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 20 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o más de identidad de secuencia de la SEQ ID NO: 20.

En otra realización, el Anticuerpo H12 PD-L1 comprende una región variable de la cadena liviana,

en donde la región variable de la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos como se muestran en la SEQ ID NO: 24 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o más de identidad de secuencia de la SEQ ID NO: 24.

Aún en otra realización, el Anticuerpo H12 PD-L1 comprende una región constante de la cadena pesada (CH),

en donde la región constante de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 26 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o más de identidad de secuencia de la SEQ ID NO: 26.

Aún en otra realización, el Anticuerpo H12 PD-L1 comprende una región constante de la cadena liviana (CL),

en donde la región constante de la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos como se muestran en la SEQ ID NO: 25 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o más de identidad de secuencia de la SEQ ID NO: 25.

Enfermedades neoplásicas

El bloqueo del PD-L1 mediante el anticuerpo de acuerdo con la invención puede potenciar la respuesta inmune a las células cancerosas en pacientes. El PD-L1 abunda en una variedad de cánceres humanos. La interacción entre el PD-1 y el PD-L1 causa una disminución de linfocitos que se infiltran en el tumor, disminución de la proliferación mediada por el receptor de células T y escape inmune de células cancerosas. Inhibir la interacción entre el PD-1 y el PD-L1 puede revertir la inmunodepresión.

El anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la invención se puede utilizar para tratar enfermedades neoplásicas. La enfermedad neoplásica preferible (o cáncer) que puede prevenirse o tratarse con el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la invención comprende cánceres que generalmente responden a inmunoterapia. Los ejemplos no limitantes de cánceres tratables incluyen, entre otros, cáncer de pulmón, cáncer de

ovario, cáncer de colon, cáncer de recto, melanoma, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de hígado, linfoma, enfermedad hematológica maligna, cáncer de cabeza y cuello, glioma, cáncer de estómago, cáncer de nasofaringe, cáncer de laringe, cáncer cervical, carcinoma de cuerpo uterino u osteosarcoma. Ejemplos de otros cánceres incluyen, entre otros, cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de próstata, melanoma maligno de piel o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ano, cáncer testicular, cáncer de trompas de Falopio, cáncer de endometrio, cáncer de vagina, cáncer de vulva, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de tiroides, cáncer de paratiroides, cáncer suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de uretra, cáncer de pene, leucemia crónica o aguda, incluida la leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, tumor sólido infantil, linfoma linfático, cáncer de vejiga, cáncer renal o ureteral, cáncer de pelvis renal, tumor del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor espinal, tronco del encéfalo glioma nervioso, adenoma pituitario, sarcoma de Kaposi, carcinoma epidérmico, carcinoma de células escamosas, linfoma de células T, cáncer de origen ambiental, incluyendo cánceres inducidos por asbesto y combinaciones de dichos cánceres. El anticuerpo de acuerdo con la invención también puede utilizarse para tratar cánceres metastásicos, particularmente, cánceres metastásicos que expresan el PD-L1. En otra realización más, la enfermedad neoplásica (o cáncer) es cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, melanoma, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de hígado, linfoma, enfermedad hematológica maligna, cáncer de cabeza y cuello, glioma, cáncer de estómago, cáncer de nasofaringe, cáncer de laringe, cáncer de cuello uterino, carcinoma de cuerpo uterino u osteosarcoma, particularmente cáncer colorrectal o cáncer de pulmón de células no pequeñas. En una realización, la enfermedad neoplásica es un tumor positivo para PD-L1.

En una realización preferible, el anticuerpo comprende Anticuerpo B10 PD-L1, Anticuerpo B11 PD-L1, Anticuerpo H12 PD-L1 o una combinación de estos, particularmente Anticuerpo B11 PD-L1.

Procesos de producción de ácidos nucleicos, vectores y anticuerpos

En otro aspecto, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada, que codifica el anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno según la invención como se describe anteriormente. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico puede optimizarse con codones para la célula huésped utilizada para la expresión. También se proporciona un vector de expresión, que comprende al menos una de las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención como se describió anteriormente.

En un aspecto, se proporciona una célula huésped, que está transformada con al menos una

de las moléculas de ácido nucleico o con los vectores de expresión de acuerdo con la invención.

En otro aspecto, se proporciona un proceso de preparación del anticuerpo contra el PD-L1 o de un fragmento de unión a antígeno de este, que comprende,

(i) cultivar la célula huésped de acuerdo con la invención en condiciones adecuadas para la expresión de una molécula de ácido nucleico o de un vector de expresión, y (ii) aislar y purificar el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno expresado por la molécula de ácido nucleico o por el vector de expresión.

Composiciones farmacéuticas

También se proporciona una composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo de acuerdo con la invención, y un portador farmacéuticamente aceptable: En una realización, el anticuerpo mencionado comprende el Anticuerpo B10 PD-L1, el Anticuerpo B11 PD-L1, el Anticuerpo H12 PD-L1 o una combinación de estos, particularmente, el Anticuerpo B11 de PD-L1.

Como se utiliza en el presente documento, el término "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antimicóticos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción fisiológicamente compatibles, y similares. Preferiblemente, el portador es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, parenteral, espinal o epidérmica. Según la vía de administración, el compuesto activo (es decir, la molécula de anticuerpo) y el inmunoconjugado pueden encapsularse en algún material para proteger el compuesto de los ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

La composición farmacéutica de acuerdo con la invención también puede contener un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Entre los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables se incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio o similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato ascorbilo, butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), lecitina, galato de propilo, α -tocoferol o similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico o similares.

La composición también puede contener un adyuvante, como un conservante, un agente humectante, un agente emulsionante y un agente dispersante.

La prevención de microorganismos se puede garantizar mediante procedimientos de esterilización o incorporando diversos agentes antibacterianos y antimicótico tales como parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico o similares. En muchos casos, la composición incluye preferiblemente un agente isotónico, por ejemplo, azúcar, poliol (como el manitol), sorbitol u óxido de sodio. Al incorporar un agente retardante de la absorción en la composición,

tal como monoestearato y gelatina, se puede lograr la absorción prolongada de fármacos inyectables.

El portador farmacéuticamente aceptable incluye una solución o dispersión acuosa estéril y un polvo para la preparación temporal de una inyección o dispersión estéril. El uso de estos medios y reactivos para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Los medios o reactivos convencionales, excepto por cualquier rango incompatible con el compuesto activo, pueden estar en la composición farmacéutica de acuerdo con la invención. También se puede incorporar a la composición un compuesto activo complementario.

Una composición terapéutica debe ser generalmente estéril y estable en las condiciones de preparación y almacenamiento. La composición se puede formular en una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un solvente o dispersante que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, o similares) y una mezcla adecuada de los mismos. Por ejemplo, al utilizar un revestimiento, tal como la lecitina, manteniendo el tamaño de partícula deseado en el caso de una dispersión, y al utilizar un tensoactivo, se puede mantener la fluidez adecuada.

Al mezclar el compuesto activo en un solvente adecuado en una cantidad deseable y al añadir uno o una combinación de los ingredientes mencionados anteriormente, según sea necesario, seguido de microfiltración estéril, se puede preparar una inyección estéril. Generalmente, una dispersión se prepara incorporando el compuesto activo en un portador estéril que contiene un medio de dispersión básico y otros ingredientes requeridos mencionados anteriormente. Un proceso preferible de preparación de polvo estéril para la preparación de una inyección estéril es el secado al vacío y el secado por congelación (liofilización), y el polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional requerido se obtiene de la solución filtrada pre-estéril.

La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con el material portador para preparar una sola forma farmacéutica varía según el sujeto a tratar y el modo específico de administración. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para preparar una sola forma farmacéutica es generalmente la cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Por lo general, con base en el 100 %, esta cantidad oscila aproximadamente de 0,01 % a aproximadamente 99 % del ingrediente activo, lo preferible es aproximadamente de 0,1 % a aproximadamente 70 %, y, lo más preferible es de aproximadamente 1 % a aproximadamente 30 % del ingrediente activo, combinado con un portador farmacéuticamente aceptable.

El régimen de dosificación se puede ajustar para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, la respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo, o según la urgencia de las

condiciones a tratar, la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente. Es particularmente conveniente formular una composición parenteral en forma farmacéutica por unidad para una administración fácil y una dosificación uniforme. La forma farmacéutica por unidad utilizada en este documento se refiere a una unidad físicamente discreta adecuada como forma galénica para el sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo, y la cantidad predeterminada se calcula en combinación con el portador farmacéutico requerido para producir un efecto terapéutico deseado. La descripción específica de la forma farmacéutica por unidad de la invención es limitada y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico específico que se desea lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica para formular dichos compuestos activos para la sensibilidad de un individuo a tratar.

Para la administración de moléculas de anticuerpo, el rango de dosis es de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, con mayor frecuencia de 0,01 a 20 mg/kg del peso corporal del paciente. Por ejemplo, la dosis puede ser de 0,3 mg/kg del peso corporal, 1 mg/kg del peso corporal, 3 mg/kg del peso corporal, 5 mg/kg del peso corporal, 10 mg/kg del peso corporal o 20 mg/kg del peso corporal, o dentro del rango de 1-20 mg/kg. Un régimen de tratamiento a modo de ejemplo requiere la administración una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada tres meses, una vez cada tres-seis meses, o un intervalo de dosificación inicial algo corto y un intervalo largo de dosificación tardía. En una realización, la dosis utilizada puede ser de 1200 mg administrados cada tres semanas. El modo de administración puede ser por goteo intravenoso.

Como alternativa, la molécula de anticuerpo dirigida al tumor también se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en la que se requiere una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían según la semivida de la molécula de anticuerpo en el paciente. Generalmente, un anticuerpo humano muestra la semivida más larga, seguido de un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico y un anticuerpo no humano. La dosis y la frecuencia de administración difieren dependiendo de si el tratamiento es preventivo o terapéutico. En una aplicación preventiva, se administran dosis relativamente bajas a intervalos menos frecuentes durante un largo período. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento por el resto de sus vidas. En una aplicación terapéutica, a veces es necesario administrar dosis más altas a intervalos más cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o se detiene, preferiblemente hasta que el paciente muestre una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, al paciente se le puede administrar un régimen preventivo.

El nivel de dosificación real del ingrediente activo en la composición farmacéutica puede variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que pueda lograr eficazmente la

respuesta terapéutica deseada para el paciente, la composición y el modo de administración específicos sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado depende de varios factores farmacocinéticos, incluida la actividad de la composición específica de la invención utilizada, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto específico utilizado, la duración del tratamiento y la aplicación específica de la composición con otros fármacos, compuestos o materiales, la edad, género, peso, estado, historia clínica y de salud general del paciente a tratar, y factores similares conocidos en el campo médico.

Una "cantidad efectiva" del anticuerpo o de su fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la invención preferiblemente da lugar a una disminución en la gravedad de los síntomas, un aumento en la frecuencia y duración del período asintomático de la enfermedad o prevención de lesiones o discapacidades causadas por el dolor de la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de un tumor, una "cantidad efectiva" del anticuerpo o de su fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la invención inhibe preferiblemente el crecimiento celular o tumoral en al menos aproximadamente un 10 %, preferible, al menos aproximadamente un 20 %, más preferible, al menos aproximadamente 30 %, más preferible, al menos aproximadamente 40 %, más preferible, al menos aproximadamente 50 %, más preferible, al menos aproximadamente 60 %, más preferible, al menos aproximadamente 70 %, más preferible, al menos aproximadamente 80 %, en comparación con un sujeto no tratado. La capacidad de inhibir el crecimiento tumoral se puede evaluar en un sistema de modelo animal que predice la eficacia en tumores humanos. Como alternativa, también se puede evaluar comprobando la capacidad para inhibir el crecimiento celular, y esta inhibición se puede determinar *in vitro* con una prueba conocida por un experto en la técnica. Una cantidad efectiva del anticuerpo o de su fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la invención puede reducir el tamaño del tumor o aliviar los síntomas del sujeto de otras formas, tales como prevenir o tratar la metástasis o la recurrencia. Una persona experta en la técnica puede determinar esta cantidad basándose en los siguientes factores, por ejemplo, el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición particular o vía de administración seleccionada.

El anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno de acuerdo la invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede administrarse a través de una o más vías de administración utilizando uno o más métodos conocidos en la técnica. Una persona experta en la técnica debería entender que la vía de administración o el modo varía según los resultados deseados. La vía de administración preferida para el anticuerpo de acuerdo con la invención incluye vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías de administración parenterales, tales como inyección o infusión. La frase "administración parenteral" como se utiliza en el presente documento se refiere a un modo de administración diferente a la administración enteral y local, generalmente por

inyección, que incluye, entre otras, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, inyección e infusión subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

Como alternativa, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención también se puede administrar por una vía no parenteral, por ejemplo, por vía tópica, epidérmica o por mucosas, por ejemplo, intranasal, oral, vagina, rectal, sublingual o local.

El compuesto activo se puede preparar con un portador que protege al compuesto de una liberación rápida, tal y como una formulación de liberación controlada, que incluye un sistema de administración de implante, parche transdérmico y microencapsulado. Se puede utilizar un polímero biodegradable, biocompatible, tal como el etilvinilacetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoéster y ácido poliláctico. Muchos procesos para preparar dichas preparaciones están protegidos por patentes o son generalmente conocidos por un experto en la técnica.

El anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la invención en la composición farmacéutica también se puede conjugar con una fracción terapéutica, tal como una citotoxina, un radioisótopo, una proteína biológicamente activa o similares.

La citotoxina incluye cualquier agente que sea dañino para las células (por ejemplo, células asesinas). Los ejemplos incluyen, entre otros: paclitaxel, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, epipodofilotoxina glucopiranosido, epipodofilotoxina tiofeno glucósido, vincristina, vinblastina, colchicina, adriamicina, daunorrubicina, dihidroxiantracenodiona, mitoxantrona, plicamicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoide, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y sus análogos u homólogos.

Los agentes terapéuticos que se pueden utilizar para la conjugación también incluyen, por ejemplo: antimetabolito (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo, dacarbazina), agente alquilante (por ejemplo, mostaza nitrogenada, clorambucilo, mostaza de fenilalanina, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diaminodicloroplatino (II) (DDP) cisplatino), antramycinas (por ejemplo, Daunorrubicina (anteriormente conocida como daunomicina) y adriamicina por ejemplo, actinomicina D (anteriormente conocida como actinomicina), bleomicina, plicamicina y antramycin (AMC)) y agente antimitótico (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Otros ejemplos preferibles de citotoxinas terapéuticas que pueden conjugarse con el anticuerpo de acuerdo con la invención incluyen duocarmicina, caliqueamicina, maitansina, auristatina y sus derivados.

La citotoxina se puede conjugar con el anticuerpo de acuerdo con la invención utilizando tecnología de enlazadores encontrada en la técnica. Los ejemplos de tipos de enlazadores que se han usado para conjugar citotoxina con un anticuerpo incluyen, entre otros, hidrazona, tioéter, éster, disulfuro y enlazador que contiene péptidos. Por ejemplo, se puede seleccionar un enlazador que se escinde fácilmente por un pH bajo o una proteasa en el compartimento lisosómico, y la proteasa es, por ejemplo, una proteasa que se expresa preferiblemente en tejidos tumorales, como la catepsina (por ejemplo, catepsina B, C, D).

El anticuerpo de acuerdo con la invención también se puede conjugar con un radioisótopo para producir un radiofármaco citotóxico, que también se denomina conjugado de anticuerpo radioactivo. Los ejemplos de radioisótopos que pueden conjugarse con un anticuerpo para uso diagnóstico o terapéutico incluyen, entre otros, el yodo 131, indio 111, itrio 90 y lutecio 177. Los procesos de preparación de conjugados de anticuerpos radioactivos son bien conocidos en la técnica.

El anticuerpo de acuerdo con la invención también puede estar conjugado con una proteína que cuenta con la actividad biológica requerida, y se puede utilizar para modificar una respuesta biológica específica. Dichas proteínas biológicamente activas incluyen, por ejemplo, una toxina con actividad enzimática o su fragmento activo, como la abrina, la ricina A, la exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa* o toxina de difteria; una proteína, como el factor de necrosis tumoral o el interferón- γ ; o modificador de respuesta biológica, como las linfoquinas, interluquina-1 (“IL-1”), interluquina-2 (“IL-2”), interluquina-6 (“IL-6”), interluquina-10 (“IL-10”), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (“GM-CSF”), factor estimulante de colonias de granulocitos u otros factores inmunológicos como el IFN, etc.

Terapias combinadas

El anticuerpo o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede administrarse en combinación con un agente quimioterapéutico o un anticuerpo dirigido a otro antígeno tumoral. El anticuerpo de acuerdo con la invención y el agente quimioterapéutico o el anticuerpo dirigido a otro antígeno tumoral pueden administrarse al tiempo o por separado. Cuando se administran por separado (cuando se utilizan diferentes programas de administración), se pueden administrar de forma continua sin interrupción o en intervalos predeterminados. El anticuerpo según la invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención también se puede combinar con radioterapia, por ejemplo, incluyendo la administración de radiación ionizante al paciente, que es antes, durante o después del proceso de administración del anticuerpo o de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención.

Kits

El alcance de la invención también abarca un kit que comprende el anticuerpo o su

fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la invención como también las instrucciones de uso. Por lo general, el kit incluye una etiqueta que indica el uso o método de uso deseado del contenido en el kit. El término “etiqueta” incluye cualquier material escrito o grabado provisto en el kit o con el mismo o de alguna otra manera.

Efectos benéficos

El anticuerpo de acuerdo con la invención tiene una afinidad muy fuerte por el antígeno de interés, activa las células T, puede exhibir una excelente actividad antitumoral (*in vivo*), excelente estabilidad, menores efectos secundarios y el efecto es mejor que el de la técnica anterior.

Ejemplos

Se puede obtener un mayor entendimiento de la invención haciendo referencia a algunos ejemplos específicos proporcionados en el presente documento, y estos ejemplos solo se utilizan para ilustrar la presente invención en lugar de cualquier limitación del alcance de esta. Es obvio que se pueden realizar varios cambios y modificaciones a la invención sin apartarse del espíritu de esta y, por lo tanto, estos cambios y modificaciones también están dentro del alcance de protección reivindicado de la presente solicitud. A menos que se indique lo contrario, las relaciones que incluyen los porcentajes utilizados en la presente se calculan en peso.

Todos los reactivos e instrumentos usados en los ejemplos están disponibles en el mercado. Tecentriq se puede obtener con Roche.

Ejemplo 1 Cribado de anticuerpos

Se recolectó sangre periférica de 106 adultos sanos (53 hombres y 53 mujeres), y se separaron las PBMC (células mononucleares de sangre periférica) utilizando una solución de separación de linfocitos, y se recolectó un total de 2×10^9 células. Se extrajo el total de los ARN con el método Trizol y se transcribieron a la inversa en ADNc. Con referencia al método “Anticuerpo Recombinante” (Science Press, 2005), el método PCR convencional se utilizó para amplificar los genes de la región variable de diferentes subtipos de anticuerpos, y los genes de la región variable fueron clonados en el vector pDF digerido con la misma enzima mediante técnicas convencionales de biología molecular. *E. coli* XL1-Blue (Agilent Technology) se transformó por electroporación. Después de la expansión con el medio SB, se añadió 1×10^{13} ufp de virus ayudador VCSM13 (BioVector NTCC Inc.) para la infección con el fin de obtener una librería de anticuerpos en fagos principal, y la librería de anticuerpos principal y las bacterias BS1365 se mezclaron proporcionalmente (MOI de infección > 200) para construir una librería de anticuerpos de gran capacidad.

Después de bloquear el tubo de inmunoensayo (tubo de inmunoensayo Maxisorp, Thermo

Nunc) recubierto con PD-L1 recombinante (producto de la empresa R&D) con leche desnatada en polvo al 5%, se añadió la biblioteca de anticuerpos en fagos anterior y se incubó a 37 °C durante 2 h; los fagos no unidos se descartaron, la solución de TBS se usó para lavar 5 veces y los fagos adsorbidos no específicamente se eliminaron por lavado completo; se añadió 1 mL de solución tampón de elución (0,1 mol/L de glicina-HCl, pH 2,2) para eluir los fagos y se utilizaron 40 µL de solución de Tris 2 mol/L para la neutralización. Se agregó bacteria XL1-Blue (Agilent Technology) en fase logarítmica, medio SB (medio SB: 30 g de triptona 20 g de extracto de levadura, 10 g de MOPS, disueltos en 950 mL de agua desionizada, con un pH ajustado a 7,0 con hidróxido de sodio, volumen medido en 1 L, puesto en autoclave) y fago ayudador CVSM13 para amplificación y enriquecimiento. El proceso se repitió 3-4 veces, y los fagos eluidos se usaron para infectar la placa de cultivo recubierta de bacterias XL1-Blue (fase logarítmica) recién preparada. Después de la incubación durante la noche a 37 °C, se obtuvo un solo clon (para métodos y reactivos específicos, se puede hacer referencia a: “*Phage Display*” (pantalla de fagos), Humana Press).

Se incubó el PD-L1 recombinante con una placa de 96 pocillos a 4 °C durante 16 h, y luego se bloqueó la unión no específica con solución de BSA. De la biblioteca de fagos con enriquecimiento obvio después del cribado, se seleccionaron aproximadamente 1000 (12 placas de 96 pocillos)) de clones de fago único y se cultivaron en 500 µL de medio líquido 2YT suplementado con carbenicilina y ampicilina durante 24 h, incubados con la solución recombinante PD-L1 durante 2 h. La mezcla se añadió a la placa de 96 pocillos junto con el PD-L1 recombinante mencionado anteriormente y se incubó durante 15 min. Después de lavar con PBST, se realizó la incubación con anticuerpo anti-fago conjugado con HRP (anti-M13 HRP) y finalmente se agregó un sustrato para el desarrollo del color para determinar la cantidad de fago unido a la placa de 96 pocillos. Como el PD-L1 en la solución se unió bien a los fagos con mayor afinidad, este inhibió competitivamente la unión de los fagos al PD-L1 acoplado a la placa de 96 pocillos y, por lo tanto, hubo una lectura de DO más baja en ELISA. Utilizando este experimento, se seleccionaron inicialmente 12 anticuerpos candidatos con una afinidad relativamente alta y secuencias específicas para realizar más pruebas y cribado.

Se incubó el PD-L1 recombinante con una placa de 96 pocillos a 4 °C durante 16 h, y la unión no específica se bloqueó con solución de BSA. Los clones de fagos seleccionados del ELISA competitivo anterior se incubaron con soluciones de PD-L1 recombinante de diferentes concentraciones (0,03 nM - 90 nM) durante 2 h, y la mezcla se añadió a la placa de 96 pocillos junto con el PD-L1 recombinante mencionado anteriormente y se incubó durante 15 min. Después de lavar con PBST, se realizó la incubación con anticuerpo anti-fago conjugado con HRP (anti-M13 HRP) y finalmente se añadió un sustrato para el desarrollo del color para determinar la cantidad de fagos unidos a la placa de 96 pocillos. Se utilizó GraphPad Prism para hacer una curva de unión basada en la lectura de DO en ELISA. Los resultados se muestran en

la Fig. 1 (WT es el control positivo, un anticuerpo que tiene la misma secuencia que Tecentriq).

Se realizó un análisis de secuencia para los 3 anticuerpos candidatos con la mayor afinidad (HZPDL1-B10, HZPDL1-B11, HZPDL1-H12 (en el texto y los dibujos siguientes, por conveniencia se utilizaron las abreviaturas respectivas B10, B11, H12)).

Las secuencias son las siguientes:

El clon B10 tiene la HCDR1 con la secuencia de la SEQ ID NO: 1, la HCDR2 con la secuencia de la SEQ ID NO: 2, la HCDR3 con la secuencia de la SEQ ID NO: 3, la VH con la secuencia de la SEQ ID NO: 4; la LCDR1 con la secuencia de la SEQ ID NO: 5, la LCDR2 con la secuencia de la SEQ ID NO: 6, la LCDR3 con la secuencia de la SEQ ID NO: 7, la VL con la secuencia de la SEQ ID NO: 8.

El clon B11 tiene la HCDR1 con la secuencia de la SEQ ID NO: 9, la HCDR2 con la secuencia de la SEQ ID NO: 10, la HCDR3 con la secuencia de la SEQ ID NO: 11, la VH con la secuencia de la SEQ ID NO: 12; la LCDR1 con la secuencia de la SEQ ID NO: 13, la LCDR2 con la secuencia de la SEQ ID NO: 14, la LCDR3 con la secuencia de la SEQ ID NO: 15, la VL con la secuencia de la SEQ ID NO: 16.

El clon H12 tiene la HCDR1 con la secuencia de la SEQ ID NO: 17, la HCDR2 con la secuencia de la SEQ ID NO: 18, la HCDR3 con la secuencia de la SEQ ID NO: 19, la VH con la secuencia de la SEQ ID NO: 20; la LCDR1 con la secuencia de la SEQ ID NO: 21, la LCDR2 con la secuencia de la SEQ ID NO: 22, la LCDR3 con la secuencia de la SEQ ID NO: 23, la VL con la secuencia de la SEQ ID NO: 24.

Ejemplo 2 Expresión de anticuerpos

Los genes de la región variable obtenidos de los clones B10, B11, H12 se fusionaron con el gen de la región constante de IgG humana (la secuencia de la región constante de la cadena liviana es la SEQ ID NO: 25; la secuencia de la región constante de la cadena pesada es la SEQ ID NO: 26; y se clonó en el vector de expresión pCDNA3.4 (Thermo Fisher). Los vectores de expresión eucariotas obtenidos se transfectaron transitoriamente en células Expi-CHO (Thermo Fisher) Después de aproximadamente 8 días de cultivo celular libre de suero, el sobrenadante del cultivo se recolectó y se sometió a un ensayo de ELISA (utilizando anti-IgG humana de cabra y anti-IgG humana de cabra marcada con enzima de rábano picante para el ensayo ELISA de doble sándwich para detectar el contenido del anticuerpo en el sobrenadante). Se determinó el nivel de expresión de anticuerpos en el suero, y se purificó el sobrenadante del cultivo que contenía el anticuerpo candidato con resina de proteína A para obtener el anticuerpo de interés.

Ejemplo 3 Análisis de la actividad de reconocimiento específica del anticuerpo

En el presente ejemplo, se utilizó la técnica ELISA para determinar la unión del anticuerpo candidato para PD-L1 humano, mono y ratón.

Se diluyó el PD-L1 humano, mono y ratón (R&D) con PBS a 5 µg/ml y para recubrir placas de 96 pocillos. Después de la incubación durante la noche a 4 °C, la solución de recubrimiento se desechó al día siguiente y se lavó con PBST. Se añadieron 200 µl de solución de bloqueo de BSA a cada pocillo y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. El lavado se realizó tres veces con PBST, y los anticuerpos candidatos y el anticuerpo de control positivo (WT, control positivo, un anticuerpo con la misma secuencia que Tecentriq) se diluyeron 2 veces en serie para producir 11 concentraciones con 1 nM como la concentración más alta. Posteriormente, se agregaron 100 µl de anticuerpo en cada pocillo y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. El lavado se realizó tres veces con PBST y se añadió anticuerpo anti-Fc-
HRP humano (Sino Biological) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, cada pocillo se lavó cuatro veces con PBST, se añadió la solución de desarrollo de color TMB (Beijing Tiangen BioTech) y el color se desarrolló a temperatura ambiente. Una vez que se detuvo el desarrollo del color, se determinó el valor de DO con un lector de microplacas a 600 nm. Los resultados de ELISA se muestran en la Fig. 2 (A, B y C son PD-L1 humano, mono y ratón, respectivamente, y la unidad de CE₅₀ es pM). Los anticuerpos candidatos B10, B11 y H12 pueden unirse a proteínas PD-L1 de humanos, monos y ratones.

Ejemplo 4 Análisis de la afinidad de anticuerpo

En este ejemplo, se usa BIAcore para determinar la afinidad del anticuerpo. En este experimento, se usó el kit de captura de anticuerpos humanos (GE, BR100839) para acoplar el anticuerpo anti-IgG humano al chip sensor CM5 de la serie S (GE, BR100530) a través de amino antes de la unión del ligando y el analito. Los anticuerpos anti-PD-L1 recombinantes, B10, B11 y H12 se diluyeron con solución tampón HBS-EP como ligandos. El PD-L1 etiquetado con His recombinante se diluyó con solución tampón HBS-EP a 8 µg/mL, 4 µg/mL, 1,6 µg/mL, 0,64 µg/mL, 0,256 µg/mL y 0,102 µg/mL como analitos. Los experimentos de análisis de afinidad se realizaron en una forma de ciclos múltiples en el modo Asistente de Biacore. El ensayo de cada muestra incluyó 3 inicios, 1 control de concentración cero, 6 muestras de concentración de gradiente y 1 muestra de concentración repetida. Después de cada ciclo, se utiliza una solución de regeneración de 10 mM de Glicina HCl PH 2.1 para regenerar el chip. Cada ciclo de concentración del analito se estableció de la siguiente manera: tiempo de captura 180 s, tasa de flujo de la solución de ligando 10 µl/min, tiempo de unión del ligando y el analito 180 s, tasa de flujo de la solución del analito 30 µl/min; tiempo de disociación 2400 s. Los datos brutos se introdujeron en el software de análisis, se restó el control de concentración cero y se restó el canal de referencia para eliminar el efecto de volumen. Se utilizó el modo de unión 1:1 en el método de análisis cinético para ajustar el gráfico y los datos de afinidad del anticuerpo antígeno se calcularon mediante análisis de regresión utilizando el software de análisis basado en la curva de unión. Los resultados experimentales mostraron que los

anticuerpos candidatos B10, B11 y H12 pueden reconocer el antígeno de interés con alta afinidad (Tabla 1).

Tabla 1

Clon del anticuerpo	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
B10	$1,435 \times 10^6$	$2,359 \times 10^{-3}$	$1,644 \times 10^{-9}$
B11	$1,361 \times 10^6$	$8,567 \times 10^{-4}$	$6,294 \times 10^{-10}$
H12	$1,190 \times 10^6$	$2,609 \times 10^{-3}$	$2,194 \times 10^{-9}$

Ejemplo 5 Activación de células T

En el presente ejemplo, se utilizó el experimento de reacción de linfocitos mezclados (MLR) para ensayar la capacidad de activación de las células T de los anticuerpos PD-L1 candidatos. Se utilizó la solución de separación de linfocitos de sangre periférica humana (Ficoll) para aislar las PBMC de la sangre humana fresca sana heparinizada, y luego se utilizó el kit II de aislamiento de monocitos humanos (Miltenyi) para aislar los monocitos de las PBMC. Los monocitos se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células por pocillo, y se añadieron para cultivo 25 ng/ml de GM-CSF (Sino Biological) y 50 ng/ml de IL-4 (Sino Biological) a 37 °C con el medio fresco reemplazado cada 3 días. Después de 7 días de cultivo, los monocitos se diferenciaron en células dendríticas. En el séptimo día de diferenciación y maduración de las células dendríticas, se utilizó el kit de aislamiento de células T CD4 + (Miltenyi) para aislar las células T CD4 + de las PBMC de otra persona sana. Posteriormente, se co-cultivaron 2×10^5 /pocillo de células T CD4 + y células dendríticas en medio RPMI (Invitrogen) que contenía diferentes concentraciones de anticuerpo. Después de 5 días, se utilizaron el kit de ELISA para IFN γ (R&D) y el kit de ELISA para IL-2 (eBioscience) para determinar el contenido de IFN γ e IL-2 secretados por células T activadas en el sobrenadante del cultivo.

Los resultados se muestran en la figura 3 (el anticuerpo positivo es un anticuerpo que tiene la misma secuencia que Tecentriq, y el anticuerpo de control es un control de IgG de isotipo, IgG1 humana). Los anticuerpos B10, B11 y H12 pueden activar las células T y aumentar los niveles de expresión del IFN γ y del IL-2.

Ejemplo 6 El anticuerpo bloquea la interacción entre el PD-1 con el PD-L1

El gen de región variable del clon B11 y el gen de región constante de IgG humana (la secuencia de región constante de cadena liviana es la SEQ ID NO: 25; la secuencia de la región constante de la cadena pesada es la SEQ ID NO: 26) se fusionaron y se expresaron para obtener una molécula de anticuerpo completa, en la que la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana es la SEQ ID NO: 27; la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada es la SEQ ID NO: 28) y se analizó la actividad biológica.

Se analizó la actividad del anticuerpo para bloquear la interacción entre el PD-1 y el PD-L1. La proteína hPD-L1-Fc (R&D) se diluyó en solución tampón de recubrimiento hasta una concentración de recubrimiento de 1 µg/mL, luego se añadió a 100 µL/pocillo a los pocillos de la placa de recubrimiento y el recubrimiento se realizó durante la noche a 4 °C. La placa se lavó tres veces con solución de lavado (PBST), se añadió 2 % de albúmina de suero bovino en el pocillo correspondiente a 100 µL/pocillo y se bloqueó durante 2 h a 37 °C. La concentración más alta de B11 fue de 10 µg/mL, y se diluyó en 2,5 veces, con un total de 10 concentraciones. Se diluyó PD-1 marcado con biotina (hPD-1-Fc-Biotina) (R&D) con diluyente (BSA al 1 %) a 0,25 µg/mL y la solución se mezcló con el anticuerpo B11 diluido en gradiente a 1:1. La mezcla se añadió a los pocillos de reacción ELISA bloqueados, 180 µL/pocillo, y se establecieron pocillos triplicados para cada concentración de muestra. La placa se cubrió con una membrana de sellado y se colocó horizontalmente a 37 °C durante 2 h. La placa se lavó tres veces con la solución de lavado, se añadió avidina marcada con HRP (Shanghai Beyotime Biotech) y se colocó horizontalmente a 37 °C durante 1 h. La placa se lavó con la solución de lavado tres veces y se aplicaron palmaditas sobre papeles absorbentes para eliminar las gotitas restantes tanto como fuera posible. Se añadieron 100 µL de TMB (Beijing Tiangen BioTech) a cada pocillo y la placa se colocó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 45 min. Se añadieron 100 µL de solución de terminación de 1 M de H₂SO₄ a cada pocillo para detener la reacción del sustrato y se leyó el valor de DO a 450 nm con un lector de microplacas.

Los resultados mostraron que el anticuerpo B11 puede bloquear la unión de hPD-L1 a hPD-1 y se observó una forma dependiente de la dosis; como se muestra en la figura 4.

Ejemplo 7 El anticuerpo bloquea la interacción entre CD80 y PD-L1

La proteína hPD-L1-Fc se diluyó en tampón de recubrimiento hasta una concentración de recubrimiento de 1 µg/mL, se añadió a 100 µL/pocillo a los pocillos de la placa de recubrimiento y el recubrimiento se realizó durante la noche a 4 °C. La placa se lavó tres veces con solución de lavado (PBST), se añadió albúmina de suero bovino al 2 % en el pocillo correspondiente a 100 µL/pocillo y se bloqueó a 37 °C durante 2 h. El B11 se diluyó en serie 2,5 veces para hacer un total de 10 concentraciones con 10 µg/ml como la concentración más alta. Se diluyó CD80 (CD80-Biotina) (R&D) marcado con biotina con diluyente (BSA al 1 %) a 0,25 µg/ml, y la solución se mezcló con el anticuerpo B11 diluido en gradiente a 1:1. La mezcla se añadió a los pocillos de reacción ELISA bloqueados, 180 µL/pocillo, y se establecieron pocillos triplicados para cada concentración de muestra. La placa se cubrió con una membrana de sellado y se colocó horizontalmente a 37 °C durante 2 h. La placa se lavó tres veces con la solución de lavado, se añadió avidina marcada con HRP (Shanghai Beyotime Biotech) y se colocó horizontalmente a 37 °C durante 1 h. La placa se lavó con la solución de lavado tres veces y se aplicaron palmaditas sobre papeles absorbentes para eliminar las gotitas

restantes tanto como fuera posible. Se añadieron 100 μ de TMB a cada pocillo y la placa se colocó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 45 min. Se añadieron 100 μ L de solución de terminación de 1 M de H_2SO_4 a cada pocillo para detener la reacción del sustrato, y se leyó el valor de DO a 450 nm con un lector de microplacas. Se analizó la actividad del anticuerpo para bloquear la interacción entre el CD80 y el PD-L1. Los resultados se muestran en la figura 5. El anticuerpo B11 puede bloquear la interacción entre el CD80 (CD80-Biotina) y el PD-L1 y se observó una forma dependiente de la dosis.

Ejemplo 8 Actividad biológica celular del anticuerpo

Se tomaron células CHO/PD-L1 (Promega) en fase de crecimiento logarítmico y se ajustó la densidad celular a $5,0 \times 10^5$ células/mL con medio experimental (2 % FBS). Las células se inocularon en una placa de cultivo celular blanca opaca de 96 pocillos a 80 μ L/pocillo y se incubaron en una incubadora de CO_2 durante 16-18 h.

Grupo experimental: El B11 se diluyó a 6,4 μ g/mL con medio RPMI1640 (que contenía suero bovino fetal al 2 %, todo obtenido de Gibco), se diluyó en un gradiente de 2,5 veces para obtener un total de 9 puntos de concentración, con pocillos triplicados para cada concentración de muestra, y se añadió a 40 μ L/pocillo a la placa de cultivo inoculada con células CHO/PD-L1. Grupo de control en blanco: Se añadieron 40 μ L/pocillo de medio experimental a la placa de cultivo inoculada con células CHO/PD-L1. La línea Jurkat/PD-1 (Promega) se ajustó a una densidad celular de $1,0 \times 10^6$ - $1,25 \times 10^6$ células/mL y se añadió a 40 μ L/pocillo al grupo experimental y al grupo de control en blanco. La placa de cultivo se incubó en una incubadora durante 5,5 a 6,5 h. A cada pocillo se le añadieron 80 μ L de solución de sustrato de luciferasa (Promega). La reacción se realizó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 5-30 min. Las unidades de luz relativa (URL) se leyeron a través de un lector de microplacas en modo de quimioluminiscencia y se utilizó el software de análisis del sistema para el análisis de datos. El logaritmo de la concentración de anticuerpo fue la abscisa, los pliegues correspondientes de la inducción de la señal (fórmula de cálculo: URL del pozo experimental / URL del control en blanco) fue la ordenada, y se ajustó la curva de ecuación de cuatro parámetros.

Los resultados mostraron que el anticuerpo B11 tiene actividad biológica celular, y se observó una forma dependiente de la dosis. Los resultados se muestran en la figura 6.

Ejemplo 9 Actividad inhibidora *in vivo* del anticuerpo contra el cáncer colorrectal

En este ejemplo, se utilizó el modelo portador de tumores establecido mediante el trasplante subcutáneo de ratones B-hPD-1 humanizados con células de cáncer de colon MC38-hPD-L1 para evaluar la actividad antitumoral *in vivo* del anticuerpo B11.

Las células de cáncer de colon MC38-hPD-L1 (CrownBio) se inocularon subcutáneamente en el flanco anterior derecho de ratones hembra B-hPD-1 humanizadas (CrownBio) a 5×10^5

células/0,1 mL. Cuando los tumores crecieron aproximadamente 160 mm³, se agruparon aleatoriamente de la siguiente manera: control del disolvente, Tecentriq (10 mg/kg, Q2D× 8) según el volumen de tumor (10 en cada grupo, 5 grupos en total), respectivamente. La vía de administración fue la inyección intraperitoneal, y el experimento finalizó después de 22° día de la administración grupal. El volumen del tumor y el peso corporal se midieron dos veces por semana, y se registró el peso corporal y el volumen del tumor de los ratones.

Los resultados revelaron que durante el experimento los animales se mantuvieron saludables, y los ratones toleraron bien cada anticuerpo terapéutico. Los resultados de la inhibición del tumor se muestran en la figura 7 y en la Tabla 2. Al final del experimento (es decir, el 21° día de la administración grupal), el volumen promedio del tumor del grupo de control del disolvente fue 1917±264 mm³. Los volúmenes tumorales promedio del grupo B11 a los niveles de dosis de 10 mg/kg, 3 mg/kg, 1 mg/kg fueron 232 ± 76 mm³, 235 ± 71 mm³ y 999 ± 306 mm³, respectivamente; las tasas de inhibición tumoral fueron del 96,0 %, 95,9 % y 52,3 %, respectivamente; y las tasas de inhibición del peso del tumor fueron 92,4 %, 91,9 % y 60,2 %, respectivamente. El volumen tumoral promedio del fármaco de control positivo Tecentriq (Roche) en un nivel de dosis de 10 mg/kg fue de 323±146 mm³, la tasa de inhibición tumoral fue del 90,8 %, y la tasa de inhibición del peso del tumor fue de 91,1 %. En comparación con el grupo de control del disolvente, tanto Tecentriq como B11 mostraron una diferencia significativa en el volumen del tumor (P<0,05), indicando que B11 tiene un efecto inhibitorio tumoral significativo.

En una dosis de 3 mg/kg, la actividad del Anticuerpo B11 anti-PD-L1 fue equivalente a la eficacia del fármaco de control Tecentriq de 10 mg/kg, indicando que el Anticuerpo B11 anti-PD-L1 tiene una mejor actividad antitumoral que Tecentriq.

Tabla 2. Efecto inhibidor del tumor de las muestras de ensayo sobre el peso del tumor de ratones humanizados B-hPD-1 trasplantados con cáncer de colon MC38-hPD-L1

Grupo	Dosis (mg/kg)	Peso del tumor (g) ^a	(%) TI _{PT} tasa de inhibición del peso del tumor	P ^b
1. Inyección de cloruro de sodio	-	1,957± 0,391	--	--
2. Tecentriq	10	0,174± 0,101	91,1	<0,001
3. B11	10	0,149± 0,049	92,4	<0,001
4. B11	3	0,158± 0,060	91,9	<0,001
5. B11	1	0,779± 0,315	60,2	0,030

Nota: a: media ± error estándar; b: Comparación estadística de pesos tumorales entre el grupo de administración y el grupo de control del disolvente después de 22 días de la administración

grupal, análisis ensayo t.

Ejemplo 10 Actividad inhibitoria in vivo del anticuerpo contra cáncer celular de células no pequeñas

En el presente ejemplo se utilizaron ratones NGC con xenoinjerto de cáncer de pulmón de células no pequeñas HCC827 humanas (Sino Biological) para establecer el modelo portador de tumores a fin de evaluar la actividad antitumoral del B11 *in vivo*.

Las células HCC827 en la fase de crecimiento logarítmico se recolectaron y los ratones NCG se inocularon subcutáneamente en el dorso derecho en el día 0 en una dosis de 5×10^6 /ratones. 5 días después de la inoculación de células tumorales (día 5), se seleccionaron ratones con volumen tumoral moderado, y se dividieron uniformemente en 5 grupos, cada uno con 12 ratones. Se realizó un trasplante intraperitoneal de PBMC (1×10^8 /mL), 6 de los 12 ratones de cada grupo se inocularon con PBMC del donante # 86, y los otros 6 ratones se inocularon con PBMC del donante # 119. Las células se resuspendieron en PBS (volumen de inoculación de 0,1 mL). Los grupos experimentales fueron los grupos B11 15 mg/kg, B11 5 mg/kg y B11 1,5 mg/kg, el grupo control positivo Tecentriq 15 mg/kg y el grupo control negativo (IgG1 humana) 15 mg/kg. La administración de la inyección intraperitoneal se llevó a cabo 5, 8, 12, 15, 19 y 22 días después de la inoculación de las células tumorales, para un total de seis administraciones. Se evaluó la eficacia de acuerdo con la tasa de inhibición tumoral relativa (TGIRTV), y se evaluó la seguridad de acuerdo con el cambio del peso y muerte del animal.

Los resultados mostraron que no ocurrió ninguna reacción tóxica relacionada con el tratamiento del fármaco en cada grupo de tratamiento dentro de los 23 días de inoculación, y los ratones portadores del tumor toleraron bien los anticuerpos ensayados con las dosis de ensayo.

Los resultados antitumorales se muestran en la figura 8. El grupo de tratamiento B11 (15 mg/kg) mostró un efecto inhibidor tumoral significativo 12 y 15 días después de la inoculación de células tumorales, y las tasas de inhibición tumoral relativa TGIRTV (%) fueron de 31 % y 34 %, respectivamente, mostrando una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo de control (los valores *p* fueron 0,018 y 0,016, respectivamente).

El grupo de tratamiento B11 (5 mg/kg) mostró un efecto inhibidor tumoral significativo 12, 15 y 20 días después de la inoculación de células tumorales en el grupo de tratamiento trasplantado con PBMC, y las tasas relativas de inhibición tumoral TGIRTV (%) fueron de 44 %, 43 % y 28 %, respectivamente, mostrando una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo de control (los valores *p* fueron 0,001, 0,006 y 0,046, respectivamente).

El grupo de tratamiento B11 (1,5 mg/kg) mostró un efecto inhibidor tumoral significativo

12, 15, 18, 20 y 22 días después de la inoculación de células tumorales, y las tasas de inhibición tumoral relativas TGIRTV (%) fueron 35 %, 30 %, 39 %, 38 % y 49 %, respectivamente, mostrando una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo de control (los valores *p* fueron 0,013, 0,031, 0,005, 0,003 y 0,002, respectivamente).

El fármaco positivo Tecentriq (15 mg/kg) mostró un efecto pequeño de inhibición tumoral 12 días después de la inoculación de células tumorales, y la tasa relativa de inhibición tumoral TGIRTV (%) fue del 23 %, lo cual no mostró una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo de control (valor *p* 0,084).

Los resultados anteriores mostraron que el Anticuerpo B11 tiene una excelente actividad antitumoral y la actividad es superior frente a Tecentriq.

Listado de secuencias

B10

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia
SEQ ID NO: 1	HCDR1	DSWIH
SEQ ID NO: 2	HCDR2	WISPFGGSTYYADSVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3	RHWPGGFDY
SEQ ID NO: 4	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHW VRQAPGKGLEWVAWISPFGGSTYYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDY WGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 5	LCDR1	RASQDVSTAVA
SEQ ID NO: 6	LCDR2	SASFLYS
SEQ ID NO: 7	LCDR3	QQFIFHPAT
SEQ ID NO: 8	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQFIFHPATFGQGTKVEIK

B11

SEQ ID NO: 9	HCDR1	ETWLH
SEQ ID NO: 10	HCDR2	WVSPFGGSTYYADSVKG
SEQ ID NO: 11	HCDR3	RHWPGGFDY
SEQ ID NO: 12	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSETWLH WVRQAPGKGLEWVAWVSPFGGSTYYADSVKGRFT ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPG GFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 13	LCDR1	RASQDVSTAVA
SEQ ID NO: 14	LCDR2	SASFLYS
SEQ ID NO: 15	LCDR3	QQFLYHPAT
SEQ ID NO: 16	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQFLYHPATFGQGGTKVEIK

H12

SEQ ID NO: 17	HCDR1	ESWLH
SEQ ID NO: 18	HCDR2	WVTPYGGSTYYADSVKG
SEQ ID NO: 19	HCDR3	RHWPGGFDY
SEQ ID NO: 20	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSESWLH WVRQAPGKGLEWVAWVTPYGGSTYYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWP GGFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 21	LCDR1	RASQDVSTAVA
SEQ ID NO: 22	LCDR2	SASFLYS
SEQ ID NO: 23	LCDR3	QQFLYHPAT
SEQ ID NO: 24	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQFLYHPATFGQGGTKVEIK

SEQ ID NO: 25	Región constante de la cadena liviana	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC
SEQ ID NO: 26	Región constante de la cadena pesada	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 27	B11 Cadena liviana de longitud completa	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWY QKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQFLYHPATFGGGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 28	B11 Cadena pesada de longitud completa	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSETWLH WVRQAPGKGLEWVAWVSPFGGSTYYADSVKGRFT ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPG GFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Un experto en la materia sabrá que se pueden realizar muchas modificaciones y cambios de la invención sin apartarse de su espíritu y alcance. Las realizaciones específicas descritas en este documento solo se proporcionan a modo de ejemplos y no se pretende que estén limitadas de ninguna manera. El alcance y el espíritu reales se muestran en las reivindicaciones adjuntas, y la descripción y las realizaciones son solo a modo de ejemplo.