PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE IL-15/IL-15RALFA-FC DIRIGIDAS A PD-1 Y USOS DE LAS MISMAS EN TERAPIAS COMBINADAS

REIVINDICACIÓN DE PRIORIDAD

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. No. 62/744,946, presentada el 12 de octubre de 2018 y la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. No. 62/784,334, presentada el 21 de diciembre de 2018.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Dos enfoques muy prometedores en la inmunoterapia contra el cáncer incluyen los tratamientos basados en citocinas y el bloqueo de proteínas de puntos de regulación inmunitarios tales como PD-1.

Citoquinas tales como la IL-2 y la IL-15 tienen como función ayudar a la proliferación y diferenciación de células B, células T y células NK. Ambas citocinas ejercen su función de señalización celular a través de la unión a un complejo trimérico que consiste en dos receptores compartidos, la cadena gamma común (γc; CD132) y la cadena beta del receptor de IL-2 (IL-2Rβ; CD122), así como un receptor de cadena alfa único para cada citocina: receptor alfa de IL-2 (IL-2Rα; CD25) o receptor alfa de IL-15 (IL-15Rα; CD215). Ambas citocinas se consideran agentes terapéuticos potencialmente valiosos en oncología y la IL-2 se ha aprobado para usar en pacientes con carcinoma de células renales metastásico y melanoma maligno. Actualmente, no existen usos aprobados de la IL-15 recombinante, aunque existen varios ensayos clínicos en curso. Sin embargo, como fármacos potenciales, ambas citocinas experimentan un aclaramiento muy rápido, con vidas medias medidas en minutos. La inmunoterapia con IL-2 se ha asociado con toxicidad sistémica cuando se administra en dosis altas para superar el aclaramiento rápido. Dicha toxicidad sistémica también se ha informado en la inmunoterapia con IL-15 en ensayos clínicos recientes (Guo y otros, J Immunol, 2015, 195(5):2353-64).

Las proteínas de los puntos de regulación inmunitarios, tales como PD-1, se regulan positivamente después de la activación de las células T para evitar la autoinmunidad al reducir las células T activadas tras su unión a ligandos de los puntos de regulación inmunitarios tales como PD-L1. Sin embargo, las proteínas de los puntos de regulación inmunitarios también se regulan positivamente en los linfocitos infiltrantes de tumores

(TIL) y los ligandos de los puntos de regulación inmunitarios se sobreexpresan en las células tumorales, lo que contribuye al escape inmunológico de las células tumorales. La des-represión de los TIL mediante el bloqueo de las interacciones de los puntos de regulación inmunitarios con fármacos tales como Opdivo® (nivolumab) y Keytruda® (pembrolizumab) ha demostrado ser muy eficaz en el tratamiento del cáncer. A pesar de la promesa de las terapias de bloqueo de puntos de regulación, tales como nivolumab y pembrolizumab, muchos pacientes aún no logran una respuesta suficiente al bloqueo de puntos de regulación solo.

Por lo tanto, aún existe una necesidad insatisfecha en el tratamiento oncológico de estrategias terapéuticas con citocinas que no requieran dosis altas y que estén dirigidas a tumores para evitar la toxicidad sistémica. Además, existe la necesidad de identificar modalidades terapéuticas adicionales para combinación con el bloqueo de puntos de regulación que podrían aumentar la tasa de respuesta del paciente. Esto puede ser especialmente complejo ya que la modalidad terapéutica adicional no debe competir con el bloqueo de puntos de regulación. La presente invención aborda estas necesidades y advertencias al proporcionar proteínas de fusión de IL-15 dirigidas a PD-1 con una vida media mejorada y una orientación más selectiva de los TIL para mejorar el perfil de seguridad, y que no compiten con los anticuerpos de bloqueo de puntos de regulación con los que pueden estar combinados.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La invención está dirigida a proteínas de fusión que incluyen la combinación de complejos de IL-15 que generalmente comprenden un dominio de IL-15, un dominio de IL-15Rα y un dominio de unión al antígeno anti-PD-1 (ABD) que no compite por unirse con nivolumab o pembrolizumab.

Por consiguiente, en algunos aspectos, la presente invención proporciona proteínas de fusión a Fc heterodiméricas IL-15/Rα dirigidas que comprenden: a) un primer monómero que comprende, del N- al C-terminal: i) una proteína de dominio sushi de IL-15 Rα; ii) un primer enlazador de dominio; iii) una proteína IL-15; y iv) una primera variante del dominio Fc; y b) un segundo monómero que comprende una cadena pesada que comprende VH-CH1-bisagra-CH2-CH3, en donde dicho CH2-CH3 es una segunda variante del dominio Fc; c) un tercer monómero que comprende una cadena ligera que

comprende VL-CL; en donde dichos dominios VH y VL forman un dominio de unión al antígeno que se une a la PD-1 humana y no compite por la PD-1 humana con nivolumab y/o pembrolizumab.

En aspectos adicionales, las proteínas de fusión a Fc heterodiméricas IL-15/Rα dirigidas tienen un dominio VH que es una variante de la SEQ ID NO: 5 que comprende la sustitución de aminoácidos F32L y el dominio VL es una variante de la SEQ ID NO: 6 que comprende N27dH y, opcionalmente, que comprende además las sustituciones de aminoácidos K30Y/S93T.

En aspectos adicionales, la proteína de fusión a Fc heterodimérica IL-15/Rα dirigida tiene el VH H1 y el VL L1.1.

En aspectos adicionales, las proteínas de fusión a Fc heterodiméricas IL-15/Rα dirigidas tienen una variante de la proteína IL-15 que comprende sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo de D30N/E64Q/N65D; D30N/N65D; N1D; N4D; D8N; D30N; D61N; E64Q; N65D; Q108E; N1D/N4D/D8N; N1D/N4D/N65D; N1D/D30N; N1D/D61N; N1D/D61N/E64Q/Q108E; N1D/E64Q; N1D/N65D; N1D/Q108E; N4D; N4D/D30N; N4D/D61N; N4D/D61N/N65D; N4D/D61N/E64Q/Q108E; N4D/E64Q; N4D/N65D; D8N/D61N; D8N/E64Q; D30N/E64Q; D30N/Q180E; D61N/E64Q/N65D; E64Q; E64Q/N65D; E64Q/Q108E y N65D/Q108E (en comparación con la SEQ ID NO: 2).

En aspectos adicionales, las proteínas de fusión a Fc heterodiméricas IL-15/Rα dirigidas tienen una primera variante del dominio Fc y unas segundas variantes de dominios Fc comprenden sustituciones de aminoácidos L368D/K370S : LS364K/E357Q, de acuerdo con la numeración de EU.

En aspectos adicionales, las proteínas de fusión a Fc heterodiméricas IL-15/Rα dirigidas de la invención tienen una primera variante del dominio Fc y una segunda variante del dominio Fc que comprenden cada uno sustituciones de aminoácidos M428L/N343S, de acuerdo con la numeración de EU.

En aspectos adicionales, la proteína de fusión a Fc heterodimérica IL-15/Rα dirigida comprende: a) un primer monómero que comprende, del N- al C-terminal: i) una proteína de dominio sushi de IL-15 Rα; ii) un primer enlazador de dominio; iii) una variante de la proteína IL-15; iv) un segundo enlazador de dominio; y v) una primera variante del dominio Fc que comprende CH2-CH3; y b) un segundo monómero que comprende del

N- al C-terminal: i) un dominio scFv; ii) un tercer enlazador de dominio; iii) una segunda variante del dominio Fc que comprende CH2-CH3; en donde dicho dominio scFv comprende un primer dominio pesado variable, un enlazador scFv y un primer dominio ligero variable, en donde dicho dominio scFv se une a PD-1 humana y no compite por dicha PD-1 humana con nivolumab y/o pembrolizumab.

En aspectos adicionales, las proteínas de fusión a Fc heterodiméricas IL-15/Rα dirigidas comprenden: a) un primer monómero que comprende, del N- al C-terminal: i) una proteína de dominio sushi de IL-15 Rα; ii) un primer enlazador de dominio; iii) una primera variante del dominio Fc que comprende CH2-CH3; b) un segundo monómero que comprende del N- al C-terminal: i) un dominio scFv; ii) un tercer enlazador de dominio; iii) una segunda variante del dominio Fc que comprende CH2-CH3; en donde dicho dominio scFv comprende un primer dominio pesado variable, un enlazador scFv y un primer dominio ligero variable, y dicho dominio scFv se une a PD-1 humana y no compite por dicha PD-1 humana con nivolumab y/o pembrolizumab; y c) un tercer monómero que comprende una variante de proteína de dominio IL-15.

En aspectos adicionales, las proteínas de fusión a Fc heterodiméricas IL-15/Rα dirigidas comprenden: a) un primer monómero que comprende una cadena pesada que comprende VH-CH1-bisagra-CH2-CH3, en donde dicho CH2-CH3 es una primera variante del dominio Fc; b) un segundo monómero que comprende del N- al C-terminal: i) una proteína de dominio sushi de IL-15 Rα; ii) un segundo enlazador de dominio; iii) una segunda variante del dominio Fc que comprende CH2-CH3; b) un tercer monómero que comprende una variante de proteína de dominio IL-15; c) un cuarto monómero que comprende una cadena ligera que comprende VL-CL; en donde dichos dominios VH y VL forman un dominio de unión al antígeno que se une a la PD-1 humana y no compite por dicha PD-1 humana con nivolumab y/o pembrolizumab.

En aspectos adicionales, las proteínas de fusión a Fc heterodiméricas IL-15/Rα dirigidas comprenden: a) un primer monómero que comprende una cadena pesada que comprende VH-CH1-bisagra-CH2-CH3, en donde dicho CH2-CH3 es una primera variante del dominio Fc; b) un segundo monómero que comprende VH-CH1-bisagra-CH2-CH3-enlazador de dominio-proteína de dominio sushi de IL-15Rα-enlazador de dominio-variante de proteína de dominio IL-15, en donde dicho CH2-CH3 es una segunda variante del dominio Fc; c) un tercer monómero que comprende una cadena ligera que comprende VL-CL; en donde dichos dominios VH y VL forman un dominio de

unión al antígeno que se une a la PD-1 humana y no compite por dicha PD-1 humana con nivolumab y/o pembrolizumab.

En aspectos adicionales, las proteínas de fusión a Fc heterodiméricas IL-15/Rα dirigidas comprenden: a) un primer monómero que comprende una cadena pesada que comprende VH-CH1-bisagra-CH2-CH3, en donde dicho CH2-CH3 es una primera variante del dominio Fc; b) un segundo monómero que comprende VH-CH1-bisagra-CH2-CH3-enlazador de dominio-proteína de dominio sushi de IL-15Rα, en donde dicho CH2-CH3 es una segunda variante del dominio Fc; c) un tercer monómero que comprende una variante de proteína de dominio IL-15; d) un cuarto monómero que comprende una cadena ligera que comprende VL-CL; en donde dichos dominios VH y VL se unen a PD-1 humana y no compiten por dicha PD-1 humana con nivolumab y/o pembrolizumab.

En aspectos adicionales, las proteínas de fusión a Fc heterodiméricas IL-15/Rα dirigidas comprenden: a) un primer monómero que comprende, del N- al C-terminal: un VH-CH1-enlazador de dominio-variante de proteína de dominio IL-15-enlazador de dominio-CH2-CH3, en donde dicho CH2-CH3 es una primera variante del dominio Fc; b) un segundo monómero que comprende del N- al C-terminal: un VH-CH1-enlazador de dominio-proteína de dominio sushi de IL-15 Rα-enlazador de dominio-CH2-CH3, en donde dicho CH2-CH3 es una segunda variante del dominio Fc; c) un tercer monómero que comprende una cadena ligera que comprende VL-CL; en donde dichos dominios VH y VL forman un dominio de unión al antígeno que se une a la PD-1 humana y no compite por dicha PD-1 humana con nivolumab y/o pembrolizumab.

En aspectos adicionales, la proteína de fusión de Fc heterodimérica IL-15/Rα dirigida que comprende: a) un primer monómero que comprende, del N- al C-terminal: un VH-CH1-enlazador de dominio-variante de proteína de dominio sushi de IL-15 Rα-enlazador de dominio-variante de proteína de dominio IL-15-enlazador de dominio-CH2-CH3, en donde dicho CH2-CH3 es una primera variante del dominio Fc; b) un segundo monómero que comprende una cadena pesada que comprende VH-CH1-bisagra CH2-CH3, en donde dicho CH2-CH3 es una segunda variante del dominio Fc; c) un tercer monómero que comprende una cadena ligera que comprende VL-CL; en donde dichos dominios VH y VL forman un dominio de unión al antígeno que se une a la PD-1 humana y no compite por dicha PD-1 humana con nivolumab y/o pembrolizumab.

En aspectos adicionales, la invención proporciona composiciones de ácido nucleico que comprenden: a) un primer ácido nucleico que codifica el primer monómero de las modalidades; b) un segundo ácido nucleico que codifica el segundo monómero de las modalidades; y c) un tercer ácido nucleico que codifica el tercer monómero de las modalidades.

En aspectos adicionales, la invención proporciona composiciones de vectores de expresión que comprenden: a) un vector de expresión que comprende los primeros ácidos nucleicos; b) un vector de expresión que comprende los segundos ácidos nucleicos; y c) un vector de expresión que comprende los terceros ácidos nucleicos.

En un aspecto adicional, la invención proporciona células huésped que comprenden las composiciones de vectores de expresión.

En un aspecto adicional, la invención proporciona métodos para producir las proteínas de fusión a Fc heterodiméricas IL-15/Rα dirigidas de la invención, el método comprende: cultivar las células huésped en condiciones donde se expresa dicha proteína de fusión a Fc heterodimérica IL-15/Rα dirigida; y recuperar dicha proteína.

En un aspecto adicional, la invención proporciona métodos para tratar un cáncer que comprenden administrar a un paciente que lo necesita una composición farmacéutica que comprende las proteínas de fusión a Fc heterodiméricas IL-15/Rα dirigidas de la invención.

En un aspecto adicional, la invención proporciona métodos para tratar un cáncer que comprenden administrar a un paciente que lo necesita una composición farmacéutica que comprende las proteínas de fusión a Fc heterodiméricas IL-15/Rα dirigidas de la invención en combinación con un anticuerpo anti-PD-1 que incluye nivolumab o pembrolizumab.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1A-1B representan las secuencias para IL-15 y sus receptores.

La Figura 2 representa las secuencias de PD-1 tanto para humanos como para monos cinomolgos para facilitar el desarrollo de dominios de unión al antígenos que se unen a ambos para facilitar el desarrollo clínico.

Las Figuras 3A-3E representan pares útiles de conjuntos de variantes de heterodimerización de Fc (que incluyen variantes sesgadas y de pI). Existen variantes para las cuales no hay variantes correspondientes de “monómero 2”; estas son variantes de pI que se pueden usar solas en cualquier monómero.

La Figura 4 representa una lista de regiones constantes de variantes isostéricas de anticuerpos y sus respectivas sustituciones. pI_(-) indica variantes de pI más bajo, mientras que pI_(+) indica variantes de pI más alto. Estas pueden combinarse opcional e independientemente con otras variantes de heterodimerización de las invenciones (y también con otros tipos de variantes, como se indica en la presente descripción).

La Figura 5 representa variantes de ablación útiles que remueven la unión a FcyR (a veces denominadas variantes “de desactivación génica” o “KO”). Generalmente, las variantes de ablación se encuentran en ambos monómeros, aunque en algunos casos pueden estar en un solo monómero.

Las Figuras 6A-6E muestran modalidades particularmente útiles de componentes “que no son citocina” de las proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc de la invención.

Las Figuras 7A-7F muestran modalidades particularmente útiles de componentes “que no son citocina”/“que no son Fv” de las proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 de la invención.

La Figura 8 representa varios enlazadores ilustrativos de longitud variable para usar en las proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc. En algunas modalidades, estos enlazadores son útiles para unir el C-terminal de IL-15 y/o IL-15Rα(sushi) al N-terminal de la región Fc. En algunas modalidades, estos enlazadores son útiles para fusionar IL-15 a la IL-15Rα(sushi).

La Figura 9A-9C representa varios enlazadores scFv cargados que son útiles para aumentar o disminuir el pI de anticuerpos heterodiméricos que utilizan uno o más scFv como un componente. El enlazador positivo (+H) se usa en particular en la presente descripción. Un único enlazador scFv del estado de la técnica con una única carga se denomina “Whitlow”, de Whitlow y otros, Protein Engineering 6(8):989-995 (1993). Cabe destacar que este enlazador se usó para reducir la agregación y mejorar la estabilidad proteolítica en los scFv. En algunas modalidades, estos enlazadores son útiles para unir

el C-terminal de IL-15 y/o IL-15Rα(sushi) al N-terminal de la región Fc; y/o fusionar la IL-15 a la IL-15Rα(sushi).

Las Figuras 10A-10D muestran las secuencias de diversas estructuras principales de formato IL-15/Rα-Fc útiles basadas en IgG1 humana, sin las secuencias de citocina (por ejemplo, la IL-15 y/o IL-15Rα(sushi)). Es importante tener en cuenta que estas estructuras principales también son útiles en ciertas modalidades de proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1. La estructura principal 1 se basa en IgG1 humana (alotipo 356E/358M), e incluye C220S en ambas cadenas, las variantes sesgadas S364K/E357Q : L368D/K370S, las variantes de pI Q295E/N384D/Q418E/N421D en la cadena con las variantes sesgadas L368D/K370S y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K en ambas cadenas. La estructura principal 2 se basa en IgG1 humana (alotipo 356E/358M), e incluye C220S en ambas cadenas, las variantes sesgadas S364K : L368D/K370S, las variantes de pI Q295E/N384D/Q418E/N421D en la cadena con las variantes sesgadas L368D/K370S y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K en ambas cadenas. La estructura principal 3 se basa en IgG1 humana (alotipo 356E/358M), e incluye C220S en ambas cadenas, las variantes sesgadas S364K : L368E/K370S, las variantes de pI Q295E/N384D/Q418E/N421D en la cadena con las variantes sesgadas L368E/K370S y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K en ambas cadenas. La estructura principal 4 se basa en IgG1 humana (alotipo 356E/358M), e incluye C220S en ambas cadenas, las variantes sesgadas D401K : K360E/Q362E/T411E, las variantes de pI Q295E/N384D/Q418E/N421D en la cadena con las variantes sesgadas K360E/Q362E/T411E y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K en ambas cadenas. La estructura principal 5 se basa en IgG1 humana (alotipo 356D/358L), e incluye C220S en ambas cadenas, las variantes sesgadas S364K/E357Q : L368D/K370S, las variantes de pI Q295E/N384D/Q418E/N421D en la cadena con las variantes sesgadas L368D/K370S y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K en ambas cadenas. La estructura principal 6 se basa en IgG1 humana (alotipo 356E/358M), e incluye C220S en ambas cadenas, las variantes sesgadas S364K/E357Q : L368D/K370S, las variantes de pI Q295E/N384D/Q418E/N421D en la cadena con las variantes sesgadas L368D/K370S y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K en ambas cadenas, así como también una variante N297A en ambas cadenas. La estructura principal 7 es

idéntica a la 6, excepto que la mutación es N297S. Los formatos alternativos para las estructuras principales 6 y 7 pueden excluir las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K en ambas cadenas. La estructura principal 8 se basa en la IgG4 humana e incluye las variantes sesgadas S364K/E357Q : L368D/K370S, las variantes de pI Q295E/N384D/Q418E/N421D en la cadena con las variantes sesgadas L368D/K370S, así como también una variante S228P (numeración de EU, esto es S241P en Kabat) en ambas cadenas que remueve el intercambio del brazo Fab como se conoce en la técnica. La estructura principal 9 se basa en IgG2 humana, e incluye las variantes sesgadas S364K/E357Q : L368D/K370S, las variantes de pI Q295E/N384D/Q418E/N421D en la cadena con las variantes sesgadas L368D/K370S. La estructura principal 10 se basa en IgG2 humana, e incluye las variantes sesgadas S364K/E357Q : L368D/K370S, las variantes de pI Q295E/N384D/Q418E/N421D en la cadena con las variantes sesgadas L368D/K370S así como también una variante S267K en ambas cadenas. La estructura principal 11 es idéntica a la estructura principal 1, excepto que incluye las mutaciones Xtend M428L/N434S. La estructura principal 12 se basa en IgG1 humana (alotipo 356E/358M), e incluye C220S en ambas cadenas idénticas, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K en ambas cadenas idénticas. La estructura principal 13 se basa en IgG1 humana (alotipo 356E/358M), e incluye C220S en ambas cadenas, las variantes sesgadas S364K/E357Q : L368D/K370S, las variantes de pI P217R/P228R/N276K en la cadena con las variantes sesgadas S364K/E357Q y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K en ambas cadenas.

Como apreciarán los expertos en la técnica y se indica a continuación, estas secuencias pueden usarse con cualquier par de IL-15 e IL-15Rα(sushi) indicado en la presente descripción, que incluye, pero no se limita a, IL-15/Rα-heteroFc, ncIL-15/Rα, y scIL-15/Rα, como se representa esquemáticamente en las Figuras 14A-14G. Además, cualquier variante de IL-15 y/o IL-15Rα(sushi) puede incorporarse en estas estructuras principales de las Figuras 11A-11C en cualquier combinación.

Se incluyen dentro de cada una de estas estructuras principales secuencias que son 90, 95, 98 y 99 % idénticas (como se define en la presente descripción) a las secuencias citadas, y/o contienen de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácidos adicionales (en comparación con el “de origen” de la Figura, que, como apreciarán los expertos en la técnica, ya contiene varias modificaciones de aminoácidos en

comparación con la IgG1 humana parental (o IgG2 o IgG4, en dependencia de la estructura principal). Es decir, las estructuras principales citadas pueden contener modificaciones adicionales de aminoácidos (generalmente sustituciones de aminoácidos) además de las variantes sesgadas, de pI y de ablación contenidas dentro de las estructuras principales de esta Figura.

La Figura 11 muestra las secuencias de varias estructuras principales útiles de formato de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a PD-1 en base a IgG1 humana, sin las secuencias de citocina (por ejemplo, la IL-15 y/o IL-15Rα(sushi)) o VH, y que excluyen además las estructuras principales de cadenas ligeras afines que se representan en la Figura 12. La estructura principal 1 se basa en IgG1 humana (alotipo 356E/358M), e incluye las variantes sesgadas S364K/E357Q : L368D/K370S, C220S y las variantes de pI Q295E/N384D/Q418E/N421D en la cadena con las variantes sesgadas L368D/K370S y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K en ambas cadenas. La estructura principal 2 se basa en IgG1 humana (alotipo 356E/358M), e incluye las variantes sesgadas S364K/E357Q : L368D/K370S, las variantes de pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D en la cadena con las variantes sesgadas L368D/K370S, C220S en la cadena con variantes S364K/E357Q, y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K en ambas cadenas. La estructura principal 3 se basa en IgG1 humana (alotipo 356E/358M), e incluye las variantes sesgadas S364K/E357Q : L368D/K370S, las variantes de pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D en las cadenas con variantes sesgadas L368D/K370S, las variantes de pI Q196K/I199T/P217R/P228R/N276K en las cadenas con las variantes S364K/E357Q, y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K en ambas cadenas.

En determinadas modalidades, estas secuencias pueden ser del alotipo 356D/358L. En otras modalidades, estas secuencias pueden incluir las sustituciones N297A o N297S. En algunas otras modalidades, estas secuencias pueden incluir las mutaciones Xtend M428L/N434S. En otras modalidades adicionales, en su lugar estas secuencias pueden basarse en IgG4 humana, e incluir una variante S228P (numeración de EU, esto es S241P en Kabat) en ambas cadenas que remueve el intercambio del brazo Fab como se conoce en la técnica. En otras modalidades adicionales, en su lugar estas secuencias pueden basarse en IgG2 humana. Además, en su lugar estas secuencias pueden utilizar

las otras variantes sesgadas, variantes de pI y variantes de ablación representadas en las Figuras 4A-4E, 5 y 6.

Como apreciarán los expertos en la técnica y como se indica a continuación, estas secuencias pueden usarse con cualquier par de IL-15 e IL-15Rα(sushi) indicado en la presente descripción, que incluye, pero no se limitan a, scIL-15/Rα, ncIL-15/Rα y dsIL-15Rα, como se representa esquemáticamente en las Figuras 34A-34H. Además, como apreciarán los expertos en la técnica y como se indica a continuación, cualquier variante de IL-15 y/o IL-15Rα(sushi) puede incorporarse en estas estructuras principales. Además, como apreciarán los expertos en la técnica y como se indica a continuación, estas secuencias pueden usarse con cualquier par de VH y VL como se indica en la presente descripción, que incluye un scFv o un Fab.

Se incluyen dentro de cada una de estas estructuras principales secuencias que son 90, 95, 98 y 99 % idénticas (como se define en la presente descripción) a las secuencias citadas, y/o contienen de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácidos adicionales (en comparación con el “de origen” de la Figura, que, como apreciarán los expertos en la técnica, ya contiene varias modificaciones de aminoácidos en comparación con la IgG1 humana parental (o IgG2 o IgG4, en dependencia de la estructura principal). Es decir, las estructuras principales citadas pueden contener modificaciones adicionales de aminoácidos (generalmente sustituciones de aminoácidos) además de las variantes sesgadas, de pI y de ablación contenidas dentro de las estructuras principales de esta Figura.

La Figura 12 representa la estructura principal “que no es Fv” de cadenas ligeras afines (es decir, la cadena ligera constante) que son útiles en las proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 de la invención.

Las Figuras 13A-13G representan diversos formatos para las proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc “no dirigidas” de la presente invención. La fusión de Fc heterodimérico a IL-15Rα o “IL-15/Rα-heteroFc” (Figura 13A) comprende IL-15 fusionada de manera recombinante a un lado de un Fc heterodimérico e IL-15Rα(sushi) fusionado de manera recombinante al otro lado de un Fc heterodimérico. La IL-15 e IL-15Rα(sushi) pueden tener un enlazador Gly-Ser de longitud variable entre el C-terminal y el N-terminal de la región Fc. La fusión de IL-15/Rα-Fc de simple cadena o “scIL-15/Rα-Fc” (Figura 13B) comprende IL-15Rα(sushi) fusionado a IL-15 mediante un enlazador de longitud variable

(denominada un complejo IL-15/IL-15Rα(sushi) “de simple cadena” o “scIL-15/Rα”) que luego se fusiona al N-terminal de una región Fc heterodimérica, con el otro lado de la molécula es “Fc solo” o “Fc vacío”. La IL-15/Rα-Fc no covalente o “ncIL-15/Rα-Fc” (Figura 13C) comprende IL-15Rα(sushi) fusionada a una región Fc heterodimérica, mientras que IL-15 se transfecta por separado de manera que se forma un complejo IL-15/Rα no covalente, con el otro lado de la molécula es “Fc solo” o “Fc vacío”. La fusión de IL-15/Rα-Fc bivalente no covalente o “ncIL-15/Rα-Fc bivalente” (Figura 13D) comprende IL-15Rα(sushi) fusionada al N-terminal de una región Fc homodimérica, mientras que IL-15 se transfecta por separado, de manera que se forma un complejo IL-15/Rα no covalente. La fusión de IL-15/Rα-Fc bivalente de simple cadena o “scIL-15/Rα-Fc bivalente” (Figura 13E) comprende IL-15 fusionada a IL-15Rα(sushi) mediante un enlazador de longitud variable (denominada un complejo IL-15/IL-15Rα(sushi) “de simple cadena” o “scIL-15/Rα”) que luego se fusiona al N-terminal de una región Fc homodimérica. La fusión Fc de IL-15/Rα no covalente o “Fc-ncIL-15/Rα” (Figura 13F) comprende IL-15Rα(sushi) fusionado al C-terminal de una región Fc heterodimérica, mientras que IL-15 se transfecta por separado, de manera que se forma un complejo IL-15/Rα no covalente, con el otro lado de la molécula es “Fc solo” o “Fc vacío”. La fusión de Fc de simple cadena a IL-15/Rα o “Fc-scIL-15/Rα" (Figura 13G) comprende IL-15 fusionada a IL-15Rα(sushi) mediante un enlazador de longitud variable (denominada un complejo IL-15/IL-15Rα(sushi) “de simple cadena” o “scIL-15/Rα”) que luego se fusiona al C-terminal de una región Fc heterodimérica, con el otro lado de la molécula es “Fc solo” o “Fc vacío”.

La Figura 14 representa las secuencias de proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc ilustrativas del formato “IL-15/Rα-heteroFc” no dirigida. La IL-15 e IL-15Rα(sushi) están subrayadas, los enlazadores están doble subrayados (aunque, como apreciarán los expertos en la técnica, los enlazadores pueden reemplazarse por otros enlazadores, algunos de los cuales se representan en las Figuras 8 y 9), y las barras diagonales (/) indican los límites entre IL-15, IL-15Rα, enlazadores y regiones Fc.

La Figura 15 representa las secuencias de proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc ilustrativa del formato “scIL-15/Rα-Fc” no dirigida. La IL-15 e IL-15Rα(sushi) están subrayadas, los enlazadores están doble subrayados (aunque, como apreciarán los expertos en la técnica, los enlazadores pueden reemplazarse por otros enlazadores, algunos de los

cuales se representan en las Figuras 8 y 9), y las barras diagonales (/) indican los límites entre IL-15, IL-15Rα, enlazadores y regiones Fc.

La Figura16 representa secuencias de proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc ilustrativas del formato “ncIL-15/Rα-Fc” no dirigida. La IL-15 e IL-15Rα(sushi) están subrayadas, los enlazadores están doble subrayados (aunque, como apreciarán los expertos en la técnica, los enlazadores pueden reemplazarse por otros enlazadores, algunos de los cuales se representan en las Figuras 8 y 9), y las barras diagonales (/) indican los límites entre IL-15, IL-15Rα, enlazadores y regiones Fc.

Las Figuras 17A-17C representan la inducción de la proliferación de A) células NK ($CD56^+/CD16^+$), B) células T $CD4^+$ y C) células T $CD8^+$ mediante proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc ilustrativas de formato scIL-15/Rα-Fc (XENP21478) y de formato ncIL-15/Rα-Fc (XENP21479) en base a la expresión de Ki67 medida por FACS.

La Figura 18 representa la estructura de IL-15 en complejo con IL-15Rα, IL-2Rß y cadena gamma común. Se muestran las ubicaciones de sustituciones diseñadas para reducir la potencia.

Las Figuras 19A-19C representan secuencias para variantes ilustrativas de IL-15 diseñadas genéticamente con el objetivo de reducir la potencia. Se incluyen dentro de cada una de estas variantes de secuencias de IL-15 secuencias que son 90, 95, 98 y 99 % idénticas (como se define en la presente descripción) a las secuencias citadas, y/o contienen de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácidos adicionales. Como resultará evidente para los expertos en la técnica, las variantes de IL-15 pueden usarse en cualquiera de las proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc y de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 descritas en la presente descripción.

La Figura 20 representa secuencias de proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc ilustrativas (por ejemplo, constructos no dirigidos) del formato “IL-15/Rα-heteroFc no dirigida” que comprende variantes de IL-15 diseñadas genéticamente con el objetivo de reducir la potencia. La IL-15 e IL-15Rα(sushi) están subrayadas, los enlazadores están doble subrayados (aunque, como apreciarán los expertos en la técnica, los enlazadores pueden reemplazarse por otros enlazadores, algunos de los cuales se representan en las Figuras 8 y 9), y las barras diagonales (/) indican los límites entre IL-15, IL-15Rα, enlazadores y regiones Fc.

Las Figuras 21A-21B representan las secuencias de proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc ilustrativas del formato “scIL-15/Rα-Fc” no dirigida que comprenden variantes de IL-15 diseñadas genéticamente con el objetivo de reducir la potencia. La IL-15 e IL-15Rα(sushi) están subrayadas, los enlazadores están doble subrayados (aunque, como apreciarán los expertos en la técnica, los enlazadores pueden reemplazarse por otros enlazadores, algunos de los cuales se representan en las Figuras 8 y 9), y las barras diagonales (/) indican los límites entre IL-15, IL-15Rα, enlazadores y regiones Fc.

Las Figuras 22A-22B representan el porcentaje de células A) $CD4^{+}CD45RA^{-}$ y b) $CD8^{+}CD45RA^{-}$ que expresan Ki67 después de la incubación con los artículos de prueba indicados.

La Figura 23 representa las secuencias de aminoácidos de XENP15074 (un mAb anti-RSV bivalente basado en motavizumab y Fc de IgG1 humana con sustituciones de E233P/L234V/L235A/G236del/S267K). Las CDR están subrayadas y las barras diagonales indican los límites de las regiones variables.

La Figura 24 muestra las secuencias de aminoácidos de A) XENP16432 (un mAb anti-PD-1 bivalente basado en nivolumab y Fc de IgG1 humana con sustituciones de E233P/L234V/L235A/G236del/S267K) B) XENP21641 (pembrolizumab) y C) XENP28437 (un mAb anti-PD-1 bivalente basado en pembrolizumab y Fc de IgG1 humano con sustituciones de E233P/L234V/L235A/G236del/S267K). Las CDR están subrayadas y las barras diagonales indican los límites de las regiones variables.

La Figura 25 representa las secuencias de XENP21575, un anticuerpo anti-PD-1 quimérico y humanizado basado en las regiones variables del clon de hibridoma 1C11 e IgG1 humana con sustituciones E233P/L234V/L235A/G236del/S267K en la cadena pesada. Las CDR están subrayadas y las barras diagonales indican los límites de los dominios variables. Como se indica en la presente descripción y se aplica a cada secuencia en la presente descripción que contiene CDR, la identificación exacta de las ubicaciones de las CDR puede ser ligeramente diferente en dependencia de la numeración usada como se muestra en la tabla 1, y por lo tanto, se incluyen en la presente descripción no solo las CDR que están subrayadas sino también las CDR incluidas en los dominios V_H y V_L que usan otros sistemas de numeración. Como apreciarán los expertos en la técnica, los dominios V_H y V_L pueden configurarse en el

formato de Fab o scFv para usar en las proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 de la invención.

La Figura 26 representa las secuencias de variantes humanizadas ilustrativas de mAb A y mAb B anti-PD-1 en formato de IgG1 humana bivalente con sustituciones E233P/L234V/L235A/G236del/S267K en la cadena pesada. Las CDR están subrayadas y las barras diagonales indican los límites de los dominios variables. Como se indica en la presente descripción y se aplica a cada secuencia en la presente descripción que contiene CDR, la identificación exacta de las ubicaciones de las CDR puede ser ligeramente diferente en dependencia de la numeración usada como se muestra en la tabla 1, y por lo tanto, se incluyen en la presente descripción no solo las CDR que están subrayadas sino también las CDR incluidas en los dominios V_H y V_L que usan otros sistemas de numeración. Como apreciarán los expertos en la técnica, los dominios V_H y V_L pueden configurarse en el formato de Fab o scFv para usar en las proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 de la invención.

La Figura 27 representa la caracterización de epítopos de XENP16432 (un mAb anti-PD-1 bivalente basado en nivolumab), XENP21461 (pembrolizumab), mAb quimérico A (chmAb A), mAb quimérico B (chmAb B) y un mAb basado en 1C11 como se indica mediante el Octet de respuesta BLI normalizado. La respuesta BLI normalizada superior a 0,5 indica que un par de anticuerpos no se une al mismo epítopo.

Las Figuras 28A-28H representan varios formatos de las proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 de la presente invención. El formato “scIL-15/Rα x scFv” (Figura 28A) comprende IL-15Rα(sushi) fusionado a IL-15 mediante un enlazador de longitud variable (denominado “scIL-15/Rα”) que luego se fusiona al N-terminal de una región Fc heterodimérica, con un scFv fusionado al otro lado del Fc heterodimérico. El formato “scFv x ncIL-15/Rα” (Figura 28B) comprende un scFv fusionado al N-terminal de una región Fc heterodimérica, con IL-15Rα(sushi) fusionada al otro lado del Fc heterodimérico, mientras que IL-15 se transfecta por separado de manera que se forma un complejo IL-15/Rα no covalente. El formato “scIL-15/Rα x Fab” (Figura 28C) comprende IL-15Rα(sushi) fusionado a IL-15 mediante un enlazador de longitud variable (denominado “scIL-15/Rα”) que luego se fusiona al N-terminal de una región Fc heterodimérica, con una cadena pesada variable (VH) fusionada al otro lado del Fc heterodimérico, mientras que una cadena ligera correspondiente se transfecta por separado para formar un Fab con la VH. El formato “ncIL-15/Rα x Fab” (Figura 28D)

comprende una VH fusionada al N-terminal de una región Fc heterodimérica, con IL-15Rα(sushi) fusionada al otro lado del Fc heterodimérico, mientras que una cadena ligera correspondiente se transfecta por separado para formar un Fab con la VH, y mientras que IL-15 se transfecta por separado de manera que se forma un complejo IL-15/Rα no covalente. El formato “mAb-scIL-15/Rα” (Figura 28E) comprende una VH fusionada al N-terminal de un primer y segundo Fc heterodimérico, con IL-15 que se fusiona a IL-15Rα(sushi) que luego se fusiona adicionalmente al C-terminal de una de las regiones Fc heterodiméricas, mientras que las cadenas ligeras correspondientes se transfectan por separado de modo que forman Fab con las VH. El formato “mAb-ncIL-15/Rα” (Figura 28F) comprende una VH fusionada al N-terminal de un primer y un segundo Fc heterodimérico, con IL-15Rα(sushi) fusionado al C-terminal de una de la región Fc heterodimérica, mientras que las cadenas ligeras correspondientes se transfectan por separado para formar Fab con las VH, y mientras que IL-15 se transfecta por separado de manera que se forma un complejo IL-15/Rα no covalente. El formato “central-IL-15/Rα” (Figura 28G) comprende una VH fusionada de manera recombinante al N-terminal de IL-15 que luego se fusiona adicionalmente a un lado de un Fc heterodimérico y una VH fusionada de manera recombinante al N-terminal de IL-15Rα(sushi), que luego se fusiona adicionalmente al otro lado del Fc heterodimérico, mientras que las cadenas ligeras correspondientes se transfectan por separado para formar Fab con las VH. El formato “central-scIL-15/Rα” (Figura 28H) comprende una VH fusionada al N-terminal de IL-15Rα(sushi) que se fusiona a IL-15 que luego se fusiona adicionalmente a un lado de un Fc heterodimérico y una VH fusionada al otro lado del Fc heterodimérico, mientras que las cadenas ligeras correspondientes se transfectan por separado para formar Fab con las VH.

La Figura 29 representa secuencias de proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [C]PD-1 ilustrativas del formato “scIL-15/Rα x Fab”. Las CDR están en negritas. Como se indica en la presente descripción y se aplica a cada secuencia en la presente descripción que contiene CDR, la identificación exacta de las ubicaciones de las CDR puede ser ligeramente diferente en dependencia de la numeración usada como se muestra en la tabla 1, y por lo tanto, se incluyen en la presente descripción no solo las CDR que están subrayadas sino también las CDR incluidas en los dominios V_H y V_L que usan otros sistemas de numeración. La IL-15 e IL-15Rα(sushi) están en cursiva, los enlazadores están doble subrayados (aunque, como apreciarán los expertos en la

técnica, los enlazadores pueden reemplazarse por otros enlazadores, algunos de los cuales se representan en las Figuras 8 y 9), y las barras diagonales (/) indican los límites entre IL-15, IL-15Rα, enlazadores, regiones variables y regiones Fc/constantes. Como resultará evidente para los expertos en la técnica, cada una de las proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas descritas puede incluir o excluir Xtend Fc (M428L/N434S).

La Figura 30 representa secuencias de proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 ilustrativas del formato “scIL-15/Rα x Fab”. Las CDR están subrayadas. Como se indica en la presente descripción y se aplica a cada secuencia en la presente descripción que contiene CDR, la identificación exacta de las ubicaciones de las CDR puede ser ligeramente diferente en dependencia de la numeración usada como se muestra en la tabla 1, y por lo tanto, se incluyen en la presente descripción no solo las CDR que están subrayadas sino también las CDR incluidas en los dominios V_H y V_L que usan otros sistemas de numeración. La IL-15 e IL-15Rα(sushi) están en cursiva, los enlazadores están doble subrayados (aunque, como apreciarán los expertos en la técnica, los enlazadores pueden reemplazarse por otros enlazadores, algunos de los cuales se representan en las Figuras 8 y 9), y las barras diagonales (/) indican los límites entre IL-15, IL-15Rα, enlazadores, regiones variables y regiones Fc/constantes. Como resultará evidente para los expertos en la técnica, cada una de las proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas descritas puede incluir o excluir Xtend Fc (M428L/N434S).

Las Figuras 31A-31D representan las secuencias de fusiones de control de IL-15/Rα-Fc dirigidas a RSV. Las CDR están subrayadas. Como se indica en la presente descripción y se aplica a cada secuencia en la presente descripción que contiene CDR, la identificación exacta de las ubicaciones de las CDR puede ser ligeramente diferente en dependencia de la numeración usada como se muestra en la tabla 1, y por lo tanto, se incluyen en la presente descripción no solo las CDR que están subrayadas sino también las CDR incluidas en los dominios V_H y V_L que usan otros sistemas de numeración. La IL-15 e IL-15Rα(sushi) están en cursiva, los enlazadores están doble subrayados (aunque, como apreciarán los expertos en la técnica, los enlazadores pueden reemplazarse por otros enlazadores, algunos de los cuales se representan en las Figuras 8 y 9), y las barras diagonales (/) indican los límites entre IL-15, IL-15Rα, enlazadores, regiones variables y regiones Fc/constantes. Como resultará evidente para los expertos en la técnica, cada una de las proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas descritas puede excluir o incluir Xtend Fc (M428L/N434S).

Las Figuras 32A-32B representan la proliferación de A) células T $CD8^+$ y B) células T $CD4^+$ después de la incubación con fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 (XENP28532, XENP28692 y XENP25850), así como la fusión de control de IL-15/Rα-Fc dirigido a RSV (XENP26007) y mAb anti-PD-1 (XENP28519).

Las Figuras 33A-33B representan la inducción de la fosforilación de STAT5 en A) $CD4^+CD45RA^-CD25^+$ y B) $CD8^+CD45RA^-CD25^+$ por XENP25850 (una fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a PD-1 ilustrativa). Las células frescas se indican con líneas de puntos y las células activadas se indican con líneas continuas. Las células frescas son todas $CD25^-$.

Las Figuras 34A-34B representan la inducción de la fosforilación de STAT5 en células T $CD8^+CD45RA^-CD25^+PD\text{-}1^+$ por A) fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a [C]PD-1 XENP25937 y B) fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a [NC]PD-1 XENP28532 después de la preincubación con XENP16432 basado en nivolumab, pembrolizumab o mAb anti-RSV XENP15074.

La Figura 35 representa el cambio en el peso corporal de ratones NSG injertados con huPBMC a lo largo del tiempo (como porcentaje del peso corporal inicial) después de la dosificación con los artículos de prueba indicados.

Las Figuras 36A-36B representan A) recuentos de células T $CD8^+$ y B) recuentos de células T $CD4^+$ el día 14 después de la primera dosis de los artículos de prueba indicados en ratones NSG injertados con PBMC humanos.

Las Figuras 37A-37B representan la expresión de CD25 en A) células T $CD8^+$ y B) células T $CD4^+$ el día 10 después de la primera dosis de los artículos de prueba indicados en ratones NSG injertados en PBMC humanos.

La Figura 38 representa la proporción de células T $CD8^+$ a células T $CD4^+$ el día 10 después de la primera dosis de los artículos de prueba indicados en ratones NSG injertados en PBMC humanos.

Las Figuras 39A-39B representan A) recuentos de células T $CD8^+$ y B) recuentos de células T $CD4^+$ el día 10 después de la primera dosis de los artículos de prueba indicados en ratones NSG injertados en PBMC humanos.

Las Figuras 40A-40B representan la expresión de CD25 en A) células T $CD8^+$ y B) células T $CD4^+$ el día 10 después de la primera dosis de los artículos de prueba indicados en ratones NSG injertados en PBMC humanos.

La Figura 41 representa la concentración sérica de los artículos de prueba indicados con el tiempo en monos cinomolgos después de una primera dosis a las concentraciones relativas indicadas. Figura 42

La Figura 42 representa las secuencias de XENP29484 y XENP29485, proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 ilustrativas que tienen la variante IL-15(D30N/N65D). Las CDR están subrayadas. Como se indica en la presente descripción y se aplica a cada secuencia en la presente descripción que contiene CDR, la identificación exacta de las ubicaciones de las CDR puede ser ligeramente diferente en dependencia de la numeración usada como se muestra en la tabla 1, y por lo tanto, se incluyen en la presente descripción no solo las CDR que están subrayadas sino también las CDR incluidas en los dominios V_H y V_L que usan otros sistemas de numeración. La IL-15 e IL-15Rα(sushi) están en cursiva, los enlazadores están doble subrayados (aunque, como apreciarán los expertos en la técnica, los enlazadores pueden reemplazarse por otros enlazadores, algunos de los cuales se representan en las figuras, y las barras diagonales (/) indican los límites entre IL-15, IL-15Rα, enlazadores y regiones constantes/Fc.

Las Figuras 43A-43X representan las cadenas pesadas variables y ligeras variables para ABD anti-PD-1 ilustrativos adicionales que no compiten con nivolumab ni pembrolizumab. Las CDR están subrayadas. Como se indica en la presente descripción y se aplica a cada secuencia en la presente descripción que contiene CDR, la identificación exacta de las ubicaciones de las CDR puede ser ligeramente diferente en dependencia de la numeración usada como se muestra en la tabla 1, y por lo tanto, se incluyen en la presente descripción no solo las CDR que están subrayadas sino también las CDR incluidas en los dominios V_H y V_L que usan otros sistemas de numeración.

Las Figuras 44A-44B representan el porcentaje de células T $PD\text{-}1^+$ A) $CD8^+CD45RA^-CD45RO^+$ y B) $CD4^+CD45RA^-CD45RO^+$ después del tratamiento con la fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a PD-1 XENP28532 así como el control XENP24306 (fusión de IL-15/Rα-Fc no dirigida) y XENP26007 (fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a RSV).

La Figura 45 representa las secuencias para variantes humanizadas ilustrativas del mAb anti-PD-1 C en el formato IgG1 humano bivalente con sustituciones E233P/L234V/L235A/G236del/S267K en la cadena pesada. Las CDR están subrayadas y las barras diagonales indican los límites de los dominios variables. Como se indica en la presente descripción y se aplica a cada secuencia en la presente descripción que contiene CDR, la identificación exacta de las ubicaciones de las CDR puede ser ligeramente diferente en dependencia de la numeración usada como se muestra en la tabla 1, y por lo tanto, se incluyen en la presente descripción no solo las CDR que están subrayadas sino también las CDR incluidas en los dominios V_H y V_L que usan otros sistemas de numeración. Como apreciarán los expertos en la técnica, los dominios V_H y V_L pueden configurarse en el formato de Fab o scFv para usar en las proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 de la invención.

La Figura 46 representa la afinidad de XENP28536, XENP28537, XENP28538, XENP28539 y XENP28519 por PD-1 humana y de cinomolgos como se determinó por Octet.

La Figura 47 representa la caracterización de epítopos de XENP16432 (un mAb anti-PD-1 bivalente basado en nivolumab), XENP21461 (pembrolizumab) y mAb C quimérico (chmAb C). La respuesta BLI normalizada superior a 0,5 indica que un par de anticuerpos no se une al mismo epítopo. Los datos indican que el mAb anti-PD-1 C no se une al mismo epítopo que nivolumab y pembrolizumab.

La Figuras 48A-48C representan secuencias de proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 ilustrativas del formato “scIL-15/Rα x Fab” que comprenden el brazo dirigido a PD-1 basado en el mAb C y diversas variantes de potencia de IL-15. Las CDR están subrayadas. Como se indica en la presente descripción y se aplica a cada secuencia en la presente descripción que contiene CDR, la identificación exacta de las ubicaciones de las CDR puede ser ligeramente diferente en dependencia de la numeración usada como se muestra en la tabla 1, y por lo tanto, se incluyen en la presente descripción no solo las CDR que están subrayadas sino también las CDR incluidas en los dominios V_H y V_L que usan otros sistemas de numeración. Los enlazadores están doble subrayados (aunque, como apreciarán los expertos en la técnica, los enlazadores pueden reemplazarse por otros enlazadores, algunos de los cuales se representan en la Figura 65 y la Figura 66), y las barras diagonales (/) indican los límites entre IL-15, IL-15Rα, enlazadores, regiones variables y regiones

Fc/constantes. Como resultará evidente para los expertos en la técnica, cada una de las proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 descritas también puede excluir o incluir Xtend Fc (M428L/N434S).

Las Figuras 49A-49C representan secuencias de proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 ilustrativas del formato “scIL-15/Rα x Fab” que comprenden el brazo dirigido a PD-1 basado en el mAb C y diversas variantes de potencia de IL-15, que comprenden adicionalmente Xtend Fc (M428L/N434S). Las CDR están subrayadas. Como se indica en la presente descripción y se aplica a cada secuencia en la presente descripción que contiene CDR, la identificación exacta de las ubicaciones de las CDR puede ser ligeramente diferente en dependencia de la numeración usada como se muestra en la tabla 1, y por lo tanto, se incluyen en la presente descripción no solo las CDR que están subrayadas sino también las CDR incluidas en los dominios V_H y V_L que usan otros sistemas de numeración. Los enlazadores están doble subrayados (aunque, como apreciarán los expertos en la técnica, los enlazadores pueden reemplazarse por otros enlazadores, algunos de los cuales se representan en la Figura 65 y la Figura 66), y las barras diagonales (/) indican los límites entre IL-15, IL-15Rα, enlazadores, regiones variables y regiones Fc/constantes.

La Figura 50 representa la inducción de la proliferación de A) células T $CD8^+$ y B) células T $CD4^+$ por fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 (y controles) como se indica mediante el porcentaje de células en proliferación (determinado en base a la dilución de CFSE). Los datos muestran que las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 son más potentes para inducir la proliferación de células T $CD4^+$ en comparación con la fusión de IL-15(D30N/E64Q/N65D)/Rα-Fc no dirigida (así como la fusión de control de IL-15/Rα-Fc dirigida a RSV).

La Figura 51 representa la inducción de células T $CD8^+$ positivas a LAG-3 mediante fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 (y controles) como se indica mediante el porcentaje de células en proliferación (determinado en base a la dilución de CFSE). Los datos muestran que XENP28532 fue más potente para inducir la proliferación de células T $CD8^+LAG\text{-}3^+$ en comparación con la fusión de IL-15(D30N/E64Q/N65D)/Rα-Fc no dirigida (así como la fusión de control de IL-15/Rα-Fc dirigida a RSV). Además, XENP28543 fue más potente para inducir la proliferación de células T $CD8^+LAG\text{-}3^+$ que la proliferación de células T $CD8^+$ en masa (EC50 276,8 frente a 71,94). En conjunto, esto apoya la idea de que las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 pueden ser

selectivas para las células T que expresan puntos de control tales como los que se encontrarían en el entorno tumoral.

La Figura 52 representa la activación de A) células T de memoria $CD4^+CD45RA^-$ y B) células T vírgenes $CD4^+CD45RA^+$ después de la incubación con fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 (y controles) como se indica mediante el porcentaje de células que expresan CD25.

La Figura 53 representa el porcentaje de A) células T $CD4^+CD45RA^-$ y B) células T $CD4^+CD45RA^+$ que expresan PD-1 después de la incubación con fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 (y controles).

La Figura 54 representa la secreción de IFNγ por PBMC preestimulado con A) 50 ng/mL, B) 100 ng/mL y C) 500 ng/mL de anti-CD3 unido a la placa (OKT3) e incubado con los artículos de prueba indicados. Los datos muestran que tanto XENP28532 como XENP28543 fueron capaces de estimular de forma potente la secreción de IFNγ. En particular, XENP28532 (brazo dirigido a PD-1 basado en el mAb A) parecía más activo que XENP28543 (brazo dirigido a PD-1 basado en el mAb C) en la inducción de la secreción de IFNγ.

La Figura 55 representa la inducción de la fosforilación de STAT5 sobre A) células T $CD8^+CD45RA^-CD25^+PD\text{-}1^+$ y B) células T $CD4^+CD45RA^-CD25^+PD\text{-}1^+$ por XENP28543, fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 con el brazo dirigido a PD-1 basado en el mAb C, después de la preincubación con XENP16432 basado en nivolumab, pembrolizumab o mAb anti-RSV XENP15074. Los datos indican que el bloqueo de PD-1 no interfiere con la actividad de XENP28543.

La Figura 56 representa el cambio en el peso corporal de ratones NSG injertados con huPBMC a lo largo del tiempo (como porcentaje del peso corporal inicial) después de la dosificación con los artículos de prueba indicados.

La Figura 57 representa el peso corporal de los ratones NSG injertados con huPBMC (como porcentaje del peso corporal inicial) en los Días A) 11, B) 14 y C) 18 después de la primera dosis con los artículos de prueba indicados. Los valores de p se determinaron mediante el uso de la prueba t no apareada. Los datos muestran que para el día 11, la combinación de la fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1con el bloqueo de PD-1

mejoró significativamente la GVHD sobre el tratamiento con la fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 sola.

La Figura 58 representa el número de células A) células $CD45^+$, B) células T $CD3^+$, C) células T $CD4^+$, D) células T $CD8^+$, E) células T γδ y F) células NK humanas en sangre de ratones NSG injertados con huPBMC el día 14 después de la primera dosis con los artículos de prueba indicados.

La Figura 59 representa la activación de A) células T $CD8^+$ y B) células T $CD4^+$ humanas (como se indica mediante CD25 MFI) en sangre de ratones NSG injertados con huPBMC el día 14 después de la primera dosis con los artículos de prueba indicados.

La Figura 60 representa el volumen del tumor (como se determinó por las mediciones del calibre) a lo largo del tiempo en ratones NSG injertados con pp65-MCF7 y huPBMC dosificados con fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1, solas o en combinación con el bloqueo de PD-1.

La Figura 61 representa el volumen del tumor (como se determinó por medidas del calibre) en los días 26, 28, 30, 33, 35 y 37 (después del injerto de PBMC y la primera dosis de los artículos de prueba) en ratones NSG injertados con pp65-MCF7 y huPBMC dosificados con fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1, solas o en combinación con el bloqueo de PD-1. Los valores de p se determinaron mediante la prueba t no apareada. Los datos muestran que el día 28, la combinación de XENP28543 con el bloqueo de PD-1 redujo significativamente el tamaño del tumor durante el tratamiento con el bloqueo de PD-1 solo.

La Figura 62 representa la activación de A) células T $CD8^+$ y B) células T $CD4^+$ humanas (como se indica mediante CD25 MFI) en sangre de ratones NSG injertados con pp65-MCF7 y huPBMC el día 7 después de la primera dosis con los artículos de prueba indicados. Los datos muestran que las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1, solas o en combinación con el bloqueo de PD-1, permitieron una activación temprana significativamente mejorada de las células T $CD8^+$. Las estadísticas se realizaron sobre datos transformados logarítmicamente mediante el uso de la prueba t no apareada.

La Figura 63 representa el número de A) células $CD45^+$, B) células T $CD3^+$, C) células T $CD4^+$, D) células T $CD8^+$ y E) células NK humanas en sangre de ratones NSG injertados con pp65-MCF7 y huPBMC el día 14 después de la primera dosis con los

artículos de prueba indicados. Los datos muestran que las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1, solas o en combinación con el bloqueo de PD-1, permitieron una expansión significativamente mejorada de numerosas poblaciones de linfocitos para el día 14 sobre el bloqueo de PD-1 solo. Las estadísticas se realizaron sobre datos transformados logarítmicamente mediante el uso de la prueba t no apareada.

La Figura 64 representa las secuencias para variantes diseñadas genéticamente por afinidades ilustrativas de mAb C anti-PD-1 en formato de IgG1 humana bivalente con sustituciones E233P/L234V/L235A/G236del/S267K en la cadena pesada. Las CDR están subrayadas y las barras diagonales indican los límites de los dominios variables. Como se indica en la presente descripción y se aplica a cada secuencia en la presente descripción que contiene CDR, la identificación exacta de las ubicaciones de las CDR puede ser ligeramente diferente en dependencia de la numeración usada como se muestra en la tabla 1, y por lo tanto, se incluyen en la presente descripción no solo las CDR que están subrayadas sino también las CDR incluidas en los dominios V_H y V_L que usan otros sistemas de numeración. Como apreciarán los expertos en la técnica, los dominios V_H y V_L pueden configurarse en el formato de Fab o scFv para usar en las proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 de la invención.

Las Figuras 65A-65I representan la constante de disociación aparente (K_{Dapp}), la tasa de asociación (k_a) y la tasa de disociación (k_d) de variantes de mAb C[PD-1]_H1L1 diseñadas genéticamente por afinidad (en formato IgG1 bivalente con variantes de ablación de E233P/L234V/L235A/G236_/S267K) como se determinó por Octet, así como la mejora del número de veces mayor que el mAb C[PD-1]_H1L1. Las sustituciones en las regiones pesadas variables o ligeras variables, donde se enumeran, se basan en la numeración de Xencor (con la posición de Kabat correspondiente enumerada en la siguiente columna). De las 304 variantes que tienen una mutación de un solo punto en la región pesada variable o la ligera variable, solo identificamos 11 variantes (incluidas mAb C[PD-1]_H1_L1.1 y mab_C[PD-1]_H1_L1.3) que tienen una afinidad más de 2 veces mejorada sobre el WT. Cabe señalar que para la columna de números de Kabat, algunas posiciones se enumeran mediante el uso de letras así como; por ejemplo, en la numeración de Kabat, hay un aminoácido en la posición 27d (N27d) pero un aminoácido diferente en la posición 27e (S27e); es decir, la inclusión de letras pequeñas denota una posición, no un aminoácido particular en esa posición.

La Figura 66 representa la constante de disociación aparente (K_{Dapp}), la tasa de asociación (k_a) y la tasa de disociación (k_d) de variantes de mAb C[PD-1]_H1L1 diseñadas genéticamente por afinidad que combinan la variante VH de sustitución única y la variante VL de sustitución única favorables (en el contexto de IL15/Rα-Fc dirigida a PD-1) como se determinó por Octet. Las sustituciones en las regiones pesadas variables o ligeras variables, donde se enumeran, se basan en la numeración de Xencor (con la posición de Kabat correspondiente enumerada en la siguiente columna). H1.19_L1.1 permite una mayor afinidad que H1.132_L1.1, a pesar de que H1.132_L1 proporciona una mayor afinidad que H1.19_L1.

La Figura 67 representa la constante de disociación aparente (K_{Dapp}), la tasa de asociación (k_a) y la tasa de disociación (k_d) de variantes de mAb C[PD-1]_H1L1 diseñadas genéticamente por afinidad que combinan múltiples sustituciones en la VH y/o VL (en el contexto de IL15/Rα-Fc dirigida a PD-1) como se determinó por Octet. Las sustituciones en las regiones pesadas variables o ligeras variables, donde se enumeran, se basan en la numeración de Xencor (con la posición de Kabat correspondiente enumerada en la siguiente columna). La variante VL de triple sustitución N31H/K36Y/S99T (L1.140; N27dH/K30Y/S93T en la numeración de Kabat) demuestra una mejora de 36 veces en la K_D sobre el tipo salvaje, y se combina bien con las variantes VH para ejercer una mejora de ~100 veces en K_D sobre el tipo salvaje.

Las Figuras 68A-68H representan secuencias de proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 ilustrativas del formato “scIL-15/Rα x Fab” que comprenden el brazo dirigido a PD-1 basado en el mAb C ABD optimizado por afinidad y diversas variantes de potencia de IL-15. Las CDR están subrayadas. Como se indica en la presente descripción y se aplica a cada secuencia en la presente descripción que contiene CDR, la identificación exacta de las ubicaciones de las CDR puede ser ligeramente diferente en dependencia de la numeración usada como se muestra en la tabla 1, y por lo tanto, se incluyen en la presente descripción no solo las CDR que están subrayadas sino también las CDR incluidas en los dominios V_H y V_L que usan otros sistemas de numeración. Los enlazadores están doble subrayados (aunque, como apreciarán los expertos en la técnica, los enlazadores pueden reemplazarse por otros enlazadores, algunos de los cuales se representan en las Figuras 8 y 9), y las barras diagonales (/) indican los límites entre IL-15, IL-15Rα, enlazadores, regiones variables y regiones Fc/constantes. Como resultará evidente para los expertos en la técnica, cada

una de las proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 descritas también puede excluir o incluir Xtend Fc (M428L/N434S).

Las Figuras 69A-69B representan secuencias de proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 ilustrativas del formato “scIL-15/Rα x Fab” que comprenden el brazo dirigido a PD-1 basado en el mAb C ABD optimizado por afinidad y diversas variantes de potencia de IL-15, que comprenden adicionalmente Xtend Fc (M428L/N434S). Las CDR están subrayadas. Como se indica en la presente descripción y se aplica a cada secuencia en la presente descripción que contiene CDR, la identificación exacta de las ubicaciones de las CDR puede ser ligeramente diferente en dependencia de la numeración usada como se muestra en la tabla 1, y por lo tanto, se incluyen en la presente descripción no solo las CDR que están subrayadas sino también las CDR incluidas en los dominios V_H y V_L que usan otros sistemas de numeración. Los enlazadores están doble subrayados (aunque, como apreciarán los expertos en la técnica, los enlazadores pueden reemplazarse por otros enlazadores, algunos de los cuales se representan en las Figuras 8 y 9), y las barras diagonales (/) indican los límites entre IL-15, IL-15Rα, enlazadores, regiones variables y regiones Fc/constantes.

La Figura 70 representa la inducción de la proliferación de A) células T $CD8^+$ y B) células T $CD4^+$ por fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 que tienen afinidad a PD-1 variable y variantes de potencia de IL-15 (y controles) como se indica mediante el porcentaje de células en proliferación (determinado en base a la dilución de CFSE). Los datos muestran que XENP30046 (que tiene un brazo dirigido a PD-1 con afinidad mejorada) induce la proliferación tanto de células T $CD8^+$ como $CD4^+$ de manera más potente que XENP28543 (aumento de dos veces). Además, los datos muestran que la variante de IL-15(D30N/N65D) no afecta drásticamente la actividad de las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1.

La Figura 71 representa la activación de A) células T $CD8^+CD45RA^-$ y B) células T $CD8^+CD45RA^+$ después de la incubación con fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 con afinidad a PD-1 variable y variantes de potencia de IL-15 (y controles) como se indica mediante el porcentaje de células que expresan CD25.

La Figura 72 representa la activación de A) células T $CD4^+CD45RA^-$ y B) células T $CD4^+CD45RA^+$ después de la incubación con fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a

[NC]PD-1 con afinidad a PD-1 variable y variantes de potencia de IL-15 (y controles) como se indica mediante el porcentaje de células que expresan CD25.

La Figura 73 representa el porcentaje de A) células T $CD4^+CD45RA^-$ y B) células T $CD4^+CD45RA^+$ que expresan PD-1 después de la incubación con fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 con afinidad a PD-1 variable y variantes de potencia de IL-15 (y controles). Los datos muestran que las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 inducen la regulación negativa de PD-1 en las células $CD4^+$, y que la regulación negativa se correlaciona con la afinidad a PD-1.

La Figura 74 representa el cambio en el peso corporal (como porcentaje del peso corporal inicial) a lo largo del tiempo en ratones NSG injertados con huPBMC tratados con fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 con afinidad a PD-1 variable y variantes de potencia de IL-15 (y controles). El 70 % se usó para ratones muertos.

La Figura 75 representa el peso corporal en los días A) 11, B) 14, C) 18 y D) 21 de ratones NSG injertados con huPBMC tratados con fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 con afinidad a PD-1 variable y variantes de potencia de IL-15 (y controles). El 70 % se usó para ratones muertos. El valor de p se determinó mediante el uso de la prueba t no apareada. Los datos muestran que el tratamiento con XENP30046 solo (que tiene un brazo dirigido a PD-1 con afinidad mejorada) dio como resultado una pérdida de peso corporal significativa medida en los días 11 y 18 en comparación con el tratamiento con PBS, mientras que el tratamiento con XENP28543 solo no produjo una pérdida de peso significativa (en comparación con el tratamiento con PBS).

Las Figuras 76A-76C representan la concentración sérica de A) IFNγ, B) IL-10 y C) IL-2Rα en ratones NSG injertados con huPBMC en los días 7, 11 y 14 después de la dosificación con fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 con afinidad a PD-1 variable y variantes de potencia de IL-15 (y controles).

La Figura 77 representa la activación de A) células T $CD4^+$ y B) células T $CD8^+$ (como se indica mediante CD25 MFI) en el día 7 en sangre de ratones NSG injertados con huPBMC dosificados con fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 con afinidad a PD-1 variable y variantes de potencia de IL-15 (y controles) (las estadísticas se realizaron sobre datos transformados logarítmicamente mediante el uso de la prueba t no apareada).

La Figura 78 representa recuentos de A) células $CD45^+$, B) células T $CD3^+$, C) células T $CD8^+$, D) células T $CD4^+$ y E) células NK en el día 11 en sangre de ratones NSG injertados con huPBMC dosificados con fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 con afinidad a PD-1 variable y variantes de potencia de IL-15 (y controles) (las estadísticas se realizaron sobre datos transformados logarítmicamente mediante el uso de la prueba t no apareada).

La Figura 79 representa recuentos de A) células $CD45^+$, B) células T $CD3^+$, C) células T $CD8^+$, D) células T $CD4^+$ y E) células NK en el día 14 en sangre de ratones NSG injertados con huPBMC dosificados con fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 con afinidad a PD-1 variable y variantes de potencia de IL-15 (y controles).

La Figura 80 representa la inducción de la proliferación de A) células T $CD8^+$ y B) células T $CD4^+$ por fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 que tienen afinidad a PD-1 variable y variantes de potencia de IL-15 (y controles) como se indica mediante el porcentaje de células en proliferación (determinado en base a la dilución de CFSE). Los datos muestran que XENP30272 (que tiene una K_D de 3,1 nM para PD-1) es más potente para inducir la proliferación y activación de diversas poblaciones celulares T que XENP30046 (que tiene una K_D de 5,4 nM para PD-1). En particular, mientras que XENP30429 (fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 que tienen la variante de IL-15(D30N/E64Q/N65D)) fue solo 1,8 a 2,5 menos activo en las células T $CD8^+$ y $CD4^+$ en comparación con XENP30046 (fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 que tienen la variante de IL-15(N4D/N65D)), XENP30432 (sustituto IL-15/Rα-Fc dirigido a RSV que tiene la variante de IL-15(D30N/E64Q/N65D)) fue 12 veces menos activo en células T $CD8^+$ y 530 veces menos activo en células T $CD4^+$ en comparación con XENP30046 (en base a la actividad proliferativa). Esto sugiere que las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 que tienen la variante de IL-15(D30N/E64Q/N65D) deberían retener la actividad en el entorno del tumor, mientras permanecen sustancialmente inactivas fuera del entorno del tumor.

La Figura 81 representa el porcentaje de A) células T $CD4^+CD45RA^-$ y B) células T $CD4^+CD45RA^+$ después de la incubación con fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 con afinidad a PD-1 variable y variantes de potencia de IL-15 (y controles) como se indica mediante CD25 MFI.

La Figura 82 representa la activación de A) células T $CD8^+CD45RA^-$ y B) células T $CD8^+CD45RA^+$ después de la incubación con fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 con afinidad a PD-1 variable y variantes de potencia de IL-15 (y controles) como se indica mediante CD25 MFI.

La Figura 83 representa la expresión de PD-1 en A) células T $CD4^+$, B) células $CD4^+CD45RA^-$ y C) células T $CD4^+CD45RA^+$ después de la incubación con fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 con afinidad a PD-1 variable y variantes de potencia de IL-15 (y controles) como se indica mediante PD-1 MFI.

La Figura 84 representa la expresión de PD-1 en A) células T $CD8^+$, B) células T $CD8^+CD45RA^-$ y C) células T $CD8^+CD45RA^+$ después de la incubación con fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 con afinidad a PD-1 variable y variantes de potencia de IL-15 (y controles) como se indica mediante PD-1 MFI.

La Figura 85 representa la expansión de A) células CD45, B) células T $CD3^+$, C) células T $CD4^+$ y D) células T $CD8^+$ en ratones NSG (como se indica mediante los recuentos de células) el día 10 después de la primera dosis con los artículos de prueba indicados. Los datos muestran que la IL-15 de mayor potencia da como resultado una mayor expansión de diversas poblaciones de linfocitos.

La Figura 86 representa la activación de A) células T $CD4^+$ y B) células T $CD8^+$ en ratones NSG (como se indica mediante tinción de CD25) el día 10 después de la primera dosis con los artículos de prueba indicados. Los datos muestran que la IL-15 de mayor potencia da como resultado una mayor expansión de diversas poblaciones de linfocitos.

Las Figuras 87A-87C representan la inducción de A) la proliferación de células T $CD4^+$, B) las células T $CD8^+$ y C) la proliferación de células NK mediante fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 y fusiones de control de IL-15/Rα-Fc dirigidas a RSV que tienen Xtend Fc como se indica mediante el porcentaje de células en proliferación (determinado en base a la dilución de CFSE). En particular, los datos muestran que la EC50 para XENP30046 es comparable a la EC50 para XENP30290 (el Xtend análogo a XENP30046).

La Figura 88 representa la activación de A) células T $CD4^+$ y B) células T $CD8^+$ mediante fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 y fusiones de control de IL-15/Rα-Fc dirigidas a RSV que tienen Xtend Fc como se indica mediante CD25 MFI.

La Figura 89 representa la regulación de PD-1 en A) células T $CD4^+$ y B) células T $CD8^+$ mediante fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 y fusiones de control de IL-15/Rα-Fc dirigidas a RSV que tienen Xtend Fc como se indica mediante PD-1 MFI. De acuerdo con el ejemplo 9B, los artículos de prueba regularon negativamente la PD-1 en las células T.

La Figura 90 representa el volumen del tumor (como se indica mediante las mediciones del calibre) a lo largo del tiempo en ratones NSG injertados con pp65-MCF7 y huPBMC dosificados con fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1, solas o en combinación con el bloqueo de PD-1.

Las Figuras 91A-91H representan el volumen del tumor (como se indica mediante mediciones del calibre) los días 11, 14, 17, 19, 21, 24, 26 y 28 (después del injerto de PBMC y la primera dosis de los artículos de prueba) en ratones NSG injertados con pp65-MCF7 y huPBMC dosificados con fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1, solas o en combinación con el bloqueo de PD-1. Las estadísticas se realizaron sobre los datos corregidos de la línea de base mediante el uso de la prueba de Mann-Whitney. * indica que el tratamiento mejoró significativamente ($p < 0,05$) la expansión en comparación con el control de PBS. # indica que el tratamiento mejoró significativamente ($p < 0,05$) la expansión en comparación con el tratamiento con XENP31123. † indica que el tratamiento mejoró significativamente ($p < 0,05$) la expansión en comparación con el bloqueo de PD-1 (XENP16432) solo. Los datos muestran que para el día 28, todas las combinaciones de XENP30290 (0,1, 0,3 o 1 mg/kg) o XENP30516 (0,3, 1 o 3 mg/kg) con bloqueo de PD-1 redujeron significativamente el tamaño del tumor en comparación con el tratamiento con bloqueo de PD-1 solo.

Las Figuras 92A-92F representan el número de A) células $CD45^+$, B) células T $CD3^+$, C) células NK, D) células T $CD4^+$ y E) células T $CD8^+$ humanas, así como F) proporción de células T CD8 a CD4 en sangre de ratones NSG injertados con pp65-MCF7 y huPBMC el día 14 después de la primera dosis con los artículos de prueba indicados. Las estadísticas para la expansión de células $CD45^+$ se realizaron en datos transformados logarítmicamente mediante el uso de la prueba t no apareada. † indica que el tratamiento mejoró significativamente la expansión en comparación con el bloqueo de PD-1 (XENP16432) solo.

Las Figuras 93A-93F representan el número de A) células $CD45^+$, B) células T $CD3^+$, C) células NK, D) células T $CD4^+$ y E) células T $CD8^+$ humanas, así como F) proporción de células T CD8 a CD4 en sangre de ratones NSG injertados con pp65-MCF7 y huPBMC el día 21 después de la primera dosis con los artículos de prueba indicados. † indica que el tratamiento mejoró significativamente la expansión en comparación con el bloqueo de PD-1 (XENP16432) solo.

La Figura 94 representa el nivel de expresión de PD-1 (como se indica mediante MFI) en diversas poblaciones de linfocitos en ratones Hu-NSG $CD34^+$ (antes del tratamiento con cualquier artículo de prueba). Los datos muestran que los ratones tienen un perfil de expresión de PD-1 similar al de humanos, es decir, mayor expresión en poblaciones de memoria efectora.

La Figura 95 representa las veces de aumento de diversas poblaciones de linfocitos en ratones Hu-NSG $CD34^+$ el día 7 después del tratamiento con 0,3 mg/kg de XENP30046 (IL-15/Rα-Fc dirigida a [NC]PD-1 que comprende mAb C_H1_L1.1 la variante de IL-15(N4D/N65D)). XENP30046 muestra una expansión de más de 100 veces en las poblaciones de memoria efectora.

La Figura 96 representa las veces de aumento de diversas poblaciones de linfocitos en ratones Hu-NSG $CD34^+$ el día 7 después del tratamiento con 0,3 mg/kg de XENP30429 (IL-15/Rα-Fc dirigida a [NC]PD-1 que comprende mAb C_H1_L1.1 la variante de IL-15(D30N/E64Q/N65D)).

La Figura 97 representa las veces de aumento de diversas poblaciones de linfocitos en ratones Hu-NSG $CD34^+$ el día 7 después del tratamiento con 0,3 mg/kg de XENP26007 (IL-15/Rα-Fc dirigidas a RSV de control que comprende la variante de IL-15(N4D/N65D)). XENP26007 muestra una expansión muy baja de las diversas poblaciones de linfocitos, lo que indica que las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 tendrían una expansión de linfocitos periféricos mínima.

La Figura 98 representa las veces de aumento de diversas poblaciones de linfocitos en ratones Hu-NSG $CD34^+$ el día 7 después del tratamiento con 0,3 mg/kg de XENP30432 (IL-15/Rα-Fc dirigida a RSV de control que comprende la variante de IL-15(D30N/E64Q/N65D)). XENP30432 muestra una expansión muy baja de las diversas poblaciones de linfocitos, lo que indica que las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 tendrían una expansión de linfocitos periféricos mínima.

La Figura 99 representa las veces de cambio en A) células CD45, B) células $CD3^+$, C) células $CD4^+$, D) células $CD8^+$, E) células γδ y F) células NK en ratones Hu-NSG $CD34^+$ a lo largo del tiempo después del tratamiento con 0,3 mg/kg de XENP30046, XENP30429, XENP26007 o XENP30432.

La Figura 100 representa las veces de cambio en A) células CD4 vírgenes, B) células CD4 de memoria central, C) células CD4 efectoras terminales y D) células CD4 de memoria efectora en ratones Hu-NSG $CD34^+$ a lo largo del tiempo después del tratamiento con 0,3 mg/kg de XENP30046, XENP30429, XENP26007 o XENP30432. Los datos muestran que XENP30046 y XENP30429 son selectivos para poblaciones de PD-1^+ tales como las células CD4 de memoria efectora. En particular, la expansión de XENP30429 de células CD4 vírgenes de fue mínima, lo que indica que la reducción de la potencia del brazo de IL-15 mejora la selectividad.

La Figura 101 representa las veces de cambio en A) células CD8 vírgenes, B) células CD8 de memoria central, C) células CD8 efectoras terminales y D) células CD8 de memoria efectora en ratones Hu-NSG $CD34^+$ a lo largo del tiempo después del tratamiento con 0,3 mg/kg de XENP30046, XENP30429, XENP26007 o XENP30432. Los datos muestran que XENP30046 y XENP30429 son selectivos para poblaciones de PD-1^+ tales como las células CD8 de memoria efectora. En particular, la expansión de XENP30429 de células CD8 vírgenes de fue mínima, lo que indica que la reducción de la potencia del brazo de IL-15 mejora la selectividad.

La Figura 102A-102B representan la correlación entre la expansión de linfocitos y la expresión de PD-1 basal en ratones Hu-NSG $CD34^+$ el día 7 después del tratamiento con A) 0,3 mg/kg de XENP30046 o B) 0,3 mg/kg de XENP30429.

La Figura 103 representa la expansión de A) células T $CD8^+$ y B) células NK en monos cinomolgos dosificados con 0,3X de XENP22853, 1X de XENP25937 o 0,3X de XENP24306. Los datos muestran que la fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a PD-1 disminuye la expansión de células NK mientras se mantiene la expansión de células T $CD8^+$.

La Figura 104 representa la expansión de A) células T $CD8^+$ vírgenes y B) células T $CD8^+$ de memoria efectora en monos cinomolgos dosificados con 0,3X de XENP22853, 1X de XENP25937 o 0,3X de XENP24306. Los datos muestran que la fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a PD-1 expande selectivamente las células T $CD8^+$de memoria efectora.

Las Figuras 105A-105E representan la expansión de A) células T $CD8^+PD1^+$, B) células madre CD8 de memoria, C) CD8 vírgenes, D) células T γδ y E) células NK $CD56^+$ en monos cinomolgos después de la administración con XENP30290 (mAb C_H1_L1.1 x IL-15[N4D/N65D]) o XENP30362 (αRSV x IL-15[N4D/N65D]). En conjunto, los datos muestran que XENP30290 (que tiene una alta afinidad por PD1 y superior potencia de IL-15) permitió farmacodinámicas periféricas sostenidas durante 2-3 semanas con modesta expansión celular $PD1^-$. En particular, las células T γδ son la población celular de mayor expansión; las células T $CD4^+$ y $CD8^+$ vírgenes son la población celular de menor expansión; y las células madre $CD8^+$ de memoria son la población relevante de mayor expansión.

Las Figuras 106A-106E representan la expansión de A) células T $CD8^+PD1^+$, B) células madre CD8 de memoria, C) CD8 vírgenes, D) células T γδ y E) células NK $CD56^+$ en monos cinomolgos después de la administración con XENP30516 (mAb C_H1_L1.1 x IL-15 [D30N/E64Q/N65D]) o XENP30518 (αRSV x IL-15 [D30N/E64Q/N65D]). En conjunto, los datos muestran que XENP30516 (que tiene una alta afinidad por PD1 y baja potencia de IL-15) permitió farmacodinámicas periféricas sostenidas sin significativa expansión celular de $PD1^-$. En particular, las células T γδ son la población celular de mayor expansión; las células T $CD4^+$ y $CD8^+$ vírgenes son la población celular de menor expansión; y las células madre $CD8^+$ de memoria son la población relevante de mayor expansión.

La Figura 107 representa el cambio en el nivel de concentración sérica a lo largo del tiempo en monos cinomolgos dosificados con XENP30290, XENP30291, XENP29439 o XENP30516. Los datos muestran que XENP30290, que tiene la mayor afinidad por PD-1 y una mayor potencia de IL-15, dio como resultado un aclaramiento más rápido que XENP30291 y XENP29439 que tienen menor afinidad por PD-1. Sin embargo, XENP30516, que tiene la mayor afinidad por PD-1 pero una menor potencia de IL-15, dio como resultado un aclaramiento más lento que XENP30290.

La Figura 108 representa el cambio en el nivel de concentración sérica a lo largo del tiempo en monos cinomolgos dosificados con XENP30290, XENP30292 o XENP30516. Los datos muestran que XENP30516, que tiene la menor potencia de IL-15, dio como resultado un aclaramiento más lento que XENP30290.

La Figura 109 representa el cambio en el nivel de concentración sérica a lo largo del tiempo en monos cinomolgos dosificados con XENP30291 o XENP30293.

La Figura 110 representa el cambio en el nivel de concentración sérica a lo largo del tiempo en monos cinomolgos dosificados con XENP29439 o XENP30302.

La Figura 111 representa el cambio en el nivel de concentración sérica a lo largo del tiempo en monos cinomolgos dosificados con XENP30362 o XENP30518. Los datos muestran que una mayor potencia de IL-15 se correlaciona con un aclaramiento más rápido.

Las Figuras 112A-112C representan el cambio en la expresión de PD-1 en diversas poblaciones de linfocitos a lo largo del tiempo en monos cinomolgos dosificados con A) XENP30290, B) XENP30516 o C) XENP30362. Los datos muestran que las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 aumentan la expresión de PD-1, mientras que la fusión de control de IL-15/Rα-Fc dirigido a RSV no lo hace.

La Figura 113 representa la correlación entre el pico de expansión de todos los subconjuntos de células T de memoria y el pico de expresión de PD-1 inducido por XENP30290 o XENP30516.

Las Figuras 114A-114E representan la expansión de A) células T $CD8^+PD1^+$, B) células madre $CD8^+$ de memoria, C) CD8 vírgenes ($PD1^{bajo}$), D) células γδ y E) células NK en monos cinomolgos dosificados con una dosis baja 1X de XENP30290 (PD1 x IL15[N4D/N65D]). Los datos muestran que XENP30290 indujo la expansión celular de $PD1^+$ a una dosis baja 1X.

Las Figuras 115A-115E representan la expansión de A) células T $CD8^+PD1^+$, B) células madre $CD8^+$ de memoria, C) CD8 vírgenes ($PD1^{bajo}$), D) células γδ y E) células NK en monos cinomolgos dosificados con una dosis alta 10X de XENP30290 (PD1 x IL15[N4D/N65D]) y la contraparte sustituta dirigida a RSV XENP30362. Los datos muestran que XENP30290 indujo una buena expansión celular de $PD1^+$ a una dosis alta 10X, pero tiene una actividad moderada sobre las células $PD1^-$ como se muestra por la actividad del control dirigido a RSV XENP30362.

Las Figuras 116A-116E representan la expansión de A) células T $CD8^+PD1^+$, B) células madre $CD8^+$ de memoria, C) CD8 vírgenes ($PD1^{bajo}$), D) células γδ y E) células NK en monos cinomolgos dosificados con una dosis alta 10X de XENP30516 (PD1 x IL15

[D30N/E64Q/N65D]). Los datos muestran que XENP30516 indujo una buena expansión celular de $PD1^+$ a una dosis alta 10X.

Las Figuras 117A-117E representan la expansión de A) células T $CD8^+PD1^+$, B) células madre $CD8^+$ de memoria, C) CD8 vírgenes ($PD1^{bajo}$), D) células γδ y E) células NK en monos cinomolgos dosificados con una dosis muy alta 30X de XENP30516 (PD1 x IL15[D30N/E64Q/N65D]) y la contraparte sustituta dirigida a RSV XENP30518. Los datos muestran que XENP30516 indujo una mayor expansión de $PD1^+$ a una dosis muy alta 30X, mientras se mantuvo una excelente selectividad.

La Figura 118 resume la expansión de las células T $CD8^+PD1^+$ en monos cinomolgos dosificados con varias concentraciones de diversas fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 o dirigidas a RSV que comprenden IL-15[N4D/N65D] o IL-15[D30N/E64Q/N65D].

Las Figuras 119A-119E representan la correlación entre la ración de selectividad y pico de expansión de A) células T $CD8^+PD1^+$, B) células madre $CD8^+$ de memoria, C) CD8 vírgenes ($PD1^{bajo}$), D) células γδ y E) células NK en monos cinomolgos dosificados con varias concentraciones de diversas fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 o dirigidas a RSV que comprenden IL-15[N4D/N65D] o IL-15[D30N/E64Q/N65D]. En conjunto, los datos muestran que el aumento de la dosis da como resultado una mayor selectividad.

La Figura 120 representa secuencias de XENP20818 (WT IL-15), XENP22821 (IL-15[N65D]) y XENP24045 (IL-15[D30N/E64Q/N65D]) que son proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc ilustrativas del formato “IL-15/Rα-heteroFc”. La IL-15 e IL-15Rα(sushi) están subrayadas, los enlazadores están doble subrayados (aunque, como apreciarán los expertos en la técnica, los enlazadores pueden reemplazarse por otros enlazadores, algunos de los cuales se representan en la Figura 7), y las barras diagonales (/) indican los límites entre IL-15, IL-15Rα, enlazadores y regiones Fc.

La Figura 121 representa la proliferación de Treg expandidas con rapamicina después del tratamiento con fusiones de IL-15/Rα-Fc no dirigidas XENP20818 y XENP24045, así como varias fusiones de control de IL-15/Rα-Fc dirigidas a RSV o dirigidas a PD-1. Los datos muestran que las fusiones de IL-15/Rα-Fc (dirigidas y no dirigidas) inducen la proliferación de las Treg expandidas con rapamicina (medida por dilución de Tag-it Violet). En particular, las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 fueron mucho menos potentes para inducir la proliferación de Treg en comparación con las fusiones de IL-15/Rα-Fc no dirigidas.

Las Figuras 122A-112B representan la proliferación de A) células T CD8 de memoria efectora y B) células T CD4 de memoria efectora (como se determinó por dilución de CFSE) después de la incubación de 1 x 10^5 PBMC marcadas con CFSE con 5 µg/mL de los artículos de prueba indicados, el número creciente de Treg expandidas con rapamicina. Los datos muestran que las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 cambiaron (redujeron) la potencia de la supresión inducida por Treg de la proliferación de células T CD8 y CD4 de memoria efectora. En particular, el cambio por las fusiones de control de IL-15/Rα-Fc dirigidas a RSV fue menor que la reducción en la potencia inducida por las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1.

Las Figuras 123A-123B representan la relación de A) Treg a las células T CD8 de memoria efectora y B) Treg a las células T CD4 de memoria efectora después de la incubación de 1 x 10^5 PBMC marcadas con CFSE con 5 µg/mL de los artículos de prueba indicados y el aumento del número de Treg expandidas con rapamicina. Los datos muestran que, en comparación con ningún artículo de prueba, las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 aumentaron la relación Treg/T_{EM} y, sin embargo, la proliferación de células T_{EM} se potencia por las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1. Esto indica que aunque las Treg se expanden, las Treg expandidas demuestran una capacidad de supresión disminuida.

Las Figuras 124A-124B representan el porcentaje de proliferación de A) células T $CD8^+$ y B) células T $CD4^+$ (como se determinó por dilución de CFSE) después de la incubación de PBMC estimuladas con CD3 con Treg expandidas con rapamicina precultivados durante 6 días con medio de Treg completo (RPMI con 10 % de SFB, 0,5 µg/mL de anti-CD28, 100 U/mL de IL-2, 100 ng/mL de rapamicina); medio de Treg completo sin rapamicina; o con 100 ng/mL de IL-15 (en RPMI con 10 % de SFB, 0,5 µg/mL de anti-CD28; sin IL-2; sin rapamicina). Los datos muestran que las Treg pretratadas con IL-15 muestran una capacidad supresora deteriorada.

Las Figuras 125A-125B representan la expresión de CD25 y FOXP3 en células T $CD4^+$ en PBMC tratadas A) sin o B) con 5 µg/mL de fusión de IL-15/Rα-Fc XENP22821 durante 14 días. Los datos muestran que el tratamiento con XENP22821 redujo la expresión de FOXP3 en la población celular T $CD4^+$.

Las Figuras 126A-126B representan la expresión de CD45RA y FOXP3 en células T $CD4^+$ en PBMC tratadas A) sin o B) con 5 µg/mL de fusión de IL-15/Rα-Fc XENP22821

durante 14 días. Los datos muestran que el tratamiento con XENP22821 cambia las poblaciones de $CD4^{+}CD45RA^{-}$ de $FoxP3^{alto}$ a $FoxP3^{bajo}$, lo que indica que el tratamiento con fusiones de IL-15/Rα-Fc en realidad cambiaron la población de eTreg (disminución de la población de 5,24 % a 2,72 %) a células T CD4 efectoras activadas (población aumentada de 18,2 % a 28,6 %).

Las Figuras 127A-127B representan la expresión de CD25 y CCR4 en células T $CD4^{+}$ en PBMC tratadas A) sin o B) con 5 µg/mL de fusión de IL-15/Rα-Fc XENP22821 durante 14 días. Los datos muestran que el tratamiento con XENP22821 redujo la expresión de CCR4 en la población celular T $CD4^{+}$.

Las Figuras 128A-128B representan la proliferación de A) células T CD8 y B) células T CD4 (como se determinó mediante dilución de CFSE) después de la incubación de PBMC marcadas con CFSE en 100 ng/mL de anti-CD3 (OKT3) unido a la placa con 10 µg/mL de fusión de IL-15/Rα-Fc XENP24045 y concentración indicada de TGFß1. Los datos muestran que TGFß suprime de forma dependiente de la dosis la proliferación de células T; sin embargo, en particular, la fusión de IL-15/Rα-Fc previene la supresión de TGFβ de la proliferación de células T en todas las dosis probadas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

I. Nomenclatura

Las proteínas de fusión heterodiméricas de la invención se enumeran en varios formatos diferentes. A cada polipéptido se le da un único número “XENP”, aunque como se apreciará en la técnica, una secuencia más larga puede contener una más corta. Por ejemplo, la cadena pesada de un monómero que comprende el Fab para anti-PD-1 (véase la Figura 28C, por ejemplo) tendrá un primer número XENP, mientras que los dominios VH y VL pueden tener un número diferente XENP. Algunas moléculas tienen tres polipéptidos, por lo que el número XENP, con los componentes, se usa como nombre. Por lo tanto, la molécula XENP29484, que está en “scIL-15/Rα X Fab” comprende tres secuencias, generalmente denominadas “XENP29484-cadena 1”, XENP29484 cadena 2” y “XENP29484 cadena 3” o equivalentes, aunque un experto en la técnica sería capaz de identificarlos fácilmente a través del alineamiento de secuencias. Estos números XENP están en el listado de secuencias, así como los identificadores, y se usan en las figuras. Además, una molécula, que comprende los tres

componentes, da lugar a múltiples identificadores de secuencia. Por ejemplo, el listado del monómero Fab tiene la secuencia de longitud completa, la secuencia pesada variable y las tres CDR de la secuencia pesada variable; la cadena ligera tiene una secuencia de longitud completa, una secuencia ligera variable y las tres CDR de la secuencia ligera variable; y el dominio scFv-Fc tiene una secuencia de longitud completa, una secuencia de scFv, una secuencia ligera variable, 3 CDR ligeras, un enlazador scFv, una secuencia pesada variable y 3 CDR pesadas, nótese que todas las moléculas en la presente descripción con un dominio scFv usan un solo enlazador scFv cargado (+H), aunque pueden usarse otros. Además, la nomenclatura de denominación de dominios variables particulares usa un tipo de formato “Hx.xx_Ly.yy”, con los números al ser identificadores únicos de secuencias de cadenas de variables particulares. Así, el dominio variable del lado Fab de XENP30486 (que une PD-1) es “H1.132”, lo que indica que se usó el dominio pesado variable H1.132, y en XENP30486, se combinó con el dominio ligero L1.135. Por tanto, la designación “mAbC[PD-1]_ H1.132_L1.135”, indica que el dominio pesado variable H1.132 se combinó con el dominio ligero L1.135. En el caso donde estas secuencias se combinan en un scFv, esta designación muestra que el scFv está en orientación VH-enlazador-VL, del N- al C-terminal. Esta molécula con las secuencias idénticas de los dominios variables pesado y ligero pero en orden inverso se denominaría “mAbC[PD-1]_ L1.135_H1.132”. De manera similar, diferentes constructos pueden “mezclar y combinar” las cadenas pesadas y ligeras como será evidente a partir del listado de secuencias y las figuras.

II. **Definiciones**

Con el fin que la solicitud se entienda de forma más completa, a continuación se exponen varias definiciones. Estas definiciones pretenden abarcar los equivalentes gramaticales.

En la presente descripción, “ablación” significa una disminución o eliminación de la actividad. De esta manera, por ejemplo, “ablación de la unión a FcγR” significa que la variante de aminoácido de la región Fc tiene menos del 50 % de unión inicial en comparación con una región Fc que no contiene la variante específica, al ser preferible con una pérdida de actividad de más de 70-80-90-95-98 %, y en general, con la actividad por debajo del nivel de unión detectable en un ensayo Biacore. De uso particular en la ablación de la unión a FcyR son los que se muestran en la Figura 6. Sin embargo, a

menos que se indique lo contrario, los monómeros Fc de la invención mantienen la unión al receptor FcRn.

Como se usa en la presente descripción, "ADCC" o "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" significa la reacción mediada por células en donde las células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y, posteriormente, causan la lisis de la célula diana. La ADCC se correlaciona con la unión a FcγRIIIa; el aumento de la unión a FcγRIIIa conduce a un aumento en la actividad de ADCC. Como se analiza en la presente descripción, muchas modalidades de la invención remueven completamente la actividad de ADCC.

Como se usa en la presente descripción, "ADCP" o fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpo significa la reacción mediada por células en donde células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen el anticuerpo unido a una célula diana y, subsecuentemente, causan la fagocitosis de la célula diana.

Por “dominio de unión al antígeno” o “ABD” en la presente descripción se entiende un conjunto de seis **R**egiones **D**eterminantes de **C**omplementariedad (CDR) que, cuando está presente como parte de una secuencia polipeptídica, se une específicamente a un antígeno diana como se analiza en la presente descripción. Por tanto, un “dominio de unión al antígeno PD-1” se une a un antígeno PD-1 humana como se indica en la presente descripción (y en muchos casos también se unirá a PD-1 de mono cinomolgo). Como se conoce en la técnica, estas CDR están generalmente presentes como un primer conjunto de CDR pesadas variables (vhCDR o V_HCDR) y un segundo conjunto de CDR ligeras variables (vlCDR o V_LCDR), que comprende cada una tres CDR: vhCDR1, vhCDR2, vhCDR3 para la cadena pesada y vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3 para la ligera. Las CDR están presentes en los dominios pesado variable y ligero variable, respectivamente, y juntos forman una región Fv. Por lo tanto, en algunos casos, las seis CDR del dominio de unión al antígeno son contribuidas por una cadena pesada variable y ligera variable. En un formato de “Fab”, el conjunto de 6 CDR es aportado por dos secuencias polipeptídicas diferentes, el dominio pesado variable (vh o V_H; que contiene la vhCDR1, vhCDR2 y VHCDR3) y el dominio ligero variable (vl o V_L; que contiene la vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3), con el C-terminal del dominio vh unido al N-terminal del dominio CH1 de la cadena pesada y el C-terminal del dominio vl unido al N-terminal del dominio ligero constante (y, por tanto, que forma la cadena ligera). En un formato scFv, los dominios VH y VL se unen covalentemente, generalmente a través del uso de un

enlazador como se indica en la presente descripción, en una sola secuencia polipeptídica, que puede ser (a partir del N-terminal) vh-enlazador-vl o vl-enlazador-vh.

La región hipervariable abarca generalmente residuos de aminoácidos de aproximadamente de residuos de aminoácidos 24-34 (LCDR1; “L” denota la cadena ligera), 50-56 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3) en la región variable de la cadena ligera y aproximadamente de 31-35B (HCDR1; “H” denota la cadena pesada), 50-65 (HCDR2), y 95-102 (HCDR3) en la región variable de la cadena pesada; Kabat y otros, SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5ta Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) y/o aquellos residuos que forman un lazo hipervariable (por ejemplo, los residuos 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) y 91-96 (LCDR3) en la región variable de la cadena ligera y 26-32 (HCDR1), 53-55 (HCDR2) y 96-101 (HCDR3) en la región variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917. Las CDR específicas de la invención se describen a continuación.

Como apreciarán los expertos en la técnica, la numeración y ubicación exactas de las CDR pueden ser diferentes entre los diferentes sistemas de numeración. Sin embargo, debe entenderse que la divulgación de una secuencia pesada variable y/o ligera variable incluye la divulgación de las CDR asociadas (inherentes). En consecuencia, la divulgación de cada región pesada variable es una divulgación de las vhCDR (por ejemplo, vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3) y la divulgación de cada región ligera variable es una divulgación de las vlCDR (por ejemplo, vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3).

Una comparación útil de la numeración de CDR es como a continuación, véase, Lafranc y otros, Dev. Comp. Immunol. 27(1):55-77 (2003):

Tabla 1

	Kabat+ Chothia	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contacto	Xencor
vhCDR1	26-35	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35	27-35
vhCDR2	50-65	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58	54-61
vhCDR3	95-102	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101	103-116
vlCDR1	24-34	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36	27-38

A lo largo de la presente especificación, el sistema de numeración de Kabat se usa generalmente cuando se refiere a un residuo en el dominio variable (aproximadamente, los residuos 1-107 de la región variable de la cadena ligera y los residuos 1-113 de la región variable de la cadena pesada) y el sistema de numeración de EU para las regiones Fc (por ejemplo, Kabat y otros, supra (1991)).

La presente invención proporciona un gran número de diferentes conjuntos de CDR. En este caso, un “conjunto de CDR completo” comprende las tres CDR ligeras variables y las tres CDR pesadas variables, por ejemplo, una vlCDR1, vlCDR2, vlCDR3, vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3. Estas pueden ser parte de un dominio ligero variable o pesado variable más grande, respectivamente. Además, como se indica en mayor detalle en la presente descripción, los dominios pesados variables y ligeros variables pueden estar en cadenas polipeptídicas separadas, cuando se usa una cadena ligera y pesada (por ejemplo, cuando se usan Fab), o en una sola cadena polipeptídica en el caso de secuencias de scFv.

Las CDR contribuyen a la formación de unión al antígeno o, más específicamente, del sitio de unión al epítopo de los anticuerpos. “Epítopo” se refiere a un determinante que interactúa con un sitio de unión al antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como parátopo. Los epítopos son agrupamientos de moléculas tales como cadenas laterales de aminoácidos o azúcares y, generalmente, tienen características estructurales específicas, así como características de carga específicas. Un solo antígeno puede tener más de un epítopo.

El epítopo puede comprender residuos de aminoácidos directamente implicados en la unión (también denominados componente inmunodominante del epítopo) y otros residuos de aminoácidos, que no están directamente implicados en la unión, tales como residuos de aminoácidos que son bloqueados de manera eficaz por el péptido de unión específica al antígeno; en otras palabras, el residuo de aminoácidos está dentro de la huella del péptido de unión específica al antígeno.

Los epítopos pueden ser conformacionales o lineales. Un epítopo conformacional se produce por aminoácidos espacialmente yuxtapuestos de diferentes segmentos de la cadena polipeptídica lineal. Un epítopo lineal es aquel producido por residuos de aminoácidos adyacentes en una cadena polipeptídica. Los epítopos conformacionales o no conformacionales pueden distinguirse en que la unión a los primeros pero no a los últimos se pierde en presencia de solventes desnaturalizantes.

Típicamente, un epítopo incluye al menos 3 y, con mayor frecuencia, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los anticuerpos que reconocen el mismo epítopo pueden verificarse en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana, por ejemplo, “caracterización”. Como se indica a continuación, la invención no solo incluye los dominios de unión al antígeno enumerados y los anticuerpos en la presente descripción, sino también aquellos que compiten por la unión con los epítopos unidos por los dominios de unión al antígeno enumerados (o, en el caso de NC[PD-1] Fvs, las CDR anti-PD-1 de la presente invención no compiten por la unión al mismo epítopo como los anticuerpos enumerados.

En términos de anticuerpos, cuyos componentes se usan en la presente invención, la porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora. Kabat y otros recolectaron numerosas secuencias primarias de las regiones variables de cadenas pesadas y cadenas ligeras. En función del grado de conservación de las secuencias, clasificaron secuencias primarias individuales en las CDR y el marco, y realizaron una lista de estas (véase, SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5ta edición, publicación NIH, No. 91-3242, E.A. Kabat y otros, incorporados en su totalidad por referencia).

En la subclase de inmunoglobulinas IgG, existen varios dominios de inmunoglobulina en la cadena pesada. En la presente descripción, “dominio de inmunoglobulina (Ig)” significa una región de una inmunoglobulina que tiene una estructura terciaria distinta. En la presente invención, son de interés los dominios de cadena pesada, que incluyen los dominios pesados constantes (CH) y los dominios bisagra. En el contexto de anticuerpos IgG, cada uno de los isotipos de IgG tiene tres regiones CH. En consecuencia, los dominios “CH” en el contexto de IgG son los siguientes: “CH1” se refiere a las posiciones 118-220 de acuerdo con el índice EU según Kabat. “CH2” se refiere a las posiciones 231-340 de acuerdo con el índice EU según Kabat y “CH3” se

refiere a las posiciones 341-447 de acuerdo con el índice EU según Kabat. Como se muestra en la presente descripción y se describe a continuación, las variantes de pI pueden estar en una o más de las regiones CH, así como en la región bisagra, como se indica a continuación.

Otro tipo de dominio Ig de la cadena pesada es la región bisagra. En la presente descripción, “bisagra” o “región bisagra” o “región bisagra del anticuerpo” o “región bisagra de la inmunoglobulina” significa el polipéptido flexible que comprende los aminoácidos entre el primer y segundo dominios constantes de un anticuerpo. Estructuralmente, el dominio CH1 de IgG finaliza en la posición 215 de EU, y el dominio CH2 de IgG comienza en el residuo de la posición 231 de EU. Por lo tanto, para IgG, la bisagra del anticuerpo se define en la presente descripción para incluir las posiciones 216 (E216 en IgG1) a 230 (P230 en IgG1), en donde la numeración es de acuerdo con el índice EU según Kabat. En algunas modalidades, por ejemplo, en el contexto de una región Fc, se incluye la bisagra inferior, con el comienzo de la “bisagra inferior” generalmente referida a la posición 226. Como se indica en la presente descripción, las variantes de pI también pueden estar en la región bisagra.

Como apreciarán los expertos en la técnica, la numeración y ubicación exactas de los dominios de región constante pueden ser diferentes entre los diferentes sistemas de numeración. Una comparación útil de la numeración de la región constante pesada de acuerdo con EU y Kabat es la siguiente, véase, Edelman y otros, 1969, Proc Natl Acad Sci EE. UU. 63:78-85 y Kabat y otros, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ta Ed., Servicio de Salud Pública de Estados Unidos, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, incorporados en su totalidad por referencia.

Tabla 2

	Numeración de EU	**Numeración de Kabat**
CH1	118-215	114-223
Bisagra	216-230	226-243
CH2	231-340	244-360

La cadena ligera generalmente comprende dos dominios, el dominio ligero variable (que contiene las CDR de cadena ligera y que forma, junto con los dominios pesados variables, la región Fv), y una región constante de cadena ligera (con frecuencia denominada CL o Cκ).

Otra región de interés para sustituciones adicionales, como se indica en la presente descripción, es la región Fc.

Por lo tanto, la presente invención proporciona distintos dominios de proteína. Como se describe en la presente descripción y se conoce en la técnica, las proteínas de fusión heterodiméricas de la invención comprenden distintos dominios dentro de las cadenas pesadas y ligeras, que también pueden estar superpuestos. Estos dominios incluyen, pero no se limitan a, el dominio Fc, el dominio CH1, el dominio CH2, el dominio CH3, el dominio bisagra, el dominio constante pesado (dominio CH1-bisagra-Fc o CH1-bisagra-CH2-CH3), el dominio pesado variable, el dominio ligero variable, el dominio constante ligero, dominios Fab y dominios scFv.

Como se usa en la presente descripción, "Fc", "región Fc" o "dominio Fc" significa el polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo, a excepción del primer dominio de inmunoglobulina de región constante (por ejemplo, CH1) y, en algunos casos, parte de la bisagra. Para IgG, el dominio Fc comprende los dominios de inmunoglobulina CH2 y CH3 (Cγ2 y Cγ3) y la región de bisagra inferior entre CH1 (Cγ1) y CH2 (Cγ2). A pesar de que los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana, en general, se define para incluir los residuos C226 o P230 en su extremo carboxilo terminal, en donde la numeración es de acuerdo con el índice EU según Kabat. En consecuencia, los dominios “CH” en el contexto de IgG son los siguientes: “CH1” se refiere a las posiciones 118-215 de acuerdo con el índice EU según Kabat. “Bisagra” se refiere a las posiciones 216-230 de acuerdo con el índice EU según Kabat. “CH2” se refiere a las posiciones 231-340 de acuerdo con el índice EU según Kabat y “CH3” se refiere a las posiciones 341-447 de acuerdo con el índice EU según Kabat. Por lo tanto, el “dominio Fc” incluye el dominio -CH2-CH3 y, opcionalmente, un dominio bisagra (bisagra-CH2-CH3. En algunas modalidades, como se describe en detalle a continuación, se realizan modificaciones de aminoácidos en la región Fc, por ejemplo, para alterar la unión a uno o más receptores FcγR o al receptor FcRn, y permite la formación y purificación de heterodímeros, como se indica en la presente descripción.

Por lo tanto, el “dominio Fc” incluye el dominio -CH2-CH3 y, opcionalmente, un dominio bisagra, que en muchos casos sirve como un enlazador de dominio. En las modalidades de la presente descripción, cuando un scFv se une a un dominio Fc, es el C-terminal del constructo de scFv que se une a la totalidad o parte de la bisagra del dominio Fc; por ejemplo, generalmente se une a la secuencia EPKS (SEQ ID NO: XX) que es el comienzo de la bisagra. De manera similar, cuando un componente de IL-15 (ya sea un complejo de IL-15, un dominio de IL-15 o un dominio de IL-15Rα) se une a un dominio Fc, generalmente se une de manera similar a todo o parte de la bisagra del dominio Fc (como un enlazador de dominio); por ejemplo, generalmente se une a la secuencia EPKS (SEQ ID NO: XX) que es el comienzo de la bisagra.

La presente invención se dirige a dominios Fc que generalmente se basan en la clase de IgG, que tiene varias subclases, que incluyen, pero no se limitan a, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En general, IgG1, IgG2 e IgG4 se usan con más frecuencia que IgG3. Cabe señalar que IgG1 tiene diferentes alotipos con polimorfismos en 356 (D o E) y 358 (L o M). Las secuencias representadas en la presente descripción usan el alotipo 356E/358M, sin embargo, el otro alotipo se incluye en la presente descripción. Es decir, cualquier secuencia que incluya un dominio Fc de IgG1 incluido en la presente descripción puede tener 356D/358L que reemplaza el alotipo 356E/358M.

Además, muchas de las secuencias en la presente descripción tienen al menos una de las cisteínas en la posición 220 reemplazada por una serina; en general, este está en el lado del “monómero scFv” o el lado del “componente de IL-15” para la mayoría de las secuencias representadas en la presente descripción, aunque también puede estar en el lado del “monómero Fab”, o ambos, para reducir la formación de disulfuro. Se incluyen específicamente dentro de las secuencias en la presente descripción una o ambas de estas cisteínas reemplazadas (C220S).

Por “cadena pesada” o “dominio de cadena pesada” en la presente descripción se entiende, del N- al C-terminal, los dominios VH-CH1-bisagra-CH2-CH3 (en donde el CH2-CH3 comprende un dominio Fc). La cadena pesada comprende un dominio pesado variable y un dominio constante, que incluye un dominio CH1-bisagra opcional-Fc que comprende un CH2-CH3. La cadena ligera comprende una cadena ligera variable y el dominio constante ligero (VL-CL).

En la presente descripción, "modificación" significa una sustitución, inserción y/o eliminación de aminoácidos en una secuencia polipeptídica o una alteración de un resto ligado químicamente a una proteína. Por ejemplo, una modificación puede ser un carbohidrato alterado o una estructura de PEG unida a una proteína. En la presente descripción, "modificación de aminoácidos" significa una sustitución, inserción y/o eliminación de aminoácidos en una secuencia polipeptídica. Para mayor claridad, a menos que se indique lo contrario, la modificación de aminoácidos es siempre a un aminoácido codificado por ADN, por ejemplo, los 20 aminoácidos que tienen codones en ADN y ARN.

En la presente descripción, "sustitución de aminoácidos" o "sustitución" significa el reemplazo de un aminoácido en una posición particular en una secuencia polipeptídica de origen con un aminoácido distinto. En particular, en algunas modalidades, la sustitución es en un aminoácido que no es de origen natural en la posición particular, ya sea de origen no natural dentro del organismo o en cualquier organismo. Por ejemplo, la sustitución E272Y o 272Y se refiere a una variante polipeptídica, en este caso una variante de Fc, en la que el ácido glutámico en la posición 272 se reemplaza con tirosina. Para mayor claridad, una proteína fue modificada por ingeniería genética para cambiar la secuencia codificante de ácidos nucleicos pero no para cambiar el aminoácido de inicio (por ejemplo, intercambio de CGG (que codifica arginina) con CGA (que también codifica arginina) para aumentar los niveles de expresión del organismo huésped) no es una “sustitución de aminoácidos”; es decir, a pesar de la creación de un nuevo gen que codifica la misma proteína, si la proteína tiene el mismo aminoácido en la posición particular en donde comenzó, no es una sustitución de aminoácidos.

Por "inserción de aminoácidos" o "inserción", como se usa en la presente descripción, se entiende la adición de una secuencia de aminoácidos en una posición particular en una secuencia polipeptídica de origen. Por ejemplo, -233E designa una inserción de ácido glutámico después de la posición 233 y antes de la posición 234. Además, -233ADE o A233ADE designa una inserción de AlaAspGlu después de la posición 233 y antes de la posición 234.

Como se usa en la presente descripción, "eliminación de aminoácidos" o "eliminación" significa la eliminación de un residuo o secuencia de aminoácidos en una posición particular en una secuencia polipeptídica de origen. Por ejemplo, E233-, E233#, E233(), E233_, o E233del designa una eliminación de ácido glutámico en la posición 233.

Además, EDA233- o EDA233# designa una eliminación de la secuencia GluAspAla que comienza en la posición 233.

Como se usa en la presente descripción, "proteína variante", "variante de proteína" o "variante" significa una proteína que difiere de la proteína de origen en virtud de al menos una modificación de aminoácidos. La variante de proteína puede referirse a la proteína en sí misma, a una composición que comprende la proteína o a la secuencia de aminoácidos que la codifica. Preferentemente, la variante de proteína tiene al menos una modificación de aminoácidos en comparación con la proteína de origen, por ejemplo, de aproximadamente de una a aproximadamente de setenta modificaciones de aminoácidos y, preferentemente, de aproximadamente de una a aproximadamente de cinco modificaciones de aminoácidos en comparación con la de origen. Como se describe a continuación, en algunas modalidades, el polipéptido de origen, por ejemplo, un polipéptido de origen Fc, es una secuencia de tipo salvaje humana, tal como la región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana. La secuencia de variante de proteína en la presente descripción preferentemente poseerá al menos aproximadamente de 80 % de identidad con una secuencia de proteína de origen, y con mayor preferencia al menos aproximadamente de 90 % de identidad, más preferentemente al menos aproximadamente de 95-98-99 % de identidad. La proteína variante puede referirse a la proteína variante en sí misma, a las composiciones que comprenden la variante de proteína, o a la secuencia de ADN que la codifica.

En consecuencia, "variante de Fc" o "Fc variante" como se usan en la presente descripción significan una proteína que comprende una modificación de aminoácidos en un dominio Fc. Las variantes de Fc de la presente invención se definen de acuerdo con las modificaciones de aminoácidos que las componen. Por lo tanto, por ejemplo, N434S o 434S es una variante de Fc con la sustitución de serina en la posición 434 con respecto al polipéptido Fc de origen, en donde la numeración es de acuerdo con el índice EU. De la misma manera, M428L/N434S define una variante de Fc con las sustituciones M428L y N434S con respecto al polipéptido Fc de origen. La identidad del aminoácido WT puede no estar especificada, en cuyo caso la variante mencionada anteriormente se denomina 428L/434S. Se debe tener en cuenta que el orden en que se proporcionan las sustituciones es arbitrario, es decir que, por ejemplo, M428L/N434S es la misma variante de Fc que M428L/N434S, etcétera. Para todas las posiciones analizadas en la presente invención que se refieren a anticuerpos, a menos que se especifique lo

contrario, la numeración de la posición de aminoácidos es de acuerdo con el índice EU. El índice EU o índice EU según Kabat o esquema de numeración de EU se refiere a la numeración del anticuerpo de EU (Edelman y otros, 1969, Proc Natl Acad Sci EE. UU. 63:78-85, incorporado en su totalidad por referencia.) La modificación puede ser una adición, eliminación o sustitución. Las sustituciones pueden incluir aminoácidos de origen natural y, en algunos casos, aminoácidos sintéticos. Los ejemplos incluyen la patente de EE. UU. No. 6,586,207; WO 98/48032; WO 03/073238; US2004/0214988A1; WO 05/35727A2; WO 05/74524A2; J. W. Chin y otros, (2002), Journal of the American Chemical Society 124:9026-9027; J. W. Chin, & P. G. Schultz, (2002), ChemBioChem 11:1135-1137; J. W. Chin, y otros, (2002), PICAS Estados Unidos de América 99:11020-11024; y, L. Wang, & P. G. Schultz, (2002), Chem. 1-10, todos incorporados en su totalidad por referencia.

Como se usa en la presente descripción, "proteína" significa en la presente descripción al menos dos aminoácidos unidos covalentemente, que incluyen proteínas, polipéptidos, oligopéptidos y péptidos. Como se usa en la presente descripción, "residuo" significa una posición en una proteína y su identidad de aminoácido asociada. Por ejemplo, asparagina 297 (también denominada Asn297 o N297) es un residuo en la posición 297 en el anticuerpo IgG1 humana.

Como se usa en la presente descripción, "Fab" o "región Fab" significa el polipéptido que comprende los dominios de inmunoglobulina VH, CH1, VL y CL. Fab puede referirse a esta región aislada, o esta región en el contexto de un anticuerpo de longitud completa, fragmentos de anticuerpos o proteína de fusión Fab.

Como se usa en la presente descripción, "Fv", "fragmento Fv" o "región Fv” significa un polipéptido que comprende los dominios VL y VH de un solo anticuerpo y forman un ABD. Como apreciarán los expertos en la técnica, estos generalmente están formados por dos cadenas, o pueden combinarse (generalmente con un enlazador como se analiza en la presente descripción) para formar un scFv.

En la presente descripción “Fv de cadena simple” o “scFv” se entiende un dominio pesado variable unido covalentemente a un dominio ligero variable, generalmente mediante el uso de un enlazador scFv como se analiza en la presente descripción, para formar un dominio scFv o scFv. Un dominio scFv puede estar en orientación del N- al C-terminal (vh-enlazador-vl o vl-enlazador-vh).

Como se usa en la presente descripción, "modificación de subclase IgG" o “modificación de isotipo” significa una modificación de aminoácidos que se convierte un aminoácido de un isotipo de IgG en el aminoácido correspondiente en un isotipo de IgG alineado diferente. Por ejemplo, debido a que IgG1 comprende una tirosina, e IgG2, una fenilalanina en la posición 296 de EU, una sustitución F296Y en IgG2 se considera una modificación de subclase IgG.

Por lo tanto, “isotipo”, como se usa en la presente descripción, significa cualquiera de las subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Se debe comprender que los anticuerpos terapéuticos también pueden comprender híbridos de isotipos y/o subclases.

Como se usa en la presente descripción, "región variable" significa la región de una inmunoglobulina que comprende uno o más dominios Ig codificados sustancialmente por cualquiera de los genes Vκ, Vλ, y/o VH que forman los locus genéticos de inmunoglobulina de cadena kappa, lambda y pesada, respectivamente. Con referencia a los dominios pesados y ligeros variables de la invención, la porción amino terminal de cada cadena de anticuerpo pesada o ligera incluye una región variable de aproximadamente de 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígeno, generalmente denominada en la técnica y en la presente descripción “dominio Fv” o “región Fv”. En la región variable, se agrupan tres lazos para cada uno de los dominios V de la cadena pesada y la cadena ligera para formar un sitio de unión al antígeno. Cada uno de los lazos se denomina región determinante de la complementariedad (en adelante denominada “CDR”), en la que la variación en la secuencia de aminoácidos tiene mayor relevancia. El término “variable” se refiere al hecho de que determinados segmentos de la región variable difieren ampliamente en secuencia entre anticuerpos. La variabilidad dentro de la región variable no está distribuida uniformemente. Por el contrario, las regiones V consisten en tramos relativamente invariables denominados regiones de marco (FR) de 15-30 aminoácidos separados por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas “regiones hipervariables” que tienen, cada una, 9-15 aminoácidos de longitud o más.

Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro regiones marco (FR), dispuestas del amino terminal al carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Por tanto, el dominio pesado variable comprende VHFR1-VHCDR1-

VHFR2-VHCDR2-VHFR3-VHCDR3-VHFR4 y el dominio ligero variable comprende VLFR1-VLCDR1-VLFR2-VLCDR2-VLFR3-VLCDR3-VLFR4.

Como se usa en la presente descripción, "modificación de origen no natural" significa una modificación de aminoácidos que no es isotípica. Por ejemplo, debido a que ninguna de las IgG comprende una serina en la posición 434, la sustitución 434S en IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (o híbridos de estos) se considera una modificación de origen no natural.

Como se usa en la presente descripción, "aminoácido" e "identidad de aminoácido" se refieren a uno de los 20 aminoácidos de origen natural que están codificados por ADN y ARN.

Como se usa en la presente descripción, "función efectora" significa un evento bioquímico que surge como resultado de la interacción de una región Fc del anticuerpo con un receptor o ligando de Fc. Las funciones efectoras incluyen, pero no se limitan a, ADCC, ADCP y CDC.

Como se usa en la presente descripción, "receptor gamma Fc", "FcγR" o "FcgammaR" se refiere a cualquier miembro de la familia de proteínas que se une a la región Fc del anticuerpo IgG y está codificado por un gen FcγR. En seres humanos, esta familia incluye, pero no se limita a, FcγRI (CD64), que incluye isoformas FcγRIa, FcγRIb y FcγRIc; FcγRII (CD32), que incluye isoformas FcγRIIa (que incluye alotipos H131 y R131), FcγRIIb (que incluye FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2) y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16), que incluye isoformas FcγRIIIa (que incluye alotipos V158 y F158) y FcγRIIIb (que incluye alotipos FcγRIIb-NA1 y FcγRIIb-NA2) (Jefferis y otros, 2002, Immunol Lett 82:57-65, incorporado en su totalidad por referencia), así como cualquier isoforma o alotipo de FcγR o FcγR humano no descubierto.

Como se usa en la presente descripción, "FcRn" o "receptor Fc neonatal" significa una proteína que se une a la región Fc del anticuerpo IgG y está codificada al menos en parte por un gen FcRn. Como se conoce en la técnica, la proteína funcional FcRn comprende dos polipéptidos, a menudo denominados como cadena pesada y cadena ligera. La cadena ligera es beta-2-microglobulina, y la cadena pesada está codificada por el gen FcRn. A menos que se indique lo contrario en la presente descripción, FcRn o una proteína FcRn se refiere al complejo de cadena pesada de FcRn con beta-2-microglobulina. Diversas variantes de FcRn pueden usarse para aumentar la unión al receptor FcRn, y en algunos casos, para aumentar la vida media en suero. En general,

a menos que se indique lo contrario, los monómeros Fc de la invención conservan la unión al receptor FcRn (y, como se indica a continuación, puede incluir variantes de aminoácidos para aumentar la unión al receptor FcRn).

Como se usa en la presente descripción, "polipéptido de origen" significa un polipéptido de inicio que se modifica posteriormente para generar una variante. El polipéptido de origen puede ser un polipéptido natural o una variante o una versión modificada por ingeniería genética de un polipéptido natural. Polipéptido de origen puede referirse al polipéptido en sí mismo, a composiciones que comprenden el polipéptido de origen, o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica.

En la presente, “región constante pesada” significa la porción CH1-bisagra-CH2-CH3 de un anticuerpo.

En la presente descripción, “proteína de fusión a Fc” o “inmunoadhesina” significan una proteína que comprende una región de Fc, en general unida (opcionalmente, a través de un resto enlazador, como se describe en la presente descripción) a una proteína distinta, tal como a IL-15 y/o IL-15R, como se describe en la presente descripción. En algunos casos, dos proteínas de fusión a Fc pueden formar una proteína de fusión a Fc homodimérica o una proteína de fusión a Fc heterodimérica, en la que se prefiere la última. En algunos casos, un monómero de la proteína heterodimérica de fusión de Fc comprende un dominio Fc solo (por ejemplo, un dominio Fc vacío) y el otro monómero es una fusión de Fc, que comprende un variante de dominio Fc y un dominio proteico, tal como un complejo de IL-15. Como se indica en la presente descripción, en algunas modalidades, un monómero de la proteína heterodimérica es una proteína de fusión a Fc que comprende un complejo de IL-15 y el otro monómero es una cadena pesada tradicional (con una cadena ligera asociada).

Como se usa en la presente descripción, "posición" significa una ubicación en la secuencia de una proteína. Las posiciones pueden estar numeradas de forma secuencial o de acuerdo con un formato establecido, por ejemplo, el índice EU para numeración de anticuerpos.

En la presente descripción, en el contexto de los monómeros de los anticuerpos heterodiméricos de la invención, “capacidad de concatenación” significa que, de manera similar a las dos cadenas de ADN que “coinciden”, se incorporan variantes de heterodimerización en cada monómero para preservar la capacidad de “coincidir” para

formar heterodímeros. Por ejemplo, si algunas variantes de pI se modifican por ingeniería genética en el monómero A (por ejemplo, al hacer que el pI sea más alto), las variantes estéricas que son "pares de carga" que pueden utilizarse también no interfieren con las variantes de pI, por ejemplo, las variantes de carga que hacen un pI más alto se colocan en la misma "cadena" o "monómero" para preservar ambas funcionalidades. De manera similar, para las variantes "sesgadas" que vienen en pares de un conjunto como se indica más detalladamente a continuación, la persona experta considerará el pI al decidir qué cadena o monómero que incorpora un conjunto del par irá, tal que la separación de pI se maximiza al usar el pI de los sesgos también.

Como se usa en la presente descripción, "célula diana", significa una célula que expresa el antígeno diana, en este caso, los receptores PD-1 y/o IL-15.

Por "tipo salvaje o WT" en la presente descripción se entiende una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que se encuentra en la naturaleza, incluidas las variaciones alélicas. Una proteína WT tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que no fue modificada intencionalmente.

En general, las proteínas heterodiméricas bioespecíficas de la presente invención son aisladas o recombinantes. Cuando se usa para describir los distintos polipéptidos divulgados en la presente descripción, "aislado" significa un polipéptido que fue identificado y separado y/o recuperado de una célula o cultivo celular en el que se expresó. En general, un polipéptido aislado se preparará por al menos una etapa de purificación. Una "proteína aislada" significa una proteína que está sustancialmente libre de otras proteínas que tienen especificidades de unión diferentes. "Recombinante" significa que las proteínas se generan mediante el uso de técnicas de ácidos nucleicos recombinantes en células huésped exógenas.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia de proteína se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia específica (parental), luego de alinear las secuencias e introducir huecos, de ser necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, sin tener en cuenta ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras conocidas por los expertos en la técnica, por ejemplo,

mediante el uso del software informático disponible para el público, tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN, o Megalign (DNASTAR™). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros adecuados para medir el alineamiento, que incluyen cualquier algoritmo necesario para lograr el alineamiento máxima sobre la longitud total de las secuencias que se comparan. Un programa en particular es el programa ALIGN-2 descrito en los párrafos [0279] a [0280] de la Publicación de EE. UU. No. 20160244525, incorporada en la misma como referencia.

El grado de identidad entre una secuencia de aminoácidos de la presente invención ("secuencia de la invención") y la secuencia de aminoácidos parental se calcula como el número de coincidencias exactas en un alineamiento de las dos secuencias, dividido por la longitud de la "secuencia de la invención," o la longitud de la secuencia parental, la que es más corta. El resultado se expresa en porcentaje de identidad.

En algunas modalidades, dos o más secuencias de aminoácidos son al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % idénticas. En algunas modalidades, dos o más secuencias de aminoácidos son al menos 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, o incluso 100 % idénticas.

"Unión específica" o "se une específicamente a" o son "específicas para" un antígeno o un epítopo (en este caso, PD-1 humana) significa una unión que difiere hasta cierto grado de una interacción no específica. La unión específica puede medirse, por ejemplo, mediante la determinación de la unión a una molécula en comparación con la unión a una molécula control, que en general es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica puede determinarse mediante competencia con una molécula control que es similar a la diana.

La unión específica para un antígeno o epítopo particular puede ser exhibida, por ejemplo, por un ABD que tiene una K_D para un antígeno o epítopo de al menos aproximadamente de 10^{-4} M, al menos aproximadamente de 10^{-5} M, al menos aproximadamente de 10^{-6} M, al menos aproximadamente de 10^{-7} M, al menos aproximadamente de 10^{-8} M, al menos aproximadamente de 10^{-9} M, alternativamente, al menos aproximadamente de 10^{-10} M, al menos aproximadamente de 10^{-11} M, al menos aproximadamente de 10^{-12} M, o mayor, donde KD se refiere a una tasa de disociación de una interacción ABD-antígeno particular. Típicamente, un ABD que se une específicamente a un antígeno tendrá una KD que es 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10 000 o más veces mayor para una molécula control en relación con el antígeno o epítopo.

Además, la unión específica para un antígeno o un epítopo particular puede ser exhibida, por ejemplo, por un anticuerpo que tiene una KA o Ka para un antígeno o epítopo al menos 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10 000 o más veces mayor para el epítopo en relación a un control, donde KA o Ka se refieren a una tasa de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. La afinidad de unión se mide generalmente mediante el uso de un ensayo basado en resonancia de plasmón superficial (SPR) (por ejemplo, Biacore) o un ensayo basado en interferometría de biocapa (BLI) (por ejemplo, Octet).

III. **Introducción**

La invención proporciona proteínas de fusión heterodiméricas dirigidas que pueden unirse al antígeno PD-1 inhibidor de punto de regulación y pueden formar complejos con la cadena gamma común (γc; CD132) y/o la cadena β del receptor de IL-2 (IL-2Rβ; CD122) debido a la presencia de un complejo de IL-15. En general, las proteínas de fusión heterodiméricas de la invención tienen tres componentes funcionales: un componente de IL-15/IL-15Rα(sushi), por lo general denominado en la presente descripción “complejo de IL-15” o “complejo de IL-15/Rα”, un componente de anti-PD-1 que sirve como resto “dirigido” al unir la proteína de fusión a una célula que expresa PD-1, y un componente Fc, cada uno de ellos puede tener diferentes formas y cada uno de ellos puede combinarse con los otros componentes en cualquier configuración.

Sin embargo, el componente anti-PD-1 de las proteínas de fusión heterodiméricas dirigidas de la invención no compite por la unión con anticuerpos anti-PD-1 conocidos tales como nivolumab y pembrolizumab. Es decir, al incluir un dominio de unión al antígeno (ABD) anti-PD-1 (αPD-1) que no compite por la unión con los anticuerpos αPD-1 aprobados (“NC[PD-1]”), las proteínas de fusión del La invención permite terapias de combinación eficientes con terapias de anticuerpos anti-PD-1. Es decir, al incluir un ABD anti-PD-1 que no compite por la unión (“ABD a NC-αPD-1”) con tratamientos aprobados, el ABD no competidor puede usarse para dirigir las proteínas de fusión al tumor, pero aún permiten el tratamiento terapéutico con un anticuerpo anti-PD-1 adicional, ya que ambos pueden unirse de manera no competitiva a PD-1. Además, en algunas modalidades, los ABD a NC-αPD-1 también pueden bloquear completamente la interacción de PD-1:PD-L1 (modalidades basadas en las variantes de mAb A), bloquear parcialmente la interacción (variantes de mAbC) o no bloquear en toda la interacción (variantes de mAbB).

Como apreciarán los expertos en la técnica y como se indica en la presente descripción, en la Figura 28 se muestran varios formatos diferentes para las diferentes proteínas de fusión heterodiméricas dirigidas, los constructos no competidores, “NC-αPD-1 X IL-15/Rα”.

Además, la invención se basa en comparaciones de las presentes modalidades para "proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc no dirigidas", que no contienen un dominio de unión al antígeno a una PD-1 humana, como se representa en la Figura 13.

Además, las proteínas de fusión heterodiméricas dirigidas o no dirigidas de la invención pueden combinarse con otros anticuerpos para receptores de punto de control, que incluyen anti-PD-1, anti-TIM-3, anti-LAG-3, anti-TIGIT, etc.

Por consiguiente, la presente invención proporciona varios componentes funcionales diferentes que se pueden ensamblar de varias formas diferentes para generar las proteínas de fusión heterodiméricas de la invención. Como se discutió anteriormente, las proteínas de fusión incluyen un complejo de IL-15 que incluye un dominio de IL-15 y un componente de receptor de IL-15.

A. Complejos de IL-15

Como se muestra en las figuras, el complejo IL-15 puede tomar varias formas. Como se indicó anteriormente, la proteína IL-15 por sí misma es menos estable que cuando forma un complejo con la proteína IL-15Rα. Como se conoce en la técnica, la proteína IL-15Rα contiene un "dominio sushi", que es la región más corta del receptor que conserva la actividad de unión a IL-15 y es la SEQ ID NO: 4. Por tanto, aunque pueden prepararse proteínas de fusión heterodiméricas que comprenden el dominio extracelular completo de la proteína IL-15Rα (SEQ ID NO: 3) o fragmentos funcionales (por ejemplo, más grandes que la SEQ ID NO: 4 pero no todos los de la SEQ ID NO: 3) las modalidades preferidas en la presente descripción incluyen complejos que solo usan el dominio sushi.

En consecuencia, los complejos de IL-15 generalmente comprenden la proteína IL-15 y el dominio sushi de IL-15Rα (a menos que se indique lo contrario sobre el uso de la secuencia de longitud completa, “IL-15Rα”, “IL-15Rα(sushi)” y "sushi" se usan indistintamente en toda la descripción). Cuando forman un complejo todos juntos, la nomenclatura se representa con una “barra”, “/”, como “IL-15/Rα”, lo que significa que hay un dominio de IL-15 y un dominio de IL-15Rα presentes.

1. Dominios de IL-15

Como apreciarán los expertos en la técnica, el dominio de IL-15 puede ser una secuencia humana de tipo salvaje o puede diseñarse por ingeniería genética para incluir variantes, particularmente variantes de potencia como se discute a continuación.

En algunas modalidades, la proteína IL-15 humana tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en NCBI Ref. Seq. No. NP_000576.1 o la SEQ ID NO: 1, que es la secuencia precursora. En algunos casos, la secuencia codificante de IL-15 humana se expone en NCBI Sec. de Ref. No. NM_000585. Una proteína IL-15 ilustrativa de la proteína de fusión a Fc heterodimérica como se indica en la presente descripción puede tener la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 (IL-15 madura), que corresponde a los aminoácidos 49-162 de la SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, la proteína IL-15 tiene al menos 90 %, por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o mayor identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2.

En algunas modalidades, el dominio de IL-15 se ha diseñado por ingeniería genética para incluir sustituciones de aminoácidos.

Además, en algunas modalidades, la proteína humana IL-15 está diseñada por ingeniería genética para conferir una potencia disminuida como se describe generalmente en PCT/US2019/028107, incorporada en la misma por referencia en su totalidad. Es decir, como se describe en el mismo, la reducción en la potencia de IL-15 en las proteínas de fusión heterodiméricas de la invención (opcionalmente con y sin sustituciones de Xtend-Fc descritas en la presente descripción, tales como M428L/N434S) puede mejorar tanto las farmacodinámicas como las farmacocinéticas en sujetos que se administran tales proteínas. De manera similar, como se muestra en el ejemplo 7 del documento PCT/US2019/028107, que las variantes de IL-15/Rα-Fc de potencia reducida, tales como XENP22821, pueden expandir los recuentos de linfocitos durante más tiempo que las proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc de tipo salvaje descritas en la misma, tales como XENP20818. En particular, XENP23343, el análogo de Xtend de XENP22821, mejoró además la duración de la expansión de linfocitos aún más que XENP22821. Además, la reducción en la potencia de IL-15 puede mejorar el índice terapéutico (es decir, permitir una dosificación más alta con menos toxicidad).

Como se ilustra en el ejemplo 14, las proteínas de fusión NC-αPD-1 X IL-15/Rα-Fc pueden superar la supresión de Treg de la proliferación de células T efectoras.

De manera similar, como se muestra en el ejemplo 4, a continuación, las proteínas de fusión NC-αPD-1 X IL-15/Rα-Fc pueden promover la expansión de leucocitos y exacerbar la GVHD xenogénica en un rango de niveles de dosis. En particular, la terapia combinada de las proteínas de fusión NC-αPD-1 X IL-15/Rα-Fc y un anticuerpo anti-PD-1 mostró sinergia (por ejemplo, un efecto sinérgico), particularmente a una dosis baja.

Como se muestra en los ejemplos 3 y 8, las proteínas de fusión ?PD-1 x IL-15/R?-Fc son selectivas para los linfocitos activados (por ejemplo, los que se encontrarían en el entorno tumoral).

Por consiguiente, la presente invención proporciona varias variantes de aminoácidos de IL-15 adecuadas que confieren potencia reducida y farmacocinética aumentada, que incluyen, pero no se limitan a, variantes de proteínas de IL-15 que comprenden sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo de N1D; N4D; D8N; D30N; D61N; E64Q; N65D; Q108E; N1D/N4D/D8N; N1D/N4D/N65D; N1D/D30N; N1D/D61N; N1D/D61N/E64Q/Q108E; N1D/E64Q; N1D/N65D; N1D/Q108E; N4D; N4D/D30N; N4D/D61N; N4D/D61N/N65D; N4D/D61N/E64Q/Q108E; N4D/E64Q; N4D/N65D; D8N/D61N; D8N/E64Q; D30N/E64Q; D30N/N65D; D30N/E64Q/N65D; D30N/Q180E; D61N/E64Q/N65D; E64Q; E64Q/N65D; E64Q/Q108E y N65D/Q108E.

En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones isostéricas en las interfaces IL-15:IL-2β e IL-15:cadena gamma común.

En algunas modalidades, la proteína IL-15 humana, tal como una proteína IL-15 humana madura de la proteína de fusión a Fc es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En algunos casos, la proteína IL-15 humana, tal como la proteína IL-15 humana madura, no tiene sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, la variante de proteína IL-15 humana madura tiene una o más mutaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, inserciones y/o eliminaciones). En algunos casos, la mutación introduce un residuo de cisteína que puede formar un enlace disulfuro con la proteína del receptor alfa de IL-15 humana (IL-15Rα).

En algunas modalidades, la invención proporciona proteínas que comprenden una variante de IL-15 humana con la variante de aminoácidos D30N. En algunas modalidades, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2

y una sustitución D30N. En algunas modalidades, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y al menos una sustitución D30N.

En algunas modalidades, la invención proporciona proteínas que comprenden una variante de IL-15 humana con la variante de aminoácidos N1D. En algunas modalidades, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una sustitución N1D. En algunas modalidades, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y al menos una sustitución N1D.

En algunas modalidades, la invención proporciona proteínas que comprenden una variante de IL-15 humana con la variante de aminoácidos N4D. En algunas modalidades, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y una sustitución N4D. En algunas modalidades, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y al menos una sustitución N4D.

En algunas modalidades, la invención proporciona proteínas que comprenden una variante de IL-15 humana con la variante de aminoácidos E64Q. En algunas modalidades, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y una sustitución E64Q. En algunas modalidades, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y al menos una sustitución E64Q.

En algunas modalidades, la invención proporciona proteínas que comprenden una variante de IL-15 humana con la variante de aminoácidos N65D. En algunas modalidades, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y una sustitución N65D. En algunas modalidades, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y al menos una sustitución N65D.

En algunas modalidades, la invención proporciona proteínas que comprenden una variante de IL-15 humana con sustituciones de aminoácidos N1D/D30N. En algunas modalidades, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y sustituciones N1D/D30N. En algunas modalidades, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y al menos sustituciones N1D/D30N.

En algunas modalidades, la invención proporciona proteínas que comprenden una variante de IL-15 humana con sustituciones de aminoácidos N4D/D30N. En algunas modalidades, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2

y sustituciones N4D/D30N. En algunas modalidades, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y al menos sustituciones N4D/D30N.

En algunas modalidades, la invención proporciona proteínas que comprenden una variante de IL-15 humana con sustituciones de aminoácidos D30N/E64Q. En algunas modalidades, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 y sustituciones D30N/E64Q. En algunas modalidades, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y al menos sustituciones D30N/E64Q.

En algunas modalidades, la invención proporciona proteínas que comprenden una variante de IL-15 humana con sustituciones de aminoácidos D30N/N65D. En algunas modalidades, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y sustituciones D30N/N65D. En algunas modalidades, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y al menos sustituciones D30N/N65D.

En algunas modalidades, la invención proporciona proteínas que comprenden una variante de IL-15 humana con sustituciones de aminoácidos N4D/N65D. En algunas modalidades, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 con sustituciones N4D/N65D. En algunas modalidades, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 y al menos sustituciones N4D/N65D.

En algunas modalidades, la invención proporciona proteínas que comprenden una variante de IL-15 humana con sustituciones de aminoácidos D30N/E64Q/N65D. En algunas modalidades, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 con sustituciones D30N/E64Q/N65D. En algunas modalidades, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y al menos sustituciones D30N/E64Q/N65D.

2. Dominios IL-15/Rα

Además de un dominio de IL-15, que incluye opcionalmente variantes de aminoácidos como se indica anteriormente, las proteínas de fusión heterodiméricas de la invención incluyen un dominio “sushi”.

En algunas modalidades, el receptor alfa de la proteína IL-15 humana (IL-15Rα) tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en NCBI Ref. Seq. No. NP_002180.1 o la SEQ ID NO: 3. En algunos casos, la secuencia codificante de IL-15Rα humana se expone en NCBI Ref. Seq. No. NM_002189.3. Una proteína IL-15Rα ilustrativa de la proteína de

fusión a Fc heterodimérica como se indica en la presente descripción, puede comprender o consistir en el dominio sushi de la SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, los aminoácidos 31-95 de la SEQ ID NO: 3), o en otras palabras, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4. Es decir, modalidades particulares utilizan una versión truncada del dominio extracelular del receptor.

En algunas modalidades, la proteína IL-15Rα tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una inserción de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de D96, P97, A98, D96/P97, D96/C97, D96/P97/A98, D96/P97/C98 y D96/C97/A98, en donde la posición del aminoácido es relativa a la proteína IL-15Rα humana de longitud completa o la SEQ ID NO: 3. Por ejemplo, los aminoácidos tales como D (por ejemplo, Asp), P (por ejemplo, Pro), A (por ejemplo, Ala), DP (por ejemplo, Asp-Pro), DC (por ejemplo, Asp-Cys), DPA (por ejemplo, Asp-Pro-Ala), DPC (por ejemplo, Asp-Pro-Cys), o DCA (por ejemplo, Asp-Cys-Ala) pueden añadirse al C-terminal de la proteína IL-15Rα de la SEQ ID NO: 4. En algunas modalidades, la proteína IL-15Rα tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste de K34C, A37C, G38C, S40C y L42C, en donde la posición del aminoácido es relativa a la SEQ ID NO: 4. La proteína IL-15Rα (sushi) de la SEQ ID NO: 4 puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más mutaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, inserciones y/o eliminaciones).

3. Complejos de IL-15 en diferentes formatos

Por consiguiente, los complejos de IL-15 generalmente comprenden la proteína IL-15 y el dominio sushi de IL-15Rα. Cuando forman un complejo todos juntos, la nomenclatura se representa con una “barra”, “/”, como “IL-15/Rα”, lo que significa que hay un dominio de IL-15 y un dominio de IL-15Rα presentes.

Como se representa en la Figura 28, el complejo IL-15/Rα puede estar en dos formatos diferentes; ya sea una asociación no covalente o un complejo covalente. Como se muestra en las Figuras 28B, 28D, 28F y 28G, la proteína IL-15 y la IL-15Rα(sushi) no se unen covalentemente, sino que se autoensamblan a través de interacciones normales de ligando-ligando. Como se describe con mayor detalle en la presente descripción, puede ser el dominio de IL-15 o el dominio sushi que se une covalentemente al dominio Fc (generalmente, mediante el uso de un enlazador de dominios opcional).

Alternativamente, el complejo IL-15/Rα es una unión covalente que usa un enlazador de dominio como se muestra generalmente en las Figuras 28A, 28C, 28E y 28H. En cada uno de estos casos, la orientación N- a C-terminal de la IL-15 y la IL-15Rα puede cambiar: es decir, en la Figura 28A, la invención también incluye el caso donde el dominio de IL-15 está en el N-terminal, con el dominio de IL-15Rα unido mediante el uso de un enlazador al dominio Fc. De manera similar, en la Figura 28C, la invención también incluye el caso donde el dominio de IL-15 está en el N-terminal, con el dominio de IL-15Rα unido mediante el uso de un enlazador al dominio Fc. La Figura 28E de la invención también incluye el caso donde el dominio de IL-15 está en el C-terminal del dominio Fc (enlazado mediante el uso de un enlazador de dominio), con el dominio de IL-15Rα unido mediante el uso de un enlazador al dominio IL-15. Finalmente, la Figura 28H también puede incluir el caso donde el dominio de IL-15 es N-terminal al dominio de IL-15Rα.

B. Dominios de unión al antígeno anti-PD-1 no competidores

El componente anti-PD-1 (por ejemplo, el dominio de unión al antígeno anti-PD-1 (ABD)) de la invención es generalmente un conjunto de 6 CDR incluidas dentro de un dominio pesado variable y un dominio ligero variable que forman un dominio Fv que puede unirse a PD-1 humana (cuya secuencia se representa en la Figura 2) pero no compite con anticuerpos comerciales anti-PD-1 tales como pembroluzimab y nivolimab. Esto permite una excelente orientación de las proteínas de fusión heterodiméricas de la invención a los tumores, lo que permite la acción local de los complejos IL-15/Rα, pero también permite tratamientos de combinación con anticuerpos anti-PD-1 eficaces, sin competir por los mismos epítopos de PD-1.

Los dominios de unión al antígeno NC-αPD-1 de la invención pueden adoptar dos formatos generales, ya sea como un dominio scFv, tales como los representados en la Figura 28A y 28B, o como un dominio Fab, presente en dos polipéptidos diferentes, tales como los representados en las Figuras 28C y 28D (unión monovalente de PD-1) y las Figuras 28E, 28F, 28G y 28H (unión bivalente de PD-1), que se describen con más detalle a continuación.

Hay un gran número de dominios VH y VL que encuentran uso en los presentes constructos, algunos de los cuales se muestran en las figuras que incluyen específicamente en la Figura 43, que incluye secuencias VH y VL para dominios de unión al antígeno que no compiten por la unión con pembrolizumab y nivolumab. Cabe

señalar que cualquiera de los dominios VH puede combinarse con cualquiera de los dominios VL, con combinaciones particulares útiles a continuación.

1. Dominios VH

Con respecto en particular a las variantes de mAbC, también hay un conjunto de variantes de afinidad útiles del dominio VH, como se muestra en la Figura 65. En estas modalidades, las sustituciones de aminoácidos particularmente útiles en el dominio VH, en comparación con mAbC_H1, incluyen, pero no se limitan a, F32L, S52aG, R97E, R97Y y R97W, que pueden usarse solos o en combinación. En particular, las combinaciones de VH que encuentran uso específico en algunas modalidades además de las cinco variantes de un solo aminoácido incluyen, pero no se limitan a, F32L/S52aG y F32L/S52aG/R97W.

En algunos aspectos, el dominio VH del ABD a NC-PD-1 se selecciona de los que se representan en la Figura 43.

En algunos aspectos, el ABD a NC-PD-1 se basa en el origen de mAbC (H1_L1, secuencias que se muestran en la Figura 43) y el dominio VH de la variante de mAbC se selecciona del grupo que consiste de H1, H1.1, H1.2, H1.3, etc. a H1.168 de la Figura 43.

En algunos aspectos, el ABD a NC-PD-1 se basa en el origen de mAbC (H1_L1, secuencias que se muestran en la Figura 43) y el dominio VH de la variante mAbC se selecciona del grupo que consiste de H1.19, H1.48 H1.125, H1.130, H1.132, H1.169 y H1.175 de la Figura 43.

2. Dominios VL

Con respecto en particular a las variantes de mAbC, también hay un conjunto de variantes de afinidad útiles de la VL, como se muestra en la Figura 65. En estas modalidades, las sustituciones de aminoácidos particularmente útiles en el dominio VL, en comparación con mAbC_L1, incluyen, pero no se limitan a, N27dH, N27dS, K30Y, S93T e Y94W, que pueden usarse solos o en combinación.

En algunos aspectos, el dominio VL de la variante de mAbC se selecciona del grupo que consiste de L1.1, L1.3, L1.45, L1.117, L1.135, L1.136 y L1.140.

3. Combinaciones VH y VL

Dentro de las cadenas principales parentales, por ejemplo, dentro de las secuencias de mAbC, los dominios VL y VH pueden ser intercambiables, como se representa generalmente en la Figura 63.

De uso particular en algunas modalidades es la combinación de un VH seleccionado del grupo que consiste de H1, H1.1, H1.2, H1.3, H1.4, H1.5, H1.6, H1.7, H1.8, H1.9, H1.10, etc. a H1.168 (incluida) y H1.175 y L1.140.

De uso particular en algunas modalidades es la combinación de un VH seleccionado del grupo que consiste de H1, H1.1, H1.2, H1.3, H1.4, H1.5, H1.6, H1.7, H1.8, H1.9, H1.10, etc. a H1.168 (incluida) y H1.175 y L1.1.

Una combinación particular que encuentra uso en la presente invención es mAb C H1.19_L1.140.

Una combinación particular que encuentra uso en la presente invención es mAb C H1_L1.1.

De uso particular en algunas modalidades son las combinaciones de dominio VH y VL de H1.19_L1.140, H1_L1.1, H1.19_L1, H1.48_L1, H1.125_L1, H1.30_L1, H1.132_L1, H1_L1.1 H1_L1.3, H1_L1.45, H1_L1.117, H1_L1.129, H1.19_L1.1, H1.32_L1.1, H1.169_L1.1, H1.169_L1.1, H1.175_L1.1, H1.175_L1.1, H1_L1.140, H1_L1.135, H1_L1.136, H1.132_L1.135, H1.132_L1.140, H1.175_L1.135 y H1.175_L1.140.

Las combinaciones adicionales de dominios VH y VL de mAbC que encuentran uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, mAb A[PD-1]_H1 y mAb A[PD-1]_L1; mAb B[PD-1]_H1 y mAb B[PD-1]_L1; mAb C[PD-1]_H1 y mAb C[PD-1]_L1; mAb C[PD-1]_H1 y mAb C[PD-1]_L1.1; mAb C[PD-1]_H1 y mAb C[PD-1]_L1.3; mAb C[PD-1]_H1 y mAb C[PD-1]_L1.45; mAb C[PD-1]_H1 y mAb C[PD-1]_L1.117; mAb C[PD-1]_H1 y mAb C[PD-1]_L1.135; mAb C[PD-1]_H1 y mAb C[PD-1]_L1.140; mAb C[PD-1]_H1 y mAb C[PD-1]_L2; mAb C[PD-1]_H1.132 y mAb C[PD-1]_L1; mAb C[PD-1]_H1.132 y mAb C[PD-1]_L1.1; mAb C[PD-1]_H1.132 y mAb C[PD-1]_L1.3; mAb C[PD-1]_H1.132 y mAb C[PD-1]_L1.45; mAb C[PD-1]_H1.132 y mAb C[PD-1]_L1.117; mAb C[PD-1]_H1.132 y mAb C[PD-1]_L1.135; mAb C[PD-1]_H1.132 y mAb C[PD-1]_L1.140; mAb C[PD-1]_H1.132 y mAb C[PD-1]_L2; mAb C[PD-1]_H2 y mAb C[PD-1]_L1; mAb C[PD-1]_H2 y mAb C[PD-1]_L1.1; mAb C[PD-1]_H2 y mAb C[PD-1]_L1.3; mAb C[PD-1]_H2 y mAb C[PD-1]_L1.45; mAb C[PD-1]_H2 y mAb C[PD-1]_L1.117; mAb

C[PD-1]_H2 y mAb C[PD-1]_L1.135; mAb C[PD-1]_H2 y mAb C[PD-1]_L1.140; y mAb C[PD-1]_H2 y mAb C[PD-1]_L2.

Algunas modalidades de la invención comprenden al menos un dominio scFv que, si bien no es de origen natural, generalmente incluye un dominio pesado variable y un dominio ligero variable, unidos por un enlazador scFv. Como se indica en la presente descripción, aunque el dominio scFv es generalmente del N- al C-terminal, orientado como vh-enlazador scFv-vl, esto puede revertirse para cualquiera de los dominios scFv (o aquellos construidos mediante el uso de las secuencias vh y vl de los Fab), para vl-enlazador scFv-vh, con enlazadores opcionales en uno o ambos terminales, en dependencia del formato (véase, las Figuras 4A-4B del documento US 62/353,511).

Como se muestra en la presente descripción, el ABD anti-PD-1 puede estar alternativamente en la forma de un scFv, en donde los dominios vh y vl se unen mediante el uso de un enlazador scFv, que puede ser opcionalmente un enlazador scFv cargado. Como apreciarán los expertos en la técnica, el scFv puede ensamblarse del N- al C-terminal como N-vh-enlazador scFv-vl-C o como N-vl-enlazador scFv-vh-C, con el C-terminal del dominio scFv que por lo general se une al dominio Fc bisagra-CH2-CH3. Los Fv adecuados (que incluyen los conjuntos de CDR y los dominios pesados/ligeros variables) pueden usarse en formatos scFv o formatos Fab se muestran en la Figura 43. Como apreciarán además los expertos en la técnica, la totalidad o parte de la bisagra (que también puede ser una bisagra de tipo salvaje de IgG1, IgG2 o IgG4 o una variante de estos, tal como la variante de bisagra S241P o S228P de IgG4 con la sustitución de prolina en la posición 228 con respecto al polipéptido bisagra de IgG4 de origen (en donde la numeración S228P es de acuerdo con el índice EU y S241P es de acuerdo con la numeración de Kabat)) puede usarse como el enlazador de dominio entre el dominio scFv y CH2-CH3, o puede usarse un enlazador de dominio diferente tal como se representa en las figuras.

C. Dominios Fc

Además de los complejos de IL-15 y los dominios Fv de NC-αPD-1 dirigidos, la invención proporciona además dominios Fc heterodiméricos como componente. Como se muestra en la Figura 28, estos dominios Fc heterodiméricos sirven para unir el IL-15/Rα y los dominios anti-PD-1 dirigidos en un solo constructo, que generalmente comprende dos cadenas polipeptídicas (por ejemplo, Figura 28A, donde un monómero comprende el complejo IL-15/Rα y el otro monómero comprende el scFv anti-PD-1), tres cadenas

polipeptídicas (por ejemplo, Figura 28C, donde un monómero comprende el complejo IL-15/Rα, un segundo monómero comprende una cadena pesada y el tercero monómero es la cadena ligera), etc.

El componente del dominio Fc de la invención es como se describe en la presente descripción, que generalmente contiene variantes sesgadas y/o variantes de pI opcionales y/o variantes de ablación como se indica en la presente descripción. Véase, por ejemplo, la divulgación del documento WO2017/218707 bajo el título “IV Heterodimeric Antibodies”, que incluye las secciones IV.A, IV.B, IV.C, IV.D, IV.E, IV.F, IV.G, IV.H y IV.I, todos los cuales se incorporan expresamente por referencia en su totalidad. De uso particular en las proteínas heterodiméricas de la presente invención son los dominios Fc que contienen “variantes sesgadas”, “variantes de pI”, “variantes de ablación” y variantes FcRn como se describe en la misma. Los dominios Fc particularmente útiles son los que se muestran en la Figura 8.

Los dominios Fc pueden derivarse de los dominios Fc de IgG, por ejemplo, los dominios Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, con los dominios Fc de IgG1 que se usan particularmente en la invención. A continuación se describen los dominios Fc que son útiles para los monómeros de fusión Fc IL-15/IL-15Rα y los fragmentos de anticuerpos de punto de regulación de las proteínas Fc heterodiméricas de la presente invención.

Por lo tanto, la presente invención proporciona diferentes dominios de anticuerpo, por ejemplo, diferentes dominios Fc. Como se describe en la presente descripción y se conoce en la técnica, las proteínas heterodiméricas de la invención comprenden diferentes dominios, que también pueden estar superpuestos. Estos dominios incluyen, pero no se limita a, el dominio Fc, el dominio CH1, el dominio CH2, el dominio CH3, el dominio bisagra, y el dominio constante pesado (dominio CH1-bisagra-Fc o CH1-bisagra-CH2-CH3).

Por lo tanto, el dominio Fc incluye el dominio -CH2-CH3 y, opcionalmente, un dominio bisagra, y puede ser de una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana, con los dominios Fc derivados de IgG1. En algunas de las modalidades de la presente descripción, cuando un fragmento de proteína, por ejemplo, IL-15 o IL-15Rα se une a un dominio Fc, es el C-terminal del constructo IL-15 o IL-15Rα el que se une en su totalidad o en parte a la bisagra del dominio Fc; por ejemplo, por lo general se une a la secuencia EPKS que es el comienzo de la bisagra. En otras modalidades, cuando un fragmento de proteína, por

ejemplo, IL-15 o IL-15Rα, se une a un dominio Fc, el C-terminal del constructo IL-15 o IL-15Rα se une al dominio CH1 del dominio Fc.

En algunos de los constructos y secuencias de la proteína de dominio Fc como se indica en la presente descripción, el C-terminal del fragmento de proteína IL-15 o IL-15Rα se une al N-terminal de un enlazador de dominio, cuyo C-terminal se une al N-terminal de un dominio Fc constante (fragmento de proteína N-IL-15 o IL-15Rα-enlazador-dominio Fc-C), aunque puede cambiarse (N-dominio Fc-enlazador-fragmento de proteína IL-15 o IL-15Rα-C). En otros constructos y secuencias como se indica en la presente descripción, el C-terminal de un primer fragmento de proteína se une al N-terminal de un segundo fragmento de proteína, opcionalmente a través de un enlazador de dominio, el C-terminal del segundo fragmento de proteína se une al N-terminal de un dominio Fc constante, opcionalmente a través de un enlazador de dominio. En aún otros constructos y secuencias como se indica en la presente descripción, se proporciona un dominio Fc constante que no se une a un primer fragmento de proteína o un segundo fragmento de proteína. Una proteína de fusión a Fc heterodimérica puede contener dos o más de las proteínas de dominio Fc monoméricas ilustrativas descritas en la presente descripción.

En consecuencia, en algunas modalidades, la presente invención proporciona proteínas de fusión a Fc heterodiméricas que dependen del uso de dos variantes de secuencias de Fc de la cadena pesada que serán autoensambladas para formar un polipéptido de fusión de dominio Fc heterodimérico que permite la unión de uno o más parejas, ligandos o receptores de unión. Los constructos de fusión Fc heterodiméricos se basan en la naturaleza autoensamblante de los dos dominios Fc de las cadenas pesadas de anticuerpos, por ejemplo, dos “monómeros” que se ensamblan en un “dímero”. Las fusiones Fc heterodiméricas se hacen al alterar la secuencia de aminoácidos de cada monómero, como se analiza en mayor detalle a continuación. Por lo tanto, la presente invención se dirige generalmente a la creación de proteínas de fusión a Fc heterodiméricas que se pueden coacoplar a parejas, ligandos o receptores de unión de diversas maneras, con ayuda de variantes de aminoácidos en las regiones constantes que son diferentes en cada cadena para promover la formación heterodimérica y/o permitir la facilidad de purificación de heterodímeros con respecto a los homodímeros.

1. Variantes de heterodimerización

Las proteínas de fusión heterodiméricas IL-15/Rα X NCPD-1-Fc incluyen dos dominios Fc diferentes (uno en cada uno del primer y segundo monómeros) que incluyen

modificaciones que facilitan la heterodimerización del primer y segundo monómeros y/o permiten la facilidad de purificación de heterodímeros sobre homodímeros, denominados en conjunto en la presente descripción “variantes de heterodimerización.” Como se analiza a continuación, las variantes de heterodimerización pueden incluir variantes sesgadas (por ejemplo, variantes que “sesgan” la formación de heterodímeros sobre homodímeros, descritas a continuación) así como “variantes de pI” que facilitan la separación de homodímeros de heterodímeros. Como se describe generalmente en la Patente de los Estados Unidos No. US 9,605,084, incorporada en la misma por referencia en su totalidad y específicamente como a continuación para la discusión de variantes de heterodimerización, los mecanismos adicionales útiles para la heterodimerización incluyen “botones y ojales” (“KIH”) como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. US 9,605,084, “direccionamiento electrostático” o “pares de carga” como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. US 9,605,084, variantes de pI como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. US 9,605,084 y variantes Fc generales adicionales como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 9,605,084 y a continuación.

a. Variantes sesgadas

En algunas modalidades, las proteínas de fusión heterodiméricas incluyen variantes sesgadas, que son una o más modificaciones de aminoácidos en un primer dominio Fc (A) y/o un segundo dominio Fc (B) que favorecen la formación de heterodímeros Fc (dímeros Fc que incluyen el primer y segundo dominio Fc; A-B) sobre homodímeros Fc (dímeros Fc que incluyen dos del primer dominio Fc o dos del segundo dominio Fc; A-A o B-B). Las variantes sesgadas adecuadas se incluyen en la Figura 29 de la solicitud de publicación de EE. UU. No. 2016/0355608, incorporada en la misma por referencia en su totalidad y específicamente para su divulgación de variantes sesgadas, así como en la Figura 4.

Un mecanismo para variantes sesgadas se denomina generalmente en la técnica “botones en ojales,” en referencia a la modificación por ingeniería genética de aminoácidos que crea influencias estéricas para favorecer la formación heterodimérica y desfavorecer la formación homodimérica, como se describe en el documento USSN 61/596,846, Ridgway y otros, Protein Engineering 9(7):617 (1996); Atwell y otros, J. Mol. Biol. 1997 270:26; la Patente de los Estados Unidos No. 8,216,805, todas incorporadas en la misma por referencia en su totalidad y específicamente para la divulgación de

mutaciones de “botones y ojales”. Esto es en algunas ocasiones denominado “variantes estéricas.” Las figuras identifican varios pares de “monómero A – monómero B” que dependen de “botones y ojales”. Además, como se describe en Merchant y otros, Nature Biotech. 16:677 (1998), estas mutaciones de “botones y ojales” pueden combinarse con puentes disulfuro para favorecer aún más la formación de heterodímeros Fc.

Un mecanismo adicional para variantes sesgadas que pueden usarse en la generación de heterodímeros es, en algunas ocasiones, denominado, “direccionamiento electrostático” como se describe en Gunasekaran y otros, J. Biol. Chem. 285(25):19637 (2010), incorporado en la presente por referencia en su totalidad. Esto es en algunas ocasiones denominado en la presente descripción “pares de carga.” En esta modalidad, se usa la electrostática para sesgar la formación hacia la heterodimerización. Como será evidente para los expertos en la técnica, también pueden tener un efecto en pI, y por lo tanto, en la purificación, y por ende, en algunos casos, también pueden considerarse variantes de pI. Sin embargo, debido a que se generaron para forzar la heterodimerización y no se usaron como herramientas de purificación, se clasifican como “variantes sesgadas”. Estas incluyen, pero no se limitan a, D221E/P228E/L368E apareadas con D221R/P228R/K409R (por ejemplo, estos son conjuntos correspondientes de “monómeros”) y C220E/P228E/368E apareadas con C220R/E224R/P228R/K409R.

En algunas modalidades, las variantes sesgadas favorecen ventajosa y simultáneamente la heterodimerización basada tanto en el mecanismo de “botones y ojales” como en el mecanismo de “direccionamiento electrostático”. En algunas modalidades, las proteínas de fusión heterodiméricas incluyen uno o más conjuntos de tales variantes sesgadas de heterodimerización. Las variantes sesgadas ilustrativas que entran en esta categoría incluyen: S364K/E357Q : L368D/K370S; L368D/K370S : S364K; L368E/K370S : S364K; T411T/E360E/Q362E : D401K; L368D/K370S : S364K/E357L; K370S : S364K/E357Q; o T366S/L368A/Y407V : T366W (opcionalmente incluye un puente disulfuro, T366S/L368A/Y407V/Y349C : T366W/S354C). Estas variantes vienen en “pares” de “conjuntos.” Es decir, un conjunto del par se incorpora en el primer monómero y el otro conjunto del par se incorpora en el segundo monómero. En términos de nomenclatura, el par “S364K/E357Q : L368D/K370S” significa que uno de los monómeros incluye un dominio Fc que incluye las sustituciones de aminoácidos S364K y E357Q y el otro monómero incluye un dominio Fc que incluye las sustituciones

de aminoácidos L368D y K370S; como anteriormente, el “tipo de cadena” de estos pares depende del pI inicial. Cabe señalar que estos conjuntos no se comportan necesariamente como variantes de “botones en ojales”, con una correspondencia uno a uno entre un residuo en un monómero y un residuo en el otro. Es decir, estos pares de conjuntos pueden formar una interfaz entre los dos monómeros que promueven la formación de heterodímeros y desfavorecen la formación de homodímeros, lo que permite que el porcentaje de heterodímeros que se forma espontáneamente en condiciones biológicas supere el 90 %, y no el 50 % esperado (25 % de homodímero A/A:50 % de heterodímero A/B:25 % de homodímero B/B). En la Figura 4 se representan variantes “sesgadas” de heterodimerización ilustrativas.

En modalidades ilustrativas, las proteínas de fusión heterodiméricas incluyen un S364K/E357Q : L368D/K370S; L368D/K370S : S364K; L368E/K370S : S364K; T411T/E360E/Q362E : D401K; L368D/K370S : S364K/E357L; K370S : S364K/E357Q; o un conjunto de sustitución de aminoácidos variante “sesgada” T366S/L368A/Y407V : T366W (que incluye opcionalmente un puente disulfuro, T366S/L368A/Y407V/Y349C: T366W/S354C). En una modalidad ilustrativa, la proteína de fusión de IL-15-Fc heterodimérica incluye un conjunto de sustitución de aminoácidos "S364K/E357Q: L368D/K370S".

En algunas modalidades, las variantes sesgadas proporcionadas en la presente descripción pueden incorporarse opcional e independientemente con cualquier otra modificación, que incluye, pero no se limita a, otras variantes sesgadas (véase, por ejemplo, en la Figura 37 de la solicitud de publicación de EE. UU. No. 2012/0149876, incorporado en la presente descripción como referencia, particularmente por su divulgación de variantes sesgadas), variantes de pI, variantes isotípicas, variantes FcRn, variantes de ablación, etc. en uno o ambos del primer y segundo dominios Fc de la proteína de fusión de IL-15-Fc. Además, las modificaciones individuales también pueden incluirse o excluirse independiente y opcionalmente de las proteínas de fusión de IL-15-Fc objeto.

b. Variantes de pI (punto isoeléctrico) para heterodímeros

En algunas modalidades, las proteínas de fusión heterodiméricas incluyen variantes de purificación que permiten ventajosamente la separación de proteínas de fusión heterodiméricas de proteínas homodiméricas.

Existen varios mecanismos básicos que pueden conducir a la facilidad de purificación de proteínas heterodiméricas. Uno de estos mecanismos se basa en el uso de variantes de pI que incluyen una o más modificaciones que afectan el punto isoeléctrico de uno o ambos de los monómeros de la proteína de fusión, de modo que cada monómero, y posteriormente cada especie dimérica, tiene un pI diferente, lo que permite así la purificación isoeléctrica de proteínas diméricas A-A, A-B y B-B. Alternativamente, algunos formatos también permiten la separación en función del tamaño. Como se describe en mayor detalle a continuación, también es posible “sesgar” la formación de heterodímeros sobre homodímeros mediante el uso de variantes sesgadas. Por tanto, una combinación de variantes sesgadas de heterodimerización y variantes de pI encuentran un uso particular en las proteínas de fusión de IL-15 objeto proporcionadas en la presente descripción.

Además, como se indica en mayor detalle a continuación, en dependencia del formato de la proteína de fusión a Fc heterodimérica, las variantes de pI pueden estar contenidas dentro de los dominios de región constante y/o Fc de un monómero, y/o pueden usarse enlazadores de dominio. En algunas modalidades, la proteína de fusión de IL-15-Fc heterodimérica incluye modificaciones adicionales para funcionalidades alternativas que también pueden crear cambios de pI, tales como variantes de Fc, FcRn y KO.

En las modalidades que utilizan pI como un mecanismo de separación para permitir la purificación de proteínas de fusión heterodiméricas, pueden introducirse modificaciones de aminoácidos en uno o ambos monómeros de la proteína de fusión heterodimérica. Es decir, el pI de uno de los monómeros (denominado en la presente descripción para simplificar "monómero A") puede modificarse por ingeniería genética sin el monómero B, o pueden cambiarse los monómeros A y B, con aumento del pI del monómero A y disminución del pI del monómero B. Como se analiza, los cambios de pI de uno o ambos monómeros pueden realizarse por eliminación o adición de un residuo cargado (por ejemplo, un aminoácido neutro se reemplaza con un residuo de aminoácido con carga positiva o negativa, por ejemplo, glutamina a ácido glutámico), al cambiar un residuo con carga positiva o negativa a la carga contraria (por ejemplo, ácido aspártico a lisina) o cambiar un residuo cargado a un residuo neutro (por ejemplo, pérdida de una carga; lisina a serina). Varias de estas variantes se muestran en las figuras, incluidas, las Figuras 4 y 5.

Crear un suficiente cambio en el pI en al menos uno de los monómeros de modo que los heterodímeros puedan separarse de los homodímeros, puede realizarse mediante el uso de una región constante de cadena pesada “de tipo salvaje” y una región variante que se ha modificado por ingeniería genética para aumentar o disminuir su pI (wt A : B+ o wt A : B-), o mediante el aumento de una región y la disminución de la otra región (A+ : B- o A- : B+).

Por lo tanto, en general, un componente de algunas modalidades de las presentes proteínas de fusión objeto son variantes de aminoácidos en los dominios Fc o regiones de dominio constante que se dirigen a alterar el punto isoeléctrico (pI) de al menos uno, o ambos, de los monómeros de una proteína dimérica al incorporar sustituciones de aminoácidos (“variantes de pI” o “sustituciones de pI”) en uno o ambos monómeros. La separación de los heterodímeros de los dos homodímeros puede lograrse si los pI de los dos monómeros difieren en tan solo 0,1 unidades de pH, con 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 o más, todo lo cual encuentra uso en la presente invención.

Como apreciarán los expertos en la técnica, la cantidad de variantes de pI que deben incluirse en cada monómero o en ambos de una proteína de fusión heterodimérica para lograr buena separación dependerá, en parte, del pI inicial de los componentes. Es decir, para determinar qué monómero modificar por ingeniería genética o en qué “dirección” (por ejemplo, más positiva o más negativa), se calculan las secuencias de los dominios Fc y cualquier complejo IL-15 o enlazador incluidos en cada monómero y se toma una decisión a partir de ahí basado en los pI de los monómeros. Como se conoce en la técnica, diferentes dominios Fc, enlazadores y complejos de IL-15 tendrán diferentes pI de inicio. En general, como se indica en la presente descripción, los pI se modifican por ingeniería genética para producir una diferencia en pI total de cada monómero de al menos aproximadamente 0,1 log, en donde se prefiere 0,2 a 0,5 como se describe en la presente descripción.

En general, como apreciarán los expertos en la técnica, existen dos categorías generales de modificaciones de aminoácidos que afectan el pI: aquellas que aumentan el pI de la proteína (cambios básicos) y aquellas que disminuyen el pI de la proteína (cambios ácidos). Como se describe en la presente descripción, pueden usarse todas las combinaciones de estas variantes: un monómero puede incluir un dominio Fc de tipo salvaje, o una variante de dominio Fc que no muestra un pI significativamente diferente al tipo salvaje y el otro monómero incluye un dominio Fc que es más básico o más ácido.

Alternativamente, cada monómero puede cambiarse, uno a más básico y uno a más ácido.

En el caso donde se usan variantes de pI para lograr la heterodimerización, se proporciona un enfoque más modular para diseñar y purificar proteínas de fusión heterodiméricas. Por lo tanto, en algunas modalidades, las variantes de heterodimerización (que incluyen variantes sesgadas y de pI) se deben modificar por ingeniería genética. Además, en algunas modalidades, la posibilidad de inmunogenicidad que resulta de las variantes de pI se reduce significativamente al importar variantes de pI de diferentes isotipos de IgG de modo que el pI se cambia sin introducir inmunogenicidad significativa (véase las variantes isotípicas a continuación). Por lo tanto, un problema adicional que se debe resolver es elucidar los dominios constantes de bajo pI con alto contenido de secuencias humanas, por ejemplo, minimizar o evitar residuos no humanos en cualquier posición particular. Alternativamente o además de las sustituciones isotípicas, la posibilidad de inmunogenicidad resultante de las variantes de pI se reduce significativamente al utilizar sustituciones isostéricas (por ejemplo, Asn a Asp; y Gln a Glu).

Un beneficio secundario que puede ocurrir con esta modificación por ingeniería genética de pI también es la extensión de la vida media en suero y el aumento de la unión a FcRn. Es decir, como se describe en la solicitud de publicación de EE. UU. No. US 2012/0028304 (incorporado por referencia en su totalidad y específicamente para la divulgación de variantes de pI que proporcionan una función adicional), la reducción del pI de los dominios constantes de anticuerpos (que incluye los que se encuentran en las fusiones de Fc) puede conducir a una retención en suero más prolongada in vivo. Estas variantes de pI para aumentar la vida media en suero también facilitan los cambios de pI para la purificación.

Además, cabe destacar que las variantes de pI de las variantes de heterodimerización proporcionan un beneficio adicional para el análisis y proceso de control de calidad de proteínas de fusión a Fc, como la capacidad para eliminar, minimizar y distinguir cuando los homodímeros están presentes es significativa. De manera similar, la capacidad para probar de manera confiable la reproducibilidad de la producción de proteínas de fusión a Fc heterodiméricas es importante.

Las combinaciones ilustrativas de variantes de pI se muestran en las Figuras 4 y 5, y en la Figura 30 de la solicitud de publicación de EE. UU. No. 2016/0355608, todos los cuales se incorporan en la presente descripción por referencia en su totalidad y específicamente para la divulgación de variantes de pI. Como se indica en la presente descripción y se muestra en las figuras, estos cambios se muestran con respecto a IgG1, pero todos los isotipos pueden alterarse de esta manera, así como los híbridos de isotipos. En el caso donde el dominio constante de la cadena pesada es de IgG2-4, también pueden usarse R133E y R133Q.

En una modalidad, las proteínas de fusión heterodiméricas incluyen un monómero con un dominio Fc variante que tiene modificaciones de variantes de pI 295E/384D/418E/421D (Q295E/N384D/Q418E/N421D en relación con la IgG1 humana). En una modalidad, las proteínas de fusión heterodiméricas incluyen un monómero con una variante de dominio Fc que tiene modificaciones de variantes de pI 217R/228R/276K (P217R/P228R/N276K en relación con la IgG1 humana). En la Figura 5 se representa una modificación de la variante de pI ilustrativa adicional que se puede incorporar en el dominio Fc de un sujeto.

En algunas modalidades, se realizan mutaciones en la bisagra del dominio Fc, que incluye las posiciones 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229 y 230 en base a la numeración de EU. Por lo tanto, las mutaciones de pI y particularmente las sustituciones pueden realizarse en una o más de las posiciones 216-230, con 1, 2, 3, 4 o 5 mutaciones que encuentran uso. De nuevo, se contemplan todas las combinaciones posibles, solas o con otras variantes de pI en otros dominios.

Las sustituciones específicas que encuentran uso para disminuir los dominios de pI de bisagra incluyen, pero no se limitan a, una eliminación en la posición 221, una valina o treonina no nativa en la posición 222, una eliminación en la posición 223, un ácido glutámico no nativo en posición 224, una eliminación en la posición 225, una eliminación en la posición 235 y una eliminación o una alanina no nativa en la posición 236. En algunos casos, solo se realizan sustituciones de pI en el dominio bisagra, y en otros, estas sustituciones se añaden a otras variantes de pI en otros dominios en cualquier combinación.

En algunas modalidades, pueden realizarse mutaciones en la región CH2, que incluye las posiciones 233, 234, 235, 236, 274, 296, 300, 309, 320, 322, 326, 327, 334 y 339 en

base a la numeración de EU. Cabe señalar que pueden realizarse cambios en 233-236 para aumentar la función efectora (junto con 327A) en la estructura principal de IgG2. De nuevo, pueden realizarse todas las combinaciones posibles de estas 14 posiciones; por ejemplo, una proteína de fusión de IL-15-Fc un anticuerpo de pI puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de pI en CH2.

Las sustituciones específicas que encuentran uso para disminuir el pI de los dominios CH2 incluyen, pero no se limitan a, una glutamina o ácido glutámico no nativos en la posición 274, una fenilalanina no nativa en la posición 296, una fenilalanina no nativa en la posición 300, una valina no nativa en la posición 309, un ácido glutámico no nativo en la posición 320, un ácido glutámico no nativo en la posición 322, un ácido glutámico no nativo en la posición 326, una glicina no nativa en la posición 327, un ácido glutámico no nativo en la posición 334, una treonina no nativa en la posición 339 y todas las combinaciones posibles dentro de CH2 y con otros dominios.

En esta modalidad, las mutaciones pueden seleccionarse independiente y opcionalmente de las posiciones 355, 359, 362, 384, 389, 392, 397, 418, 419, 444 y 447 (numeración de EU) de la región CH3. Las sustituciones específicas que encuentran uso para disminuir el pI de los dominios CH3 incluyen, pero no se limitan a, una glutamina o ácido glutámico no nativos en la posición 355, una serina no nativa en la posición 384, una asparagina o ácido glutámico no nativos en la posición 392, una metionina no nativa en la posición 397, un ácido glutámico no nativo en la posición 419, un ácido glutámico no nativo en la posición 359, un ácido glutámico no nativo en la posición 362, un ácido glutámico no nativo en la posición 389, un ácido glutámico no nativo en la posición 418, un ácido glutámico no nativo en la posición 444 y una eliminación o un ácido aspártico no nativo en la posición 447.

c. Variantes isotípicas

Además, algunas modalidades de las proteínas de fusión dependen de la“importación” de aminoácidos pI en posiciones particulares de un isotipo de IgG en otro y así reducen o eliminan la posibilidad de que se introduzca inmunogenicidad no deseada en las variantes. Se muestran varias de estas en la Figura 21 de la solicitud de publicación de EE. UU. No. 2014/0370013, incorporada en la misma como referencia, particularmente por su divulgación de variantes isotípicas. Es decir, la IgG1 es un isotipo común para anticuerpos terapéuticos por diversas razones, que incluyen función efectora alta. Sin embargo, la región constante pesada de IgG1 tiene un mayor pI que aquella de IgG2

(8,10 frente a 7,31). Mediante la introducción de residuos de IgG2 en posiciones particulares en la estructura principal de IgG1, el pI del monómero resultante se reduce (o aumenta) y también exhibe una vida media en suero más larga. Por ejemplo, la IgG1 tiene una glicina (pI 5,97) en la posición 137, y la IgG2 tiene un ácido glutámico (pI 3,22); al importar el ácido glutámico se afectará el pI de la proteína resultante. Como se describe a continuación, generalmente se requieren varias sustituciones de aminoácidos para afectar significativamente el pI de la variante de proteína de fusión a Fc. No obstante, cabe destacar que, como se analiza a continuación, los cambios equitativos en las moléculas de IgG2 permiten el aumento de la vida media en suero.

En otras modalidades, se realizan modificaciones de aminoácidos no isotípicos, ya sea para reducir el estado de carga general de la proteína resultante (por ejemplo, al cambiar un aminoácido de mayor pI por un aminoácido de menor pI), o para permitir adaptaciones en la estructura con fines de estabilidad, etc. como se describe en mayor detalle a continuación.

Además, mediante la modificación por ingeniería genética del pI de los dominios constantes pesado y ligero, pueden observarse modificaciones significativas en cada monómero del heterodímero. Como se analiza en la presente descripción, al tener los pI de los dos monómeros que difieren por al menos 0,5, esto puede permitir la separación mediante cromatografía de intercambio iónico o focalización isoeléctrica, u otros métodos sensibles al punto isoeléctrico.

d. Cálculo del pI

El pI de cada monómero puede depender del pI de la variante del dominio constante de cadena pesada y el pI del monómero total, que incluyen la variante del dominio constante de cadena pesada y la pareja de fusión. Por lo tanto, en algunas modalidades, el cambio en pI se calcula en función de la variante del dominio constante de cadena pesada, mediante el uso del cuadro de la Figura 19 de la solicitud de publicación de EE. UU. No. 2014/0370013. Como se analiza en la presente descripción, el monómero que se debe someter a modificación por ingeniería genética está determinado generalmente por el pI inherente de cada monómero.

e. Las variantes de pI que también confieren mejor la unión in vivo a FcRn

En el caso donde la variante de pI disminuye el pI del monómero, puede tener el beneficio adicional de mejorar la retención de suero in vivo.

Aunque todavía se encuentran bajo estudio, se considera que las regiones Fc tienen vida media in vivo más larga, ya que la unión a FcRn a pH 6 en un endosoma aísla el Fc (Ghetie y Ward, 1997 Immunol Today. 18(12): 592-598, incorporado en su totalidad por referencia). El compartimento endosómico luego recicla el Fc en la superficie celular. Una vez que el compartimento se abre al espacio extracelular, el pH más alto, ~7,4, induce la liberación de Fc nuevamente en la sangre. En ratones, Dall' Acqua y otros demostraron que los mutantes Fc con mayor unión a FcRn a pH 6 y pH 7,4 realmente tenían concentraciones séricas reducidas y la misma vida media que Fc de tipo salvaje (Dall' Acqua y otros 2002, J. Immunol. 169:5171-5180, incorporado en su totalidad por referencia). Se cree que el aumento de la afinidad de Fc por FcRn a pH 7,4 prohíbe la liberación de Fc nuevamente en la sangre. Por lo tanto, las mutaciones Fc que aumentan la vida media in vivo de Fc idealmente aumentarán la unión a FcRn a menor pH y, a la vez, permitirán la liberación de Fc a mayor pH. El aminoácido histidina cambia su estado de carga en el rango de pH de 6,0 a 7,4. Por lo tanto, no es llamativo encontrar residuos de His en posiciones importantes en el complejo Fc/FcRn.

2. Variantes de Fc adicionales para funcionalidad adicional

Además de las variantes de aminoácidos de pI, existen varias modificaciones útiles de aminoácidos de Fc que pueden realizarse por diversas razones, que incluyen, pero no se limitan a, alterar la unión a uno o más receptores de FcγR, alterar la unión a receptores de FcRn, etc.

En consecuencia, las proteínas de la invención pueden incluir modificaciones de aminoácidos, que incluyen las variantes de heterodimerización como se indica en la presente descripción, que incluyen las variantes de pI y las variantes estéricas. Cada conjunto de variantes se puede incluir o excluir independiente y opcionalmente de cualquier proteína heterodimérica particular.

a. Variantes de FcγR

En consecuencia, existen varias sustituciones útiles de Fc que pueden realizarse para alterar la unión a uno o más de los receptores FcγR. Tanto las sustituciones que resultan en mayor unión como las que producen menor unión pueden ser útiles. Por ejemplo, se sabe que la mayor unión a FcγRIIIa produce el aumento de ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos; la reacción mediada por células en donde las células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen el anticuerpo

unido en una célula diana y, posteriormente, provocan la lisis de la célula diana). De manera similar, la menor unión a FcγRIIb (un receptor inhibidor) también puede ser beneficiosa en algunas circunstancias. Las sustituciones de aminoácidos que encuentran uso en la presente invención incluyen las enumeradas en el documento USSN 11/124,620 (en particular, la Figura 41), 11/174,287, 11/396,495, 11/538,406, todas las cuales se incorporan expresamente en la presente por referencia en su totalidad y específicamente para las variantes allí divulgadas. Las variantes particulares que encuentran uso incluyen, pero no se limitan a, 236A, 239D, 239E, 332E, 332D, 239D/332E, 267D, 267E, 328F, 267E/328F, 236A/332E, 239D/332E/330Y, 239D, 332E/330L, 243A, 243L, 264A, 264V y 299T.

Además, las sustituciones de aminoácidos que aumentan la afinidad por FcγRIIc también pueden incluirse en las variantes del dominio Fc como se indica en la presente descripción. Son útiles las sustituciones descritas en, por ejemplo, el documento USSN 11/124,620 y 14/578,305.

Además, existen sustituciones adicionales de Fc que encuentran uso en la mayor unión al receptor FcRn y la mayor vida media en suero, como se divulga específicamente en el documento USSN 12/341,769, incorporada en la misma por referencia en su totalidad, que incluyen, pero no se limitan a, 434S, 434A, 428L, 308F, 259I, 428L/434S, 259I/308F, 436I/428L, 436I o V/434S, 436V/428L y 259I/308F/428L.

b. Variantes de ablación

De manera similar, otra categoría de variantes funcionales son las "variantes de ablación de FcγR" o variantes "de desactivación génica de Fc (FcKO o KO)". En estas modalidades, para algunas aplicaciones terapéuticas, es conveniente reducir o eliminar la normal unión del dominio Fc a uno o más o todos los receptores de Fcγ (por ejemplo, FcγR1, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa, etc.) para evitar mecanismos de acción adicionales. Es decir, por ejemplo, en muchas modalidades, particularmente en el uso de anticuerpos inmunomoduladores biespecíficos deseables para remover la unión de FcγRIIIa para eliminar o reducir significativamente la actividad de ADCC de modo que uno de los dominios Fc comprenda una o más variantes de ablación del receptor de Fcγ. Estas variantes de ablación se representan en la Figura 31 del documento USSN 15/141,350, las cuales se incorporan en la presente por referencia en su totalidad, y cada una se puede incluir o excluir independiente y opcionalmente, con aspectos preferidos que utilizan variantes de ablación seleccionadas del grupo que consiste de G236R/L328R,

E233P/L234V/L235A/G236del/S239K, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, E233P/L234V/L235A/G236del/S239K/A327G, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/A327G y E233P/L234V/L235A/G236del, de acuerdo con el índice EU. Debe observarse que las variantes de ablación referidas en la presente descripción remueven la unión a FcγR, pero generalmente no eliminan la unión a FcRn.

Se proporcionan modalidades ilustrativas de las variantes de pI en las figuras que incluyen la Figura 5.

3. Combinación de variantes heterodiméricas y Fc

Como apreciarán los expertos en la técnica, todas las variantes de heterodimerización indicadas (que incluyen variantes sesgadas y/o de pI) se pueden combinar opcional e independientemente de cualquier manera, siempre que conserven su “tipo de cadena” o “partición monomérica”. Además, todas estas variantes pueden combinarse en cualquiera de los formatos de heterodimerización.

En el caso de variantes de pI, si bien las modalidades que encuentran uso en particular se muestran en las figuras, pueden generarse otras combinaciones, después de la regla básica de alterar la diferencia de pI entre dos monómeros para facilitar la purificación.

Además, cualquiera de las variantes de heterodimerización, sesgadas y de pI, también se combinan independiente y opcionalmente con variantes de ablación de Fc, variantes de Fc, variantes de FcRn, como se indica de manera general en la presente descripción.

Además, un dominio Fc monomérico puede comprender un conjunto de sustituciones de aminoácidos que incluye C220S/S267K/L368D/K370S o C220S/S267K/S364K/E357Q.

Además, las proteínas de fusión a Fc heterodiméricas pueden comprender variantes sesgadas (por ejemplo, un conjunto de sustituciones de aminoácidos como se muestra en las Figuras 1A-1C del documento USSN 15/141,350, las cuales se incorporan en la presente descripción por referencia en su totalidad), donde las variantes sesgadas particularmente útiles se seleccionan del grupo que consiste de S364K/E357Q : L368D/K370S; L368D/K370S : S364K; L368E/K370S : S364K; T411T/E360E/Q362E : D401K; L368D/K370S : S364K/E357L, K370S : S364K/E357Q, T366S/L368A/Y407V : T366W y T366S/L368A/Y407V/Y349C : T366W/S354C, opcionalmente variantes de

ablación, opcionalmente enlazadores de dominio cargados y la cadena pesada comprende variantes de pI.

En algunas modalidades, el dominio Fc que comprende una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de: 236R, 239D, 239E, 243L, M252Y, V259I, 267D, 267E, 298A, V308F, 328F, 328R, 330L, 332D, 332E, M428L, N434A, N434S, 236R/328R, 239D/332E, M428L, 236R/328F, V259I/V308F, 267E/328F, M428L/N434S, Y436I/M428L, Y436V/M428L, Y436I/N434S, Y436V/N434S, 239D/332E/330L, M252Y/S254T/T256E, V259I/V308F/M428L, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, G236R/L328R y PVA/S267K. En algunos casos, el dominio Fc comprende la sustitución de aminoácido 239D/332E. En otros casos, el dominio Fc comprende la sustitución de aminoácido G236R/L328R o PVA/S267K.

En una modalidad, una combinación particular de las variantes sesgadas y de pI que se utilizan en la presente invención es T366S/L368A/Y407V : T366W (que incluye opcionalmente un puente disulfuro, T366S/L368A/Y407V/Y349C : T366W/S354C) con un monómero comprende Q295E/N384D/Q418E/N481D y el otro es un enlazador de dominios cargado positivamente. Como se apreciará en el estado de la técnica, las variantes de “botones en ojales” no cambian de pI y, por lo tanto, pueden usarse en cualquier monómero.

En una modalidad, una combinación particular de variantes sesgadas y de pI que encuentra uso en la presente invención es L368D/K370S : S364K/E357Q con un monómero que comprende Q295E/N384D/Q418E/N421D.

En las Figuras 4A-4E se proporcionan pares útiles de conjuntos de variantes de dimerización de Fc (que incluyen variantes sesgadas y de pI). En la Figura 5 se proporcionan variantes de pI adicionales. En la Figura 6 se proporcionan variantes de ablación útiles. En las Figuras 7A-7E y 8A-8F se proporcionan modalidades útiles de los componentes que no son citocina de las proteínas de fusión heterodiméricas IL-15/Rα x ABD anti-PD1 de la presente invención.

D. Enlazadores de dominios

Los tres componentes de la invención, el Fv anti-PD-1, el complejo Il-15/Rα y los dominios Fc de heterodimerización de la invención se unen opcionalmente entre sí mediante el uso de enlazadores de dominio. Si bien puede realizarse un enlace covalente directo (por ejemplo, unir el C-terminal del complejo IL-15 con el N-terminal

del dominio CH2 del dominio Fc), en general, se usan conectores que proporcionan flexibilidad y, a veces, función.

En algunas modalidades, una proteína IL-15 está unida al N-terminal de un dominio Fc, y una proteína IL-15Rα está unida al N-terminal de la proteína IL-15. En otras modalidades, una proteína IL-15Rα está unida al N-terminal de un dominio Fc y la proteína IL-15Rα está unida de manera no covalente a una proteína IL-15. En incluso otras modalidades, una proteína IL-15Rα está unida al C-terminal de un dominio Fc y la proteína IL-15Rα está unida de manera no covalente a una proteína IL-15.

En algunas modalidades, la proteína IL-15 y la proteína IL-15Rα están unidas entre sí a través de un enlazador (por ejemplo, un formato “scIL-15/Rα”). Opcionalmente, las proteínas no están unidas a través de un enlazador, y utilizan un autoensamblaje nativo o puentes disulfuro como se indica en la presente descripción. En otras modalidades, la proteína IL-15 y la proteína IL-15Rα están unidas de manera no covalente. En algunas modalidades, la proteína IL-15 está unida a un dominio Fc a través de un enlazador. En ciertas modalidades, la proteína IL-15 está unida directamente a un dominio Fc, tal como sin un enlazador. En modalidades particulares, la proteína IL-15 está unida a un dominio Fc a través de una región bisagra o un fragmento de la misma. En otras modalidades, la proteína IL-15Rα está unida a un dominio Fc a través de un enlazador. En otras modalidades, la proteína IL-15Rα está unida directamente a un dominio Fc, tal como sin un enlazador. En modalidades particulares, la proteína IL-15Rα está unida a un dominio Fc a través de una región bisagra o un fragmento de la misma. Opcionalmente, no se usa un enlazador para unir la proteína IL-15 o la proteína IL-15Rα al dominio Fc.

En algunos casos, el ABD a PD-1 está unido covalentemente al N-terminal de un dominio Fc a través de un enlazador, tal como un enlazador de dominios. En algunas modalidades, el ABD a PD-1 está unido directamente a un dominio Fc, tal como sin un enlazador. En modalidades particulares, el ABD a PD-1 se une a un dominio Fc a través de una región bisagra o un fragmento de la misma.

En algunas modalidades, el enlazador es un “enlazador de dominio”, usado para ligar dos dominios como se indica en la presente descripción. El péptido enlazador puede incluir principalmente los siguientes residuos de aminoácidos: Gly, Ser, Ala, o Thr. El péptido enlazador debe tener una longitud que es adecuada para unir dos moléculas de modo que asuman la conformación correcta con respecto a la otra, para que retengan

la actividad deseada. En una modalidad, el enlazador es de aproximadamente de 1 a 50 aminoácidos de longitud, preferentemente, de aproximadamente de 1 a 30 aminoácidos de longitud. En una modalidad, pueden usarse enlazadores de 1 a 20 aminoácidos de longitud, con de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 aminoácidos que encuentran uso en algunas modalidades. Los enlazadores útiles incluyen polímeros glicina-serina, que incluyen, por ejemplo, (GS)n (SEQ ID NO: XX), (GSGGS)n (SEQ ID NO: XX), (GGGGS)n (SEQ ID NO: XX), y (GGGS)n (SEQ ID NO: XX), donde n es un número entero de al menos uno (y generalmente, de 3 a 4) polímeros de glicina-alanina, polímeros alanina-serina y otros enlazadores flexibles. Alternativamente, una variedad de polímeros no proteicos, que incluyen, pero no se limita a, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol pueden encontrar uso como enlazadores, es decir, pueden encontrar uso como enlazadores.

Otras secuencias enlazadoras pueden incluir cualquier secuencia de cualquier longitud del dominio CL/CH1, pero no todos los residuos del dominio CL/CH1; por ejemplo, los primeros 5-12 residuos de aminoácidos de los dominios CL/CH1. Los enlazadores pueden derivarse de la cadena ligera de inmunoglobulina, por ejemplo, Cκ o Cλ. Los enlazadores pueden derivarse de cadenas pesadas de inmunoglobulina de cualquier isotipo, que incluyen, por ejemplo, Cγ1, Cγ2, Cγ3, Cγ4, Cα1, Cα2, Cδ, Cε y Cμ. Las secuencias de enlazadores también pueden derivarse de otras proteínas tales como proteínas similares a Ig (por ejemplo TCR, FcR, KIR), secuencias derivadas de la región bisagra, y otras secuencias naturales de otras proteínas.

En algunas modalidades, el enlazador scFv es un enlazador scFv cargado, varios de los cuales se muestran en la Figura 4A del documento US 62/353,511. En consecuencia, la presente invención proporciona además enlazadores scFv cargados, para facilitar la separación en pI entre un primer y un segundo monómero (por ejemplo, un monómero de IL-15/IL-15Rα y un monómero de ABD a PD-1). Es decir, al incorporar un enlazador scFv cargado, ya sea positivo o negativo (o ambos, en el caso de estructuras que usan scFv en diferentes monómeros), se permite que el monómero que comprende el enlazador cargado altere el pI sin realizar cambios adicionales en los dominios Fc. Estos enlazadores cargados pueden sustituirse en cualquier enlazador estándar que contiene scFv. Nuevamente, como apreciarán los expertos en la técnica, los enlazadores scFv cargados se usan en la “cadena” o monómero correctos, de acuerdo con los cambios

deseados en pI. Por ejemplo, como se analiza en la presente descripción, para elaborar el anticuerpo heterodimérico en formato triple F, se calcula el pI original de la región Fv para cada uno de los dominios de unión al antígeno deseados, y se elige uno para elaborar un scFv, y en dependencia del pI, se eligen enlazadores positivos o negativos.

Los enlazadores de dominios cargados también pueden usarse para aumentar la separación del pI de los monómeros de la invención y, por lo tanto, aquellos incluidos en la Figura 10 pueden usarse en cualquier modalidad de la presente descripción donde se utilice un enlazador.

IV. **Formatos útiles de la invención**

Como se muestra en las Figuras 28A-28H, existen varios formatos útiles de las proteínas de fusión a Fc IL-15/IL-15Rα(sushi) dirigidas a PD-1 de la invención. En general, las proteínas de fusión heterodiméricas de la invención tienen tres componentes funcionales: un componente IL-15/IL-15Rα(sushi), un componente anti-PD-1, y un componente Fc, cada uno de ellos puede tener diferentes formas como se indica en la presente descripción y cada uno de ellos puede combinarse con los otros componentes en cualquier configuración.

En cualquiera de los formatos anteriores, el primer y el segundo dominios Fc pueden tener un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste de a) S267K/L368D/K370S : S267K/LS364K/E357Q; b) S364K/E357Q : L368D/K370S; c) L368D/K370S : S364K; d) L368E/K370S : S364K; e) T411T/E360E/Q362E : D401K; f) L368D/K370S : S364K/E357L y g) K370S : S364K/E357Q, de acuerdo con la numeración de EU.

En algunas modalidades, el primer y/o el segundo dominios Fc tienen un conjunto adicional de sustituciones de aminoácidos que comprenden Q295E/N384D/Q418E/N421D, de acuerdo con la numeración de EU.

De manera opcional, el primer y/o el segundo dominios Fc tienen un conjunto adicional de sustituciones de aminoácidos que consiste G236R/L328R, E233P/L234V/L235A/G236del/S239K, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, E233P/L234V/L235A/G236del/S239K/A327G, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/A327G y E233P/L234V/L235A/G236del, de acuerdo con la numeración de EU.

Opcionalmente, el primer y/o segundo dominios Fc tienen variantes M428L/N434S para la extensión de la vida media. En algunas modalidades, el primer y/o segundo dominios Fc tienen variantes 428L/434S para la extensión de la vida media.

Por lo tanto, las variantes particularmente útiles para cualquiera de los siguientes formatos tienen el monómero positivo que comprende las variantes sesgadas S364K/E357Q y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y el monómero negativo que comprende las variantes sesgadas L368D/K370S, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y las variantes de pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D (cuando el monómero contiene un dominio CH1) o las variantes de pI Q295E/N384D/Q418E/N421D (cuando el monómero no contiene un dominio CH1).

A. scIL-15/Rα X scFv

Una modalidad se muestra en la Figura 28A, y comprende dos monómeros. Generalmente, esto se denomina “scIL-15/Rα X scFv”, con el “sc” que significa para “simple cadena” en referencia a la unión de la IL-15 y el dominio sushi mediante el uso de un enlazador covalente. El formato “scIL-15/Rα x scFv” (véase la Figura 28A) comprende IL-15Rα(sushi) fusionada a IL-15 mediante un enlazador de longitud variable (denominado “scIL-15/Rα”) que luego se fusiona al N-terminal de una región Fc heterodimérica, con un scFv fusionado al otro lado del Fc heterodimérico.

En el formato de la Figura 28A, algunos aspectos incluyen un dominio Fc con un monómero positivo que comprende las variantes sesgadas S364K/E357Q y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y el monómero negativo que comprende las variantes sesgadas L368D/K370S, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y las variantes de pI Q295E/N384D/Q418E/N421D y opcionalmente una variante de FcRn 428L/434S. En estas modalidades, el dominio sushi es de tipo salvaje (SEQ ID NO: 4) y el dominio Fv anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste de las combinaciones de dominios VH y VL de mAbC de H1.19_L1.140, H1_L1.1, H1.19_L1, H1.48_L1, H1.125_L1, H1.30_L1, H1.132_L1, H1_L1.1 H1_L1.3, H1_L1.45, H1_L1.117, H1_L1.129, H1.19_L1.1, H1.32_L1.1, H1.169_L1.1, H1.169_L1.1, H1.175_L1.1, H1.175_L1.1, H1_L1.140, H1_L1.135, H1_L1.136, H1.132_L1.135, H1.132_L1.140, H1.175_L1.135 y H1.175_L1.140.

En el formato de la Figura 28A, algunos aspectos incluyen un dominio Fc con un monómero positivo que comprende las variantes sesgadas S364K/E357Q y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y el monómero negativo que comprende las variantes sesgadas L368D/K370S, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y las variantes de pI Q295E/N384D/Q418E/N421D y opcionalmente una variante de FcRn 428L/434S. En estas modalidades, el dominio sushi es de tipo salvaje (SEQ ID NO: XX) y el dominio Fv anti-PD-1 es la combinación de dominios VH y VL de H1.19_L1.140 y el dominio de IL-15 comprende una variante seleccionada entre N4D/N65D, D30N/N65D y D30N/E64Q/N65D.

En el formato de la Figura 28A, algunos aspectos incluyen un dominio Fc con un monómero positivo que comprende las variantes sesgadas S364K/E357Q y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y el monómero negativo que comprende las variantes sesgadas L368D/K370S, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y las variantes de pI Q295E/N384D/Q418E/N421D y opcionalmente una variante de FcRn 428L/434S. En estas modalidades, el dominio sushi es de tipo salvaje (SEQ ID NO: XX) y el dominio Fv anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste de las combinaciones de dominios VH y VL de H1_L1.1 y el dominio IL-15 comprende una variante seleccionada entre N4D/N65D, D30N/N65D y D30N/E64Q/N65D.

B. scFv X ncIL-15/Rα

Esta modalidad se muestra en la Figura 28B y comprende tres monómeros. Generalmente, esto se denomina “ncIL-15/Rα X scFv” o “scFv X ncIL-15/Rα” y con el “nc” que significa para “no covalente” en referencia al autoensamblaje por unión no covalente de la IL-15 y el dominio sushi. El formato “scFv x ncIL-15/Rα” (véase la Figura 34B) comprende un scFv fusionado al N-terminal de una región Fc heterodimérica, con IL-15Rα(sushi) fusionada al otro lado del Fc heterodimérico, mientras que IL-15 se transfecta por separado de manera que se forma un complejo IL-15/Rα no covalente.

En el formato de la Figura 28B, algunos aspectos incluyen un dominio Fc con un monómero positivo que comprende las variantes sesgadas S364K/E357Q y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y el monómero negativo que comprende las variantes sesgadas L368D/K370S, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y las variantes de pI

Q295E/N384D/Q418E/N421D y opcionalmente una variante de FcRn 428L/434S. En estas modalidades, el dominio sushi es de tipo salvaje (SEQ ID NO: 4) y el dominio Fv anti-PD-1 es la combinación de dominios VH y VL de H1.19_L1.140 y el dominio de IL-15 comprende una variante seleccionada entre N4D/N65D, D30N/N65D y D30N/E64Q/N65D.

En el formato de la Figura 28B, algunos aspectos incluyen un dominio Fc con un monómero positivo que comprende las variantes sesgadas S364K/E357Q y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y el monómero negativo que comprende las variantes sesgadas L368D/K370S, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y las variantes de pI Q295E/N384D/Q418E/N421D y opcionalmente una variante de FcRn 428L/434S. En estas modalidades, el dominio sushi es de tipo salvaje (SEQ ID NO: 4) y el dominio Fv anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste de las combinaciones de dominios VH y VL de H1_L1.1 y el dominio IL-15 comprende una variante seleccionada entre N4D/N65D, D30N/N65D y D30N/E64Q/N65D.

C. scIL-15/Rα X Fab

Este formato preferido se muestra en la Figura 28C y comprende tres monómeros. Generalmente, esto se denomina “scIL-15/Rα X Fab” o “Fab X scIL-15/Rα”, usados indistintamente, con el “sc” que significa para “simple cadena”. El formato scIL-15/Rα x Fab (véase la Figura 28C) comprende IL-15Rα(sushi) fusionada a IL-15 mediante un enlazador de longitud variable (denominado “scIL-15/Rα”) que luego se fusiona al N-terminal de una región Fc heterodimérica (incluida de la bisagra). El segundo monómero es una cadena pesada, VH-CH1-bisagra-CH2-CH3, mientras que una cadena ligera correspondiente (el tercer monómero) se transfecta por separado para formar un Fab con el VH.

En el formato de la Figura 28C, algunas modalidades incluyen un dominio Fc con un monómero positivo que comprende las variantes sesgadas S364K/E357Q, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, las variantes de FcRn 428L/434S y el monómero negativo que comprende las variantes sesgadas L368D/K370S, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, las variantes de pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D y la variante de FcRn 428L/434S. En estas modalidades, el dominio sushi es de tipo salvaje (SEQ ID NO: 4) y el dominio Fv anti-PD-1 comprende un VH que comprende una sustitución de aminoácidos F32L en

comparación con SEQ ID NO: 5 y un VL que comprende las sustituciones de aminoácidos N27dH/K30Y/S93T en comparación con la SEQ ID NO: 6.

En el formato de la Figura 28C, algunas modalidades incluyen un dominio Fc con un monómero positivo que comprende las variantes sesgadas S364K/E357Q y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y el monómero negativo que comprende las variantes sesgadas L368D/K370S, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y las variantes de pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D. En estas modalidades, el dominio sushi es de tipo salvaje (SEQ ID NO: 4), el dominio Fv anti-PD-1 comprende un VH que comprende una sustitución de aminoácidos F32L en comparación con SEQ ID NO: 5 y un VL que comprende las sustituciones de aminoácidos N27dH/K30Y/S93T en comparación con la SEQ ID NO: 6 y el dominio de IL-15 comprende una variante seleccionada entre N4D/N65D, D30N/N65D y D30N/E64Q/N65D.

En el formato de la Figura 28C, algunas modalidades incluyen un dominio Fc con un monómero positivo que comprende las variantes sesgadas S364K/E357Q, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, la variante de FcRn 428L/434S y el monómero negativo que comprende las variantes sesgadas L368D/K370S, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y las variantes de pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D y la variante de FcRn 428L/434S. En estas modalidades, el dominio sushi es de tipo salvaje (SEQ ID NO: 4) y el dominio Fv anti-PD-1 es la combinación de dominios VH y VL de H1.19_L1.140 y el dominio de IL-15 comprende una variante seleccionada entre N4D/N65D, D30N/N65D y D30N/E64Q/N65D.

En el formato de la Figura 28C, algunas modalidades incluyen un dominio Fc con un monómero positivo que comprende las variantes sesgadas S364K/E357Q, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, la variante de FcRn 428L/434S y el monómero negativo que comprende las variantes sesgadas L368D/K370S, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y las variantes de pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D y la variante de FcRn 428L/434S. En estas modalidades, el dominio sushi es de tipo salvaje (SEQ ID NO: 4) y el dominio Fv anti-PD-1 es la combinación de dominios VH y VL de H1_L1.1 y el dominio de IL-15 comprende una variante seleccionada entre N4D/N65D, D30N/N65D y D30N/E64Q/N65D.

En el formato de la Figura 28C, algunas modalidades incluyen un dominio Fc un monómero positivo que comprende las variantes sesgadas S364K/E357Q y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y el monómero negativo que comprende las variantes sesgadas L368D/K370S, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y las variantes de pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D. En estas modalidades, el dominio sushi es de tipo salvaje (SEQ ID NO: 4) y el dominio Fv anti-PD-1 es la combinación de dominios VH y VL de H1.19_L1.140 y el dominio de IL-15 comprende una variante seleccionada entre N4D/N65D, D30N/N65D y D30N/E64Q/N65D.

En el formato de la Figura 28C, algunos aspectos incluyen un dominio Fc con un monómero positivo que comprende las variantes sesgadas S364K/E357Q y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y el monómero negativo que comprende las variantes sesgadas L368D/K370S, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y las variantes de pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D y opcionalmente una variante de FcRn 428L/434S. En estas modalidades, el dominio sushi es de tipo salvaje (SEQ ID NO: 4) y el dominio Fv anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste de las combinaciones de dominios VH y VL de H1_L1.1 y el dominio IL-15 comprende una variante seleccionada entre N4D/N65D, D30N/N65D y D30N/E64Q/N65D.

Las secuencias de aminoácidos de la proteína de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a PD-1 no competitiva ilustrativa del formato scIL-15/Rα x Fab (Figura 28C) se proporcionan en las Figuras 30, 48, 49 y 68.

En algunas modalidades, el primer monómero comprende, del N- al C-terminal, el dominio sushi-enlazador de dominio-variante de IL-15-dominio enlazador-CH2-CH3, y el segundo monómero comprende una cadena pesada, VH-CH1-bisagra-CH2-CH3. El tercer monómero es una cadena ligera, VL-CL. Las combinaciones preferidas de variantes de esta forma de modalidad se encuentran en la Figura 7C del documento PCT/US2017/056826.

En el formato scIL-15/Rα X Fab, una modalidad preferida utiliza el par de variantes sesgadas S364K/E357Q : L368D/K370S.

En el formato scIL-15/Rα X Fab, una modalidad preferida utiliza las variantes sesgadas S364K/E357Q (en el monómero de scFv-Fc) y L368D/K370S (en el monómero del

complejo de IL-15), las variantes de pI Q295E/N384D/Q418E/N421D (en el lado del complejo de IL-15), las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236_/S267K en ambos monómeros y, opcionalmente, las variantes 428L/434S en ambos lados.

D. ncIL-15/Rα X Fab

Esta modalidad se muestra en la Figura 28D y comprende tres monómeros. Generalmente, esto se denomina “ncIL-15/Rα X Fab” o “Fab X ncIL-15/Rα”, usados indistintamente, con el “nc” que significa para “no covalente” en referencia al autoensamblaje por unión no covalente de la IL-15 y el dominio sushi. El formato ncIL-15/Rα x Fab (véase la Figura 34D) comprende una VH fusionada al N-terminal de una región Fc heterodimérica, con IL-15Rα(sushi) fusionada al otro lado del Fc heterodimérico, mientras que una cadena ligera correspondiente se transfecta por separado para formar un Fab con la VH, y mientras que IL-15 se transfecta por separado de manera que se forma un complejo IL-15/Rα no covalente.

El primer monómero comprende, del N- al C-terminal, el dominio sushi-enlazador de dominio-CH2-CH3, y el segundo monómero comprende una cadena pesada, VH-CH1-bisagra-CH2-CH3. El tercer monómero es el domino de IL-15. En el formato ncIL-15/Rα X Fab, una modalidad preferida utiliza el par de variantes sesgadas S364K/E357Q : L368D/K370S.

En el formato de la Figura 28D, algunos aspectos incluyen un dominio Fc con un monómero positivo que comprende las variantes sesgadas S364K/E357Q y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y el monómero negativo que comprende las variantes sesgadas L368D/K370S, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y las variantes de pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D y opcionalmente una variante de FcRn 428L/434S. En estas modalidades, el dominio sushi es de tipo salvaje (SEQ ID NO: 4) y el dominio Fv anti-PD-1 es la combinación de dominios VH y VL de H1.19_L1.140 y el dominio de IL-15 comprende una variante seleccionada entre N4D/N65D, D30N/N65D y D30N/E64Q/N65D.

En el formato de la Figura 28D, algunos aspectos incluyen un dominio Fc con un monómero positivo que comprende las variantes sesgadas S364K/E357Q y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y el monómero negativo que comprende las variantes sesgadas L368D/K370S, las variantes de ablación

E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y las variantes de pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D y opcionalmente una variante de FcRn 428L/434S. En estas modalidades, el dominio sushi es de tipo salvaje (SEQ ID NO: 4) y el dominio Fv anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste de las combinaciones de dominios VH y VL de H1_L1.1 y el dominio IL-15 comprende una variante seleccionada entre N4D/N65D, D30N/N65D y D30N/E64Q/N65D.

E. mAb-scIL-15/Rα

Esta modalidad se muestra en la Figura 28E y comprende tres monómeros (aunque la proteína de fusión es un tetrámero). Generalmente, esto se denomina “mAb-scIL-15/Rα”, con el “sc” que significa para “simple cadena”. El formato mAb-scIL-15/Rα (véase la Figura 34E) comprende una VH fusionada al N-terminal de un primer y un segundo Fc heterodimérico, con IL-15 que se fusiona a la IL-15Rα(sushi) que luego se fusiona adicionalmente al C-terminal de una de la región Fc heterodimérica, mientras que las cadenas ligeras correspondientes se transfectan por separado para formar Fab con las VH.

En algunas modalidades, el primer monómero comprende una cadena pesada, VH-CH1-bisagra-CH2-CH3. El segundo monómero comprende una cadena pesada con un complejo de scIL-15, VH-CH1-bisagra-CH2-CH3-enlazador de dominio-dominio sushi-enlazador de dominio-IL-15. El tercer (y cuarto) monómero son cadenas ligeras, VL-CL. Generalmente, esto se denomina “mAb-scIL-15/Rα”, con el “sc” que significa para “simple cadena”. En el formato mAb-scIL-15/Rα, una modalidad preferida utiliza el par de variantes sesgadas S364K/E357Q : L368D/K370S.

En el formato de la Figura 28E, algunos aspectos incluyen un dominio Fc con un monómero positivo que comprende las variantes sesgadas S364K/E357Q y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y el monómero negativo que comprende las variantes sesgadas L368D/K370S, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y las variantes de pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D y opcionalmente una variante de FcRn 428L/434S. En estas modalidades, el dominio sushi es de tipo salvaje (SEQ ID NO: 4) y el dominio Fv anti-PD-1 es la combinación de dominios VH y VL de H1.19_L1.140 y el dominio de IL-15 comprende una variante seleccionada entre N4D/N65D, D30N/N65D y D30N/E64Q/N65D.

En el formato de la Figura 28E, algunos aspectos incluyen un dominio Fc con un monómero positivo que comprende las variantes sesgadas S364K/E357Q y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y el monómero negativo que comprende las variantes sesgadas L368D/K370S, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y las variantes de pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D y opcionalmente una variante de FcRn 428L/434S. En estas modalidades, el dominio sushi es de tipo salvaje (SEQ ID NO: 4) y el dominio Fv anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste de las combinaciones de dominios VH y VL de H1_L1.1 y el dominio IL-15 comprende una variante seleccionada entre N4D/N65D, D30N/N65D y D30N/E64Q/N65D.

F. mAb-ncIL-15/Rα

Esta modalidad se muestra en la Figura 28F y comprende cuatro monómeros (aunque la proteína de fusión heterodimérica es un pentámero). Generalmente, esto se denomina “mAb-ncIL-15/Rα”, con el “nc” que significa para “no covalente”. El formato mAb-ncIL-15/Rα (Figura 34F) comprende una VH fusionada al N-terminal de un primer y un segundo Fc heterodimérico, con IL-15Rα(sushi) fusionado al C-terminal de una de la región Fc heterodimérica, mientras que las cadenas ligeras correspondientes se transfectan por separado para formar Fab con las VH y mientras que IL-15 se transfecta por separado de manera que se forma un complejo IL-15/Rα no covalente.

En algunas modalidades, el primer monómero comprende una cadena pesada, VH-CH1-bisagra-CH2-CH3. El segundo monómero comprende una cadena pesada con un dominio de IL-15Rα(sushi), VH-CH1-bisagra-CH2-CH3-enlazador de dominios-dominio sushi. El tercer monómero es un domino de IL-15. El cuarto (y quinto) monómero son cadenas ligeras, VL-CL. En el formato mAb-scIL-15/Rα, una modalidad preferida utiliza el par de variantes sesgadas S364K/E357Q : L368D/K370S.

En el formato de la Figura 28F, algunos aspectos incluyen un dominio Fc con un monómero positivo que comprende las variantes sesgadas S364K/E357Q y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y el monómero negativo que comprende las variantes sesgadas L368D/K370S, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y las variantes de pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D y opcionalmente una variante de FcRn 428L/434S. En estas modalidades, el dominio sushi es de tipo salvaje (SEQ ID NO: 4) y el dominio Fv anti-PD-1 es la combinación de dominios VH y VL de H1.19_L1.140 y el

dominio de IL-15 comprende una variante seleccionada entre N4D/N65D, D30N/N65D y D30N/E64Q/N65D.

En el formato de la Figura 28F, algunos aspectos incluyen un dominio Fc con un monómero positivo que comprende las variantes sesgadas S364K/E357Q y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y el monómero negativo que comprende las variantes sesgadas L368D/K370S, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y las variantes de pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D y opcionalmente una variante de FcRn 428L/434S. En estas modalidades, el dominio sushi es de tipo salvaje (SEQ ID NO: 4) y el dominio Fv anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste de las combinaciones de dominios VH y VL de H1_L1.1 y el dominio IL-15 comprende una variante seleccionada entre N4D/N65D, D30N/N65D y D30N/E64Q/N65D.

G. Central-IL-15/Rα

Esta modalidad se muestra en la Figura 28G, y comprende cuatro monómeros que forman un tetrámero. Generalmente, esto se denomina “Central-IL-15/Rα”. El formato central-IL-15/Rα (véase la Figura 28G) comprende una VH fusionada de manera recombinante al N-terminal de IL-15 que luego se fusiona adicionalmente a un lado de un Fc heterodimérico y una VH fusionada de manera recombinante al N-terminal de IL-15Rα(sushi), que luego se fusiona adicionalmente al otro lado del Fc heterodimérico, mientras que las cadenas ligeras correspondientes se transfectan por separado para formar Fab con las VH.

En el formato de la Figura 28G, algunos aspectos incluyen un dominio Fc con un monómero positivo que comprende las variantes sesgadas S364K/E357Q y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y el monómero negativo que comprende las variantes sesgadas L368D/K370S, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y las variantes de pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D y opcionalmente una variante de FcRn 428L/434S. En estas modalidades, el dominio sushi es de tipo salvaje (SEQ ID NO: 4) y el dominio Fv anti-PD-1 es la combinación de dominios VH y VL de H1.19_L1.140 y el dominio de IL-15 comprende una variante seleccionada entre N4D/N65D, D30N/N65D y D30N/E64Q/N65D.

En el formato de la Figura 28G, algunos aspectos incluyen un dominio Fc con un monómero positivo que comprende las variantes sesgadas S364K/E357Q y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y el monómero negativo que comprende las variantes sesgadas L368D/K370S, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y las variantes de pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D y opcionalmente una variante de FcRn 428L/434S. En estas modalidades, el dominio sushi es de tipo salvaje (SEQ ID NO: 4) y el dominio Fv anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste de las combinaciones de dominios VH y VL de H1_L1.1 y el dominio IL-15 comprende una variante seleccionada entre N4D/N65D, D30N/N65D y D30N/E64Q/N65D.

H. Central scIL-15/Rα

Esta modalidad se muestra en la Figura 28H, y comprende cuatro monómeros que forman un tetrámero. Generalmente, esto se denomina “central-scIL-15/Rα”, con el “sc” que significa para “simple cadena”. El formato “central-scIL-15/Rα” (véase la Figura 34H) comprende una VH fusionada al N-terminal de IL-15Rα(sushi) que se fusiona a la IL-15 que luego se fusiona adicionalmente a un lado de un Fc heterodimérico y una VH fusionada al otro lado del Fc heterodimérico, mientras que las cadenas ligeras correspondientes se transfectan por separado para formar Fab con las VH.

En el formato de la Figura 28H, algunos aspectos incluyen un dominio Fc con un monómero positivo que comprende las variantes sesgadas S364K/E357Q y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y el monómero negativo que comprende las variantes sesgadas L368D/K370S, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y las variantes de pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D y opcionalmente una variante de FcRn 428L/434S. En estas modalidades, el dominio sushi es de tipo salvaje (SEQ ID NO: 4) y el dominio Fv anti-PD-1 es la combinación de dominios VH y VL de H1.19_L1.140 y el dominio de IL-15 comprende una variante seleccionada entre N4D/N65D, D30N/N65D y D30N/E64Q/N65D.

En el formato de la Figura 28H, algunos aspectos incluyen un dominio Fc con un monómero positivo que comprende las variantes sesgadas S364K/E357Q y las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y el monómero negativo que comprende las variantes sesgadas L368D/K370S, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y las variantes de pI

N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D y opcionalmente una variante de FcRn 428L/434S. En estas modalidades, el dominio sushi es de tipo salvaje (SEQ ID NO: 4) y el dominio Fv anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste de las combinaciones de dominios VH y VL de H1.19_L1.140 y el dominio de IL-15 comprende una variante seleccionada entre N4D/N65D, D30N/N65D y D30N/E64Q/N65D.

I. Formatos adicionales

Como apreciarán los expertos en la técnica, existen formatos adicionales que encuentran uso con los complejos de IL-15 y secuencias de Fv anti-PD-1 no competidoras. Así, por ejemplo, la invención proporciona proteínas de fusión que comprenden un complejo de IL-15 que comprende un dominio de IL-15 (que puede ser de tipo salvaje o una variante), un enlazador de dominio, una secuencia de IL-15R (que puede ser todo o parte del dominio extracelular y también puede incluir variantes) y un ABD anti-PD-1 no competitivo, ya sea como un Fab o un scFv.

V. **Modalidades útiles de la invención**

En la presente descripción se proporcionan proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 con una o más sustituciones de aminoácidos modificadas por ingeniería genética de la proteína IL-15 y ABD anti-PD-1 que no compiten por la unión con los anticuerpos anti-PD-1 seleccionados aprobados. En algunas modalidades, la variante de IL-15 de la proteína de fusión a Fc tiene sustituciones N4D/N65D. En algunas modalidades, la variante de IL-15 de la proteína de fusión a Fc tiene una sustitución D30N. En algunas modalidades, la variante de IL-15 de la proteína de fusión a Fc tiene sustituciones D30N/E64Q/N65D. En algunas modalidades, la variante de IL-15 de la proteína de fusión a Fc tiene sustituciones D30N/N65D. Dichas proteínas de fusión que contienen IL-15/Rα-Fc pueden inducir o promover la proliferación de células inmunitarias que incluyen células NK, células T $CD8^+$ y células T $CD4^+$. En particular, las proteínas de fusión que contienen IL-15/Rα-Fc que no tienen enlazador (por ejemplo, región bisagra solamente) en el lado Fc de IL-15 demostraron una actividad proliferativa más débil.

En la presente descripción se proporcionan proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 con menor potencia, farmacocinética aumentada y/o mayor vida media en suero. Las proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 descritas en la presente descripción se diseñaron por ingeniería genética para disminuir su potencia en comparación con un constructo parental. En algunas modalidades, se introdujeron una o más sustituciones de aminoácidos en el complejo IL-15/Rα y/o en el(los) dominio(s)

Fc de la proteína de fusión a Fc heterodimérica. En algunas modalidades, las proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 con potencia reducida en comparación con un constructo de control (por ejemplo, un constructo parental) tienen una vida media en suero sustancialmente más larga. En ciertas modalidades, la vida media en suero aumentó en 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 15x, 20x, 25x o más.

En la presente descripción se proporcionan proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 que mejoraron la GVHD en un modelo animal (por ejemplo, ratones NSG injertados con PBMC humanas) en comparación con la terapia combinada de una proteína de fusión de scIL-15/Rα-Fc de control modificada por ingeniería genética para reducir la potencia y un anticuerpo anti-PD-1. La administración de una proteína de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a PD-1 no competitiva ilustrativa produjo un efecto mayor en comparación con la combinación de IL-15 y bloqueo de PD-1.

Las proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 descritas en la presente descripción que incluyen las proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 no competitivas pueden inducir la fosforilación de STAT5 en células inmunitarias que incluyen, pero no se limitan a, linfocitos activados, células T activadas (por ejemplo, células T CD4+ activadas y células CD8+ activadas) y linfocitos infiltrantes de tumores activados (por ejemplo, TIL activados).

Una modalidad preferida utiliza el formato de la Figura 28C. Esta modalidad incluye: a) un dominio Fc con (i) un monómero positivo que comprende las variantes sesgadas S364K/E357Q, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y las variantes de FcRn 428L/434S; b), y (ii) un monómero negativo que comprende las variantes sesgadas L368D/K370S, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, las variantes de pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D y la variante de FcRn 428L/434S; b) el dominio sushi es de tipo salvaje (SEQ ID NO: 4); c) el dominio Fv anti-PD-1 comprende un VH que comprende una sustitución de aminoácidos F32L en comparación con SEQ ID NO: 5 un VL que comprende las sustituciones de aminoácidos N27dH/K30Y/S93T en comparación con la SEQ ID NO: 6 y d) el dominio de IL-15 es D30N/E64Q/N65D.

Una modalidad preferida adicional utiliza el formato de la Figura 28C. Esta modalidad incluye: a) un dominio Fc con (i) un monómero positivo que comprende las variantes sesgadas S364K/E357Q, las variantes de ablación

E233P/L234V/L235A/G236del/S267K y la variante de FcRn 428L/434S; (ii) un monómero negativo que comprende las variantes sesgadas L368D/K370S, las variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, las variantes de pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D y la variante de FcRn 428L/434S; b) el dominio sushi es de tipo salvaje (SEQ ID NO: 4); c) el dominio Fv anti-PD-1 es la combinación de dominios VH y VL de H1_L1.1 y d) el dominio de IL-15 comprende D30N/E64Q/N65D.

En algunas modalidades, las secuencias particularmente útiles para las proteínas de fusión de la invención se basan en las secuencias de la estructura principal de la Figura 11 para el formato de la Figura 34C. Estas son secuencias para dos monómeros, el “lado del complejo de IL-15” y el “lado Fab”, sin las secuencias del complejo de IL-15 ni la VH del Fab (las secuencias de la región constante de la cadena ligera están en la Figura 12).

Es decir, la invención proporciona secuencias de la estructura principal 1 en combinación con una secuencia VH y VL de la Figura 43.

VI. **Ácidos nucleicos de la invención**

La invención proporciona además composiciones de ácido nucleico que codifican las proteínas de fusión a Fc heterodiméricas de la invención (o, en el caso de una proteína de dominio Fc monomérico, los ácidos nucleicos que los codifican también).

Como apreciarán los expertos en la técnica, las composiciones de ácidos nucleicos dependerán del formato de la proteína de fusión a Fc IL-15/Rα heterodimérica. Por lo tanto, por ejemplo, cuando el formato requiere tres secuencias de aminoácidos, se pueden incorporar tres secuencias de ácidos nucleicos en uno o más vectores de expresión para la expresión. De manera similar, en algunos formatos solo se necesitan dos ácidos nucleicos; de nuevo, estos pueden ponerse en uno o dos vectores de expresión.

Como se conoce en la técnica, los ácidos nucleicos que codifican los componentes de la invención pueden incorporarse en vectores de expresión como se conoce en la técnica, y en dependencia de las células huésped usadas para producir las proteínas de fusión a Fc heterodiméricas de la invención. Generalmente, los ácidos nucleicos están unidos operativamente a cualquier número de elementos reguladores (promotores, origen de replicación, marcadores de selección, sitios de unión ribosomal, inductores,

etc.). Los vectores de expresión pueden ser extracromosomales o vectores de integración.

Los ácidos nucleicos y/o vectores de expresión de la invención se transforman luego en cualquier número de diferentes tipos de células huésped como bien se conoce en la técnica, que incluyen células de mamíferos, bacterianas, levadura, insectos y/u hongos, con las células de mamífero (por ejemplo, células CHO) que encuentran uso en muchas modalidades.

En algunas modalidades, los ácidos nucleicos que codifican cada monómero, según sea aplicable en dependencia del formato, los cuales están contenidos dentro de un único vector de expresión, en general bajo diferentes o los mismos controles de promotor. En modalidades de uso particular en la presente invención, cada uno de estos dos o tres ácidos nucleicos está contenido en un vector de expresión diferente.

La proteína de fusión a Fc heterodimérica de la invención se elabora mediante el cultivo de células huésped que comprenden los vectores de expresión como bien se conoce en la técnica. Una vez producidas, se llevan a cabo las etapas tradicionales de purificación de proteína de fusión o de anticuerpo, que incluyen una etapa de cromatografía de intercambio iónico. Como se analiza en la presente descripción, al tener los pI de los dos monómeros que difieren por al menos 0,5, esto puede permitir la separación mediante cromatografía de intercambio iónico o focalización isoeléctrica, u otros métodos sensibles al punto isoeléctrico. Es decir, la inclusión de sustituciones de pI que alteran el punto isoeléctrico (pI) de cada monómero, de manera que cada monómero tenga un pI diferente y el heterodímero también tenga un pI distinto, lo que facilita la purificación isoeléctrica del heterodímero (por ejemplo, columnas de intercambio aniónico, columnas de intercambio catiónico). Estas sustituciones también ayudan en la determinación y el monitoreo de cualquier homodímero contaminante después de la purificación (por ejemplo, geles de IEF, cIEF y columnas analíticas IEX).

VII. **Funcionalidad biológica y bioquímica del anticuerpo de punto de regulación inmunitario biespecífico x proteínas de fusión inmunomoduladoras heterodiméricas IL-15/IL-15Rα**

Generalmente, las proteínas de fusión a Fc de la invención se administran a pacientes con cáncer y la eficacia se evalúa de varias maneras descritas en la presente descripción. Por lo tanto, aunque pueden realizarse ensayos estándar de eficacia, tales

como carga de cáncer, tamaño del tumor, evaluación de la presencia o extensión de metástasis, etc.; también se pueden evaluar los tratamientos de inmunooncología en función de las evaluaciones del estado inmunitario. Esto se puede hacer de varias formas, que incluyen ensayos in vitro e in vivo. Por ejemplo, puede realizarse una evaluación de los cambios en el estado inmunológico (por ejemplo, presencia de células T ICOS+ CD4+ después del tratamiento con ipi) junto con mediciones "a la vieja usanza", tal como masa tumoral, tamaño, invasividad, participación de LN, metástasis, etc. Por lo tanto, puede evaluarse cualquiera o la totalidad de los siguientes: los efectos inhibidores de las proteínas de fusión sobre la activación o proliferación de células T $CD4^+$, la activación o proliferación de células T $CD8^+$ (CTL), la actividad citotóxica mediada por células T $CD8^+$ y/o el agotamiento celular mediado por CTL, la actividad de células NK y el agotamiento celular mediado por NK, los efectos potenciadores de las proteínas de fusión sobre la diferenciación y proliferación de células Treg y la tolerancia inmunitaria o la inmunosupresión mediada por Treg o células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), y/o los efectos de las proteínas de fusión sobre la producción de citocinas proinflamatorias por las células inmunitarias, por ejemplo, la producción de IL-2, IFN-γ o TNF-α por parte de células T u otras células inmunitarias.

En algunas modalidades, la evaluación del tratamiento se realiza al evaluar la proliferación de células inmunitarias, mediante el uso de, por ejemplo, el método de dilución CFSE, la tinción intracelular Ki67 de las células inmunitarias efectoras y los método de incorporación de ^{3}H-timidina.

En algunas modalidades, la evaluación del tratamiento se realiza al evaluar el aumento en la expresión génica o los niveles aumentados de proteína de los marcadores asociados a la activación, que incluyen uno o más de: CD25, CD69, CD137, ICOS, PD1, GITR, OX40 y la desgranulación celular medida por la expresión superficial de CD107A.

En general, los ensayos de expresión génica se realizan como se conoce en la técnica.

En general, las mediciones de la expresión de proteína se realizan de manera similar como se conoce en la técnica.

En algunas modalidades, se realiza la evaluación del tratamiento al evaluar la actividad citotóxica medida mediante la detección de la viabilidad de las células diana a través de la estimación de numerosos parámetros celulares tales como la actividad enzimática (que incluye la actividad de proteasa), la permeabilidad de la membrana celular, la

adherencia celular, la producción de ATP, la producción de coenzimas y la actividad de captación de nucleótidos. Los ejemplos específicos de estos ensayos incluyen, pero no se limitan a, tinción con azul tripán o PI, método de liberación de ^{51}Cr o ^{35}S, actividad de LDH, ensayos de MTT y/o WST, ensayo de calceína-AM, ensayo de luminiscencia y otros.

En algunas modalidades, se realiza la evaluación del tratamiento al evaluar la actividad celular T medida por la producción de citocinas, ya sea intracelularmente en cultivo sobrenadante mediante el uso de citocinas que incluyen, pero no se limita a, IFNγ, TNFα, GM-CSF, IL2, IL6, IL4, IL5, IL10, IL13 que usan técnicas bien conocidas.

En consecuencia, la evaluación del tratamiento puede realizarse mediante el uso de ensayos que evalúan uno o más de los siguientes: (i) aumentos en la respuesta inmune, (ii) aumentos en la activación de las células T αβ y/o γδ, (iii) aumentos en la actividad de células T citotóxicas, (iv) aumentos en la actividad celular NK y/o NKT, (v) alivio de la supresión de las células T αβ y/o γδ, (vi) aumentos en la secreción de citocinas proinflamatorias, (vii) aumentos en la secreción de IL-2; (viii) aumentos en la producción de interferón-ɣ, (ix) aumentos en la respuesta de Th1, (x) reducciones en la respuesta de Th2, (xi) reducciones o eliminaciones de número y/o actividad celulares de al menos uno de las células T reguladoras (Treg).

A. Ensayos para medir la unión competitiva

En general, pueden realizarse ensayos de caracterización de epítopos tales como los descritos en la presente descripción, así como otros ensayos de inhibición competitiva tales como los conocidos en la técnica, para determinar si el Fv NCPD-1 competirá por la unión a PD-1 con anticuerpos aprobados. La caracterización de epítopos es un proceso que usa un inmunoensayo competitivo para probar anticuerpos de una manera combinatoria por pares, y los anticuerpos que compiten por la misma región de unión, es decir, el mismo epítopo o un epítopo estrechamente relacionado al antígeno, se agrupan en compartimentos. Por lo tanto, se considera un anticuerpo que se une a un epítopo diferente de nivolumab y/o pembrolizumab que no compite con nivolumab y/o pembrolizumab.

Los anticuerpos no competidores pueden determinarse mediante un ensayo en el que el anticuerpo o el fragmento inmunológicamente funcional que se prueba no previene o inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común.

Típicamente, tal ensayo implica el uso de antígeno purificado (por ejemplo, PD-1 o un dominio o fragmento del mismo) unido a una superficie sólida o células. La inhibición competitiva se mide al determinar la cantidad de un primer anticuerpo unido a la superficie sólida o células en presencia del segundo anticuerpo. Por lo general, cuando un anticuerpo competidor está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en al menos 30 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o 75 %. En algunos casos, la unión se inhibe en al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 97 % o más. Por el contrario, cuando el anticuerpo de referencia se une, preferentemente inhibirá la unión de un anticuerpo de prueba añadido posteriormente (es decir, un anticuerpo PD-1) en al menos 30 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o 75 %. En algunos casos, la unión del anticuerpo de prueba se inhibe en al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 97 % o más.

Generalmente, la caracterización o la unión competitiva puede determinarse mediante el uso de diversas técnicas reconocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, inmunoensayos tales como western blot, radioinmunoensayos, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayos en "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunorradiométricos, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A. Tales inmunoensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica (véase, Ausubel y otros, eds, (1994) Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York). Además, pueden usarse ensayos de bloqueo cruzado (véase, por ejemplo, WO 2003/48731; y Harlow y otros (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane).

Otras tecnologías usadas para determinar la inhibición competitiva (y, por tanto, los “contenedores”) incluyen: resonancia de plasmón superficial mediante el uso de, por ejemplo, el sistema BIAcore™ 2000 (GE Healthcare); interferometría de biocapa mediante el uso de, por ejemplo, un ForteBio® Octet RED (ForteBio); o matrices de perlas de citometría de flujo mediante el uso de, por ejemplo, un FACSCanto II (BD Biosciences) o un ensayo de detección multiplex LUMINEX™ (Luminex). En los ejemplos 2 y 7 de la presente descripción se proporciona un método particular para determinar la unión competitiva mediante el uso de interferometría de biocapa.

Luminex es una plataforma de inmunoensayo basada en perlas que permite el emparejamiento de anticuerpos multiplexados a gran escala. El ensayo compara los patrones de unión simultáneos de pares de anticuerpos con el antígeno diana. Un anticuerpo del par (mAb de captura) se une a perlas Luminex, en donde cada mAb de captura se une a una perla de un color diferente. El otro anticuerpo (mAb detector) se une a una señal fluorescente (por ejemplo, ficoeritrina (PE)). El ensayo analiza la unión (emparejamiento) simultánea de anticuerpos a un antígeno y agrupa anticuerpos con perfiles de emparejamiento similares. Perfiles similares de un mAb detector y un mAb de captura indican que los dos anticuerpos se unen al mismo epítopo o epítopos estrechamente relacionados. En una modalidad, los perfiles de apareamiento pueden determinarse mediante el uso de coeficientes de correlación de Pearson para identificar los anticuerpos que se correlacionan más estrechamente con cualquier anticuerpo particular en el panel de anticuerpos que se prueban. En modalidades, se determinará que un mAb de prueba/detector está en el mismo contenedor que un mAb de referencia/captura si el coeficiente de correlación de Pearson del par de anticuerpos es al menos 0,9. En otras modalidades, el coeficiente de correlación de Pearson es al menos 0,8, 0,85, 0,87 o 0,89. En modalidades adicionales, el coeficiente de correlación de Pearson es al menos 0,91, 0,92, 0,93, 0,94, 0,95, 0,96, 0,97, 0,98, 0,99 o 1. Otros métodos para analizar los datos obtenidos del ensayo Luminex se describen en la patente de EE. UU. No. 8,568,992. La capacidad de Luminex para analizar 100 tipos diferentes de perlas (o más) simultáneamente proporciona superficies de antígenos y/o anticuerpos casi ilimitadas, que resultan en un rendimiento y una resolución mejorados en el perfil de epítopos de anticuerpos sobre un ensayo de biosensor (Miller, y otros, 2011, PMID: 21223970).

De manera similar, las técnicas de caracterización que comprenden resonancia de plasmón superficial son compatibles con la presente invención. Como se usa en la presente descripción, “resonancia de plasmón superficial,” se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones específicas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz de biosensor. Mediante el uso de un equipo disponible comercialmente, tal como el sistema BIAcore™ 2000, puede determinarse fácilmente si los anticuerpos seleccionados compiten entre sí por unirse a un antígeno definido.

En otras modalidades, una técnica que puede usarse para determinar si un anticuerpo de prueba “compite” por unirse con un anticuerpo de referencia es la “interferometría de biocapa”, una técnica analítica óptica que analiza el patrón de interferencia de la luz blanca reflejada desde dos superficies: una capa de proteína inmovilizada en una punta de biosensor y una capa de referencia interna. Cualquier cambio en el número de moléculas unidas a la punta del biosensor provoca un cambio en el patrón de interferencia que puede medirse en tiempo real. Dichos ensayos de interferometría de biocapa pueden realizarse mediante el uso de una máquina ForteBio® Octet RED como sigue. Se captura un anticuerpo de referencia (Ab1) en un fragmento de captura anti-ratón, luego se usa una alta concentración de anticuerpo que no se une para bloquear el chip y se recolecta una línea de base. La proteína diana recombinante monomérica luego se captura por el anticuerpo específico (Ab1) y la punta se sumerge en un pocillo con el mismo anticuerpo (Ab1) como control o en un pocillo con un anticuerpo de prueba diferente (Ab2). Si no se produce más unión, como se determinó al comparar los niveles de unión con el Ab1 de control, entonces se determina que Ab1 y Ab2 son anticuerpos “competidores”. Si se observa unión adicional con Ab2, entonces se determina que Ab1 y Ab2 no compiten entre sí. Este proceso puede expandirse para seleccionar grandes bibliotecas de anticuerpos únicos mediante el uso de una fila completa de anticuerpos en una placa de 96 pocillos que representan contenedores únicos. En modalidades, un anticuerpo de prueba competirá con un anticuerpo de referencia si el anticuerpo de referencia inhibe la unión específica del anticuerpo de prueba a un antígeno común en al menos un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o 75 %. En otras modalidades, la unión se inhibe en al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 97 % o más.

B. Ensayos para medir la eficacia

En algunas modalidades, la activación de células T se evalúa mediante un ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR) como se conoce en la técnica. Un aumento en la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados en la actividad se indican a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones en la respuesta inmune según la medición, para un ejemplo, mediante fosforilación o desfosforilación de diferentes factores, o mediante la medición de otras modificaciones postraduccionales. Un aumento en la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados en la actividad se indican a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones en la activación de las células T αβ y/o γδ según la medición, para un ejemplo, mediante secreción de citocinas o proliferación o mediante cambios en la expresión de los marcadores de activación como, para un ejemplo, CD25, CD69, CD137, CD107a, PD1, etc. Un aumento en la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados en la actividad se indican a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones en la actividad de las células T citotóxicas según la medición, para un ejemplo, mediante eliminación directa de células diana como, para un ejemplo, células cancerosas o mediante secreción de citocinas o proliferación o cambios en la expresión de los marcadores de activación como, para un ejemplo, CD25, CD69, CD137, CD107a, PD1, etc. Un aumento en la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados en la actividad se indican a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones en la actividad de células NK y/o NKT según la medición, para un ejemplo, mediante eliminación directa de células diana como, para un ejemplo, células cancerosas o mediante secreción de citocinas o cambios en la expresión de los marcadores de activación como, para un ejemplo, CD107a, etc. Un aumento en la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados en la actividad se indican a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones en la supresión de las células T αβ y/o γδ según la medición, para un ejemplo, mediante secreción de citocinas o proliferación o mediante cambios en la expresión de los marcadores de activación como, para un ejemplo, CD137, CD107a, PD1, etc. Un aumento en la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados en la actividad se indican a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones en la secreción de citocinas proinflamatorias según la medición, por ejemplo, mediante ELISA o Luminex o métodos basados en perlas multiplex o mediante tinción intracelular y análisis FACS o mediante Alispot, etc. Un aumento en la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados en la actividad se indican a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones en la secreción de IL-2 según la medición, por ejemplo, mediante ELISA o Luminex o métodos basados en perlas multiplex o mediante tinción intracelular y análisis FACS o mediante Alispot, etc. Un aumento en la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados en la actividad se indican a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones en la producción de interferón-ɣ según la medición, por ejemplo, mediante ELISA o Luminex o métodos basados en perlas multiplex o mediante tinción intracelular y análisis FACS o mediante Alispot, etc. Un aumento en la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados en la actividad se indican a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones en la respuesta de Th1 según la medición, por ejemplo, mediante secreción de citocinas o cambios en la expresión de marcadores de activación. Un aumento en la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados en la actividad se indican a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones en la respuesta de Th2 según la medición, por ejemplo, mediante secreción de citocinas o cambios en la expresión de marcadores de activación. Un aumento en la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados en la actividad se indican a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones del número y/o actividad celular de al menos una de las células T reguladoras (Treg), según la medición, por ejemplo, mediante citometría de flujo o IHC. Una disminución en la respuesta indica actividad inmunoestimulante. Las disminuciones adecuadas son las mismas que para los aumentos, descritos a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones en los números de células de macrófagos M2 según la medición, por ejemplo, mediante citometría de flujo o IHC. Una disminución en la respuesta indica actividad inmunoestimulante. Las disminuciones adecuadas son las mismas que para los aumentos, descritos a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones en la actividad protumorigénica de macrófagos M2 según la medición, por ejemplo, mediante secreción de citocinas o cambios en la expresión de marcadores de activación. Una disminución en la respuesta indica actividad inmunoestimulante. Las disminuciones adecuadas son las mismas que para los aumentos, descritos a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones en aumento de neutrófilos N2 según la medición, por ejemplo, mediante citometría de flujo o IHC. Una disminución en la respuesta indica actividad inmunoestimulante. Las disminuciones adecuadas son las mismas que para los aumentos, descritos a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones en la actividad rotumorigénica de neutrófilos N2 según la medición, por ejemplo, mediante secreción de citocinas o cambios en la expresión de marcadores de activación. Una disminución en la respuesta indica actividad inmunoestimulante. Las disminuciones adecuadas son las mismas que para los aumentos, descritos a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones en la inhibición de la activación de las células T según la medición, para un ejemplo, mediante secreción de citocinas o proliferación o mediante cambios en la expresión de los marcadores de activación como, para un ejemplo, CD137, CD107a, PD1, etc. Un aumento en la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados en la actividad se indican a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones en la inhibición de la activación de CTL según la medición, para un ejemplo, mediante eliminación directa de células diana como, para un ejemplo, células cancerosas o mediante secreción de citocinas o proliferación o cambios en la expresión de los marcadores de activación como, para un ejemplo, CD137, CD107a, PD1, etc. Un aumento en la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados en la actividad se indican a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones en el agotamiento de células T αβ y/o γδ según la medición, para un ejemplo, mediante cambios en la expresión de marcadores de activación. Una disminución en la respuesta

indica actividad inmunoestimulante. Las disminuciones adecuadas son las mismas que para los aumentos, descritos a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones de la respuesta de las células T αβ y/o γδ según la medición, para un ejemplo, mediante secreción de citocinas o proliferación o mediante cambios en la expresión de los marcadores de activación como, para un ejemplo, CD137, CD107a, PD1, etc. Un aumento en la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados en la actividad se indican a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones en la estimulación de respuestas de memoria específica de antígenos según la medición, para un ejemplo, mediante secreción de citocinas o proliferación o mediante cambios en la expresión de los marcadores de activación como, para un ejemplo, CD45RA, CCR7, etc. Un aumento en la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados en la actividad se indican a continuación..

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones en la apoptosis o lisis de células cancerosas según la medición, para un ejemplo, mediante ensayos de citotoxicidad tales como, para un ejemplo, MTT, liberación de Cr, calceína AM o mediante ensayos basados en citometría de flujo como, para un ejemplo, dilución de CFSE o tinción con yoduro de propidio, etc. Un aumento en la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados en la actividad se indican a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones en la estimulación del efecto citotóxico o citostático en células cancerosas según la medición, para un ejemplo, mediante ensayos de citotoxicidad tales como, para un ejemplo, MTT, liberación de Cr, calceína AM o mediante ensayos basados en citometría de flujo como, para un ejemplo, dilución de CFSE o tinción con yoduro de propidio, etc. Un aumento en la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados en la actividad se indican a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones de la eliminación directa de células cancerosas según la medición, para un ejemplo, mediante ensayos de citotoxicidad tales como, para un ejemplo, MTT, liberación de Cr, calceína AM o mediante ensayos basados en citometría de flujo como, para un ejemplo,

dilución de CFSE o tinción con yoduro de propidio, etc. Un aumento en la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados en la actividad se indican a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones de la actividad de Th17 según la medición, para un ejemplo, mediante secreción de citocinas o proliferación o mediante cambios en la expresión de los marcadores de activación. Un aumento en la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados en la actividad se indican a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones en la inducción de citotoxicidad dependiente del complemento y/o citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos según la medición, para un ejemplo, mediante ensayos de citotoxicidad tales como, para un ejemplo, MTT, liberación de Cr, calceína AM o mediante ensayos basados en citometría de flujo como, para un ejemplo, dilución de CFSE o tinción con yoduro de propidio, etc. Un aumento en la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados en la actividad se indican a continuación.

En una modalidad, la activación de células T se mide para un ejemplo, mediante eliminación directa de células diana como, para un ejemplo, células cancerosas o mediante secreción de citocinas o proliferación o cambios en la expresión de los marcadores de activación como, para un ejemplo, CD137, CD107a, PD1, etc. Para las células T, los aumentos en la proliferación, los marcadores de activación de la superficie celular (por ejemplo, CD25, CD69, CD137, PD1), la citotoxicidad (capacidad para matar células diana) y la producción de citocinas (por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-6, IFNγ, TNF-a, IL-10, IL-17A) serían indicativos de una modulación inmunitaria que sería consistente con una mayor eliminación de células cancerosas.

En una modalidad, la activación de células NK se mide, por ejemplo, mediante la eliminación directa de células diana tales como, para un ejemplo, células cancerosas o mediante la secreción de citocinas o cambios en la expresión de los marcadores de activación como, para un ejemplo, CD107a, etc. Para las células NK, los aumentos en la proliferación, la citotoxicidad (capacidad para matar células diana y aumento de la expresión de CD107a, granzima y perforina), la producción de citocinas (por ejemplo, IFNγ y TNF) y la expresión del receptor de la superficie celular (por ejemplo, CD25)

serían indicativos de una modulación inmunitaria que sería consistente con una mayor eliminación de células cancerosas.

En una modalidad, la activación de células T γδ se mide, por ejemplo, mediante secreción de citocinas o proliferación o cambios en la expresión de marcadores de activación.

En una modalidad, la activación de células Th1 se mide, por ejemplo, mediante secreción de citocinas o por cambios en la expresión de marcadores de activación.

Los aumentos adecuados en la actividad o respuesta (o reducciones, según sea adecuado como se describió anteriormente), son aumentos de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 a 99 % por ciento por encima de la señal en ya sea una muestra de referencia o en muestras de control, por ejemplo, muestras de prueba que no contienen un anticuerpo anti-PVRIG de la invención. De manera similar, los aumentos de al menos una, dos, tres, cuatro o cinco veces en comparación con las muestras de referencia o control muestran eficacia.

VIII. **Anticuerpos de bloqueo de punto de regulación**

En algunas modalidades, las proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 de la invención descritas en la presente descripción se combinan con otros agentes terapéuticos que incluyen anticuerpos de bloqueo de punto de regulación, tales como, pero no se limitan a, un inhibidor de PD-1, un inhibidor de TIM3, un inhibidor de CTLA4, un inhibidor de PD-L1, un inhibidor de TIGIT, un inhibidor de LAG3 o una combinación de los mismos.

Además de los anticuerpos discutidos a continuación, se encuentra una divulgación adicional en el documento USSN 62/784,334, incorporada por referencia en su totalidad y específicamente para la discusión de anticuerpos de punto de control para usar en combinación.

A. Anticuerpos anti-PD1

En algunas modalidades, una proteína de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a PD-1 descrita en la presente descripción puede administrarse a un sujeto con cáncer en combinación con un anticuerpo de bloqueo de punto de regulación, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-PD-L1.

En muchos aspectos, el inhibidor de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 elegido entre aquellos que no compiten por la unión con las secuencias de Fv no competidoras anti-PD-1 como se indica en la presente descripción. Son de uso particular aquellos anticuerpos anti-PD-1 aprobados para usar en humanos en los EE. UU. o en el extranjero, que incluyen, pero no se limitan a, nivolumab y pembrolizumab.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-PD-1 es nivolumab. Los nombres alternativos para nivolumab incluyen MDX-1106, MDX-1106-04, ONO-4538 o BMS-936558. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-PD-1 es nivolumab (número de registro CAS: 946414-94-4). El nivolumab es un anticuerpo monoclonal IgG4 completamente humano que bloquea específicamente a PD1. El nivolumab (clon 5C4) y otros anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a PD1 se divulgan en los documentos US 8,008,449 y WO2006/121168. En una modalidad, el inhibidor de PD-1 es nivolumab, y tiene una secuencia divulgada en la presente descripción (o una secuencia sustancialmente idéntica o similar a la misma, por ejemplo, una secuencia al menos 85 %, 90 %, 95 % o más, idéntica a la secuencia especificada).

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-PD-1 es pembrolizumab. El pembrolizumab (también denominado lambrolizumab, MK-3475, MK03475, SCH-900475 o KEYTRUDA®; Merck) es un anticuerpo monoclonal IgG4 humanizado que se une a PD-1. El pembrolizumab y otros anticuerpos anti-PD-1 humanizados se divulgan en Hamid, O. y otros (2013) *New England Journal of Medicine* 369 (2): 134–44, los documentos US 8,354,509 y WO2009/114335.

Otros anticuerpos anti-PD1 incluyen AMP 514 (Amplimmune), pero no se limitan a, por ejemplo, los anticuerpos anti-PD1 divulgados en los documentos US 8,609,089, US 2010028330 y/o US 20120114649.

En algunas modalidades, el inhibidor de PD-1 es una inmunoadhesina (por ejemplo, una inmunoadhesina que comprende una porción extracelular o de unión a PD-1 de PD-L1 o PD-L2 fusionada a una región constante (por ejemplo, una región Fc de una secuencia de inmunoglobulina). En algunas modalidades, el inhibidor de PD-1 es AMP-224 (B7-DCIg; Amplimmune; por ejemplo, divulgado en los documentos WO2010/027827 y WO2011/066342), es un receptor soluble de fusión PD-L2 Fc que bloquea la interacción entre PD-1 y B7-H1.

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-PD-1 pueden usarse en combinación con una proteína de fusión a Fc heterodimérica IL-15/Rα x anti-PD1 de la invención. Hay varios anticuerpos anti-PD-1 que incluyen, pero no se limitan a, dos anticuerpos actualmente aprobados por la FDA, pembrolizumab y nivolizumab, así como aquellos que se encuentran actualmente en ensayos clínicos, que incluyen, pero no se limitan a, tislelizumab, Sym021, REGN2810 (desarrollado por Regeneron), JNJ-63723283 (desarrollado por J y J), SHR-1210, pidilizumab, AMP-224, MEDIo680, PDR001 y CT-001, así como otros descritos en Liu y otros, J. Hemat. & Oncol. (2017)10:136, los anticuerpos en el mismo se incorporan expresamente como referencia.

B. Anticuerpos anti-TIM3

Las proteínas de fusión heterodiméricas IL-15/Rα X [NC]PD-1 de la invención también pueden coadministrarse con anticuerpos anti-TIM-3. Moléculas de anticuerpo anti-TIM-3 no limitantes ilustrativas se divulgan en el documento US 2015/0218274, publicado el 6 de agosto de 2015, titulado “Antibody Molecules to TIM-3 and Uses Thereof,” incorporado por referencia en su totalidad.

Hay varios anticuerpos a TIM-3 en desarrollo clínico, que incluyen, pero no se limitan a MBG453, Sym023, BGB-A425 y TSR-022.

En una modalidad, la molécula de anticuerpo anti-TIM-3 incluye al menos uno o dos dominios variables de cadena pesada (que incluyen opcionalmente una región constante), al menos uno o dos dominios variables de cadena ligera (que incluyen opcionalmente una región constante) o ambos, que comprenden la secuencia de aminoácidos de ABTIM3, ABTIM3-hum01, ABTIM3-hum02, ABTIM3-hum03, ABTIM3-hum04, ABTIM3-hum05, ABTIM3-hum06, ABTIM3-hum07, ABTIM3-hum08, ABTIM3-hum09, ABTIM3-hum10, ABTIM3-hum11, ABTIM3-hum12, ABTIM3-hum13, ABTIM3-hum14, ABTIM3-hum15, ABTIM3-hum16, ABTIM3-hum17, ABTIM3-hum18, ABTIM3-hum19, ABTIM3-hum20, ABTIM3-hum21, ABTIM3-hum22, ABTIM3-hum23; o como se describe en las tablas 1-4 del documento US 2015/0218274; o codificada por la secuencia de nucleótidos en las tablas 1-4; o una secuencia sustancialmente idéntica (por ejemplo, al menos 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más, idéntica) a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente. La molécula de anticuerpo anti-TIM-3, opcionalmente, comprende una secuencia líder de una cadena pesada, una cadena ligera o ambas, como se muestra en el documento US 2015/0218274; o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma.

En otra modalidad más, la molécula de anticuerpo anti-TIM-3 incluye al menos una, dos o tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una región variable de cadena pesada y/o una región variable de cadena ligera de un anticuerpo descrito en la presente descripción, por ejemplo, un anticuerpo elegido de cualquiera de ABTIM3, ABTIM3-hum01, ABTIM3-hum02, ABTIM3-hum03, ABTIM3-hum04, ABTIM3-hum05, ABTIM3-hum06, ABTIM3-hum07, ABTIM3-hum08, ABTIM3-hum09, ABTIM3-hum10, ABTIM3-hum11, ABTIM3-hum12, ABTIM3-hum13, ABTIM3-hum14, ABTIM3-hum15, ABTIM3-hum16, ABTIM3-hum17, ABTIM3-hum18, ABTIM3-hum19, ABTIM3-hum20, ABTIM3-hum21, ABTIM3-hum22, ABTIM3-hum23; o como se describe en las tablas 1-4 del documento US 2015/0218274; o codificada por la secuencia de nucleótidos en las tablas 1-4; o una secuencia sustancialmente idéntica (por ejemplo, al menos 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más, idéntica) a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente.

En otra modalidad más, la molécula de anticuerpo anti-TIM-3 incluye al menos una, dos o tres CDR (o en conjunto todas las CDR) de una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en las tablas 1-4 del documento US 2015/0218274 o codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada en las tablas 1-4. En una modalidad, una o más de las CDR (o en conjunto todas las CDR) tienen uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más cambios, por ejemplo, sustituciones o eliminaciones de aminoácidos, con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en las tablas 1-4 o codificadas por una secuencia de nucleótidos mostrada en la tabla 1-4.

En otra modalidad más, la molécula de anticuerpo anti-TIM-3 incluye al menos una, dos o tres CDR (o en conjunto todas las CDR) de una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en las tablas 1-4 del documento US 2015/0218274 o codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada en las tablas 1-4. En una modalidad, una o más de las CDR (o en conjunto todas las CDR) tienen uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más cambios, por ejemplo, sustituciones o eliminaciones de aminoácidos, con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en las tablas 1-4 o codificadas por una secuencia de nucleótidos mostrada en las Tablas 1-4. En ciertas modalidades, la molécula de anticuerpo anti-TIM-3 incluye una sustitución en una CDR de cadena ligera, por ejemplo, una o más sustituciones en una CDR1, CDR2 y/o CDR3 de la cadena ligera.

En otra modalidad, la molécula de anticuerpo anti-TIM-3 incluye al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR (o en conjunto todas las CDR) de una región variable de cadena pesada y ligera que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en las tablas 1-4 del documento US 2015/0218274 o codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada en las tablas 1-4. En una modalidad, una o más de las CDR (o en conjunto todas las CDR) tienen uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más cambios, por ejemplo, sustituciones o eliminaciones de aminoácidos, con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en las tablas 1-4 o codificadas por una secuencia de nucleótidos mostrada en las Tablas 1-4.

C. Anticuerpos anti-CTLA4

Las proteínas de fusión heterodiméricas IL-15/Rα X [NC]PD-1 de la invención también pueden coadministrarse con anticuerpos anti-CTLA-4. Los anticuerpos anti-CTLA-4 adecuados para usar en terapias combinadas como se describe en la presente descripción incluyen, pero no se limita a, un anticuerpo ipilimumab actualmente aprobado por la FDA y varios más en desarrollo, que incluyen CP-675,206 y AGEN-1884. Los anticuerpos anti-CTLA4 ilustrativos incluyen tremelimumab (anticuerpo monoclonal IgG2 disponible de Pfizer, formalmente conocido como ticilimumab, CP-675,206); y dim (anticuerpo contra CTLA-4, también conocido como MDX-010, CAS No. 477202-00-9). Otros anticuerpos anti-CTLA-4 ilustrativos se divulgan, por ejemplo, en la patente de EE. UU. No. 5,811,097.

En una modalidad, el anticuerpo anti-CTLA4 es ipilimumab divulgado, por ejemplo, en los documentos US 5,811,097, US 7,605,238, WO00/32231 y WO97/20574, y tiene una secuencia divulgada en la presente descripción (o una secuencia sustancialmente idéntica o similar a la misma, por ejemplo, una secuencia al menos 85 %, 90 %, 95 % o más, idéntica a la secuencia especificada).

En una modalidad, el anticuerpo anti-CTLA4 es tremelimumab divulgado, por ejemplo, en los documentos US 6,682,736 y WO00/37504, y tiene una secuencia divulgada en la presente descripción (o una secuencia sustancialmente idéntica o similar a la misma, por ejemplo, una secuencia al menos 85 %, 90 %, 95 % o más, idéntica a la secuencia especificada).

D. Anticuerpos anti-PD-L1

Las proteínas de fusión heterodiméricas IL-15/Rα X [NC]PD-1 de la invención también pueden coadministrarse con anticuerpos anti-PD-L1. Las moléculas de anticuerpo anti-PD-L1 no limitantes ilustrativas se divulgan en el documento US 2016/0108123, publicado el 21 de abril de 2016, titulado “Antibody Molecules to PD-L1 and Uses Thereof”, incorporado por referencia en su totalidad.

En una modalidad, la molécula de anticuerpo anti-PD-L1 incluye al menos uno o dos dominios variables de cadena pesada (que incluyen opcionalmente una región constante), al menos uno o dos dominios variables de cadena ligera (que incluyen opcionalmente una región constante), o ambos, que comprenden la secuencia de aminoácidos de cualquiera de BAP058-hum01, BAP058-hum02, BAP058-hum03, BAP058-hum04, BAP058-hum05, BAP058-hum06, BAP058-hum07, BAP058-hum08, BAP058-hum09, BAP058-hum10, BAP058-hum11, BAP058-hum12, BAP058-hum13, BAP058-hum14, BAP058-hum15, BAP058-hum16, BAP058-hum17, BAP058-Clon-K, BAP058-Clon-L, BAP058-Clon-M, BAP058-Clon-N, o BAP058-Clon-O; o como se describe en la tabla 1 del documento US 2016/0108123, o codificada por la secuencia de nucleótidos en la tabla 1; o una secuencia sustancialmente idéntica (por ejemplo, al menos 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más, idéntica) a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente.

En otra modalidad más, la molécula de anticuerpo anti-PD-L1 incluye al menos una, dos o tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una región variable de cadena pesada y/o una región variable de cadena ligera de un anticuerpo descrito en la presente descripción, por ejemplo, un anticuerpo elegido de cualquiera de BAP058-hum01, BAP058-hum02, BAP058-hum03, BAP058-hum04, BAP058-hum05, BAP058-hum06, BAP058-hum07, BAP058-hum08, BAP058-hum09, BAP058-hum10, BAP058-hum11, BAP058-hum12, BAP058-hum13, BAP058-hum14, BAP058-hum15, BAP058-hum16, BAP058-hum17, BAP058-Clon-K, BAP058-Clon-L, BAP058-Clon-M, BAP058-Clon-N, o BAP058-Clon-O; o como se describe en la tabla 1 del documento US 2016/0108123, o codificada por la secuencia de nucleótidos en la tabla 1; o una secuencia sustancialmente idéntica (por ejemplo, al menos 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más, idéntica) a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente.

En algunas modalidades, el inhibidor de PD-L1 es una molécula de anticuerpo. En algunas modalidades, el inhibidor anti-PD-L1 se elige de YW243.55.S70, MPDL3280A,

MEDI-4736, MSB-0010718C, MDX-1105, atezolizumab, durbalumab, avelumab, o BMS936559.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-PD-L1 es atezolizumab. El atezolizumab (también denominado MPDL3280A y Atezo®; Roche) es un anticuerpo monoclonal que se une a PD-L1. El atezolizumab y otros anticuerpos anti-PD-L1 humanizados se divulgan en el documento US 8,217,149 y tiene una secuencia divulgada en la presente descripción (o una secuencia sustancialmente idéntica o similar a la misma, por ejemplo, una secuencia al menos 85 %, 90 %, 95 % o más, idéntica a la secuencia especificada).

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-PD-L1 es avelumab. El avelumab (también denominado A09-246-2; Merck Serono) es un anticuerpo monoclonal que se une a PD-L1. El avelumab y otros anticuerpos anti-PD-L1 humanizados se divulgan en los documentos US 9,324,298 y WO2013/079174, y tiene una secuencia divulgada en la presente descripción (o una secuencia sustancialmente idéntica o similar a la misma, por ejemplo, una secuencia al menos 85 %, 90 %, 95 % o más, idéntica a la secuencia especificada).

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-PD-L1 es durvalumab. El durvalumab (también denominado MEDI4736; AstraZeneca) es un anticuerpo monoclonal que se une a PD-L1. El durvalumab y otros anticuerpos anti-PD-L1 humanizados se divulgan en el documento US 8,779,108 y tiene una secuencia divulgada en la presente descripción (o una secuencia sustancialmente idéntica o similar a la misma, por ejemplo, una secuencia al menos 85 %, 90 %, 95 % o más, idéntica a la secuencia especificada).

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-PD-L1 es BMS-936559. El BMS-936559 (también denominado MDX-1105; BMS) es un anticuerpo monoclonal que se une a PD-L1. El BMS-936559 y otros anticuerpos anti-PD-L1 humanizados se divulgan en los documentos US 7,943,743 y WO2007005874, y tiene una secuencia divulgada en la presente descripción (o una secuencia sustancialmente idéntica o similar a la misma, por ejemplo, una secuencia al menos 85 %, 90 %, 95 % o más, idéntica a la secuencia especificada).

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-PD-L1 pueden usarse en combinación con una proteína de fusión a Fc heterodimérica IL-15/Rα x anti-PD1 de la invención. Hay varios anticuerpos anti-PD-L1 que incluyen tres anticuerpos actualmente aprobados por la FDA, atezolizumab, avelumab, durvalumab, así como aquellos que se encuentran

actualmente en ensayos clínicos, que incluyen, pero no se limita a, LY33000054 y CS1001, así como otros descritos en Liu y otros, J. Hemat. & Oncol. (2017)10:136, los anticuerpos en el mismo se incorporan expresamente como referencia.

En algunas modalidades, una proteína de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a PD-1 descrita en la presente descripción puede usarse en combinación con un inhibidor de PD-L1 o PD-L2 (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1).

E. Anticuerpos anti-TIGIT

Las proteínas de fusión heterodiméricas IL-15/Rα X [NC]PD-1 de la invención también pueden coadministrarse con anticuerpos anti-TIGIT. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-TIGIT es OMP-313M32. El OMP-313M32 (OncoMed Pharmaceuticals) es un anticuerpo monoclonal que se une a TIGIT. El OMP-313M32 y otros anticuerpos anti-TIGIT humanizados se divulgan en los documentos US20160376365 y WO2016191643, y tiene una secuencia divulgada en la presente descripción (o una secuencia sustancialmente idéntica o similar a la misma, por ejemplo, una secuencia al menos 85 %, 90 %, 95 % o más, idéntica a la secuencia especificada).

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-TIGIT es BMS-986207. El BMS-986207 (también denominado ONO-4686; Bristol-Myers Squibb) es un anticuerpo monoclonal que se une a TIGIT. El BMS-986207 y otros anticuerpos anti-TIGIT humanizados se divulgan en los documentos US20160176963 y WO2016106302, y tiene una secuencia divulgada en la presente descripción (o una secuencia sustancialmente idéntica o similar a la misma, por ejemplo, una secuencia al menos 85 %, 90 %, 95 % o más, idéntica a la secuencia especificada).

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-TIGIT es MTIG7192. El MTIG7192 (Genentech) es un anticuerpo monoclonal que se une a TIGIT. El MTIG7192 y otros anticuerpos anti-TIGIT humanizados se divulgan en los documentos US2017088613, WO2017053748 y WO2016011264, y tiene una secuencia divulgada en la presente descripción (o una secuencia sustancialmente idéntica o similar a la misma, por ejemplo, una secuencia al menos 85 %, 90 %, 95 % o más, idéntica a la secuencia especificada).

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-TIGIT pueden usarse en combinación con una proteína de fusión a Fc heterodimérica IL-15/Rα x anti-PD1 de la invención. Hay varios anticuerpos a TIGIT en desarrollo clínico, BMS-986207, OMP-313M32 y MTIG7192A.

F. Anticuerpos anti-LAG-3

Las proteínas de fusión heterodiméricas IL-15/Rα X [NC]PD-1 de la invención también pueden coadministrarse con anticuerpos anti-LAG-3. Las moléculas de anticuerpo anti-LAG-3 no limitantes ilustrativas se divulgan en el documento US 2015/0259420 publicado el 17 de septiembre de 2015, titulado “Antibody Molecules to LAG-3 and Uses Thereof”, incorporado por referencia en su totalidad.

En una modalidad, la molécula de anticuerpo anti-LAG-3 incluye al menos uno o dos dominios variables de cadena pesada (que incluyen opcionalmente una región constante), al menos uno o dos dominios variables de cadena ligera (que incluyen opcionalmente una región constante), o ambos, que comprenden la secuencia de aminoácidos de cualquiera de BAP050-hum01, BAP050-hum02, BAP050-hum03, BAP050-hum04, BAP050-hum05, BAP050-hum06, BAP050-hum07, BAP050-hum08, BAP050-hum09, BAP050-hum10, BAP050-hum11, BAP050-hum12, BAP050-hum13, BAP050-hum14, BAP050-hum15, BAP050-hum16, BAP050-hum17, BAP050-hum18, BAP050-hum19, BAP050-hum20, huBAP050(Ser) (por ejemplo, BAP050-hum01-Ser, BAP050-hum02-Ser, BAP050-hum03-Ser, BAP050-hum04-Ser, BAP050-hum05-Ser, BAP050-hum06-Ser, BAP050-hum07-Ser, BAP050-hum08-Ser, BAP050-hum09-Ser, BAP050-hum10-Ser, BAP050-hum11-Ser, BAP050-hum12-Ser, BAP050-hum13-Ser, BAP050-hum14-Ser, BAP050-hum15-Ser, BAP050-hum18-Ser, BAP050-hum19-Ser, o BAP050-hum20-Ser), BAP050-Clon-F, BAP050-Clon-G, BAP050-Clon-H, BAP050-Clon-I, o BAP050-Clon-J; o como se describe en la tabla 1 del documento US 2015/0259420, o codificada por la secuencia de nucleótidos en la tabla 1; o una secuencia sustancialmente idéntica (por ejemplo, al menos 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más, idéntica) a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente.

En otra modalidad más, la molécula de anticuerpo anti-LAG-3 incluye al menos una, dos o tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una región variable de cadena pesada y/o una región variable de cadena ligera de un anticuerpo descrito en la presente descripción, por ejemplo, un anticuerpo elegido de cualquiera de BAP050-hum01, BAP050-hum02, BAP050-hum03, BAP050-hum04, BAP050-hum05, BAP050-hum06, BAP050-hum07, BAP050-hum08, BAP050-hum09, BAP050-hum10, BAP050-hum11, BAP050-hum12, BAP050-hum13, BAP050-hum14, BAP050-hum15, BAP050-hum16, BAP050-hum17, BAP050-hum18, BAP050-hum19, BAP050-hum20,

huBAP050(Ser) (por ejemplo, BAP050-hum01-Ser, BAP050-hum02-Ser, BAP050-hum03-Ser, BAP050-hum04-Ser, BAP050-hum05-Ser, BAP050-hum06-Ser, BAP050-hum07-Ser, BAP050-hum08-Ser, BAP050-hum09-Ser, BAP050-hum10-Ser, BAP050-hum11-Ser, BAP050-hum12-Ser, BAP050-hum13-Ser, BAP050-hum14-Ser, BAP050-hum15-Ser, BAP050-hum18-Ser, BAP050-hum19-Ser, o BAP050-hum20-Ser), BAP050-Clon-F, BAP050-Clon-G, BAP050-Clon-H, BAP050-Clon-I, o BAP050-Clon-J; o como se describe en la tabla 1 del documento US 2015/0259420, o codificada por la secuencia de nucleótidos en la tabla 1; o una secuencia sustancialmente idéntica (por ejemplo, al menos 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más, idéntica) a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-LAG-3 es BMS-986016. El BMS-986016 (también denominado BMS986016; Bristol-Myers Squibb) es un anticuerpo monoclonal que se une a LAG-3. El BMS-986016 y otros anticuerpos anti-LAG-3 humanizados se divulgan en los documentos US 2011/0150892, WO2010/019570 y WO2014/008218.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-LAG3 es LAG525. El LAG525 (también denominado IMP701; Novartis) es un anticuerpo monoclonal que se une a LAG3. El LAG525 y otros anticuerpos anti-LAG3 humanizados se divulgan en los documentos US 9,244,059 y WO2008132601, y tiene una secuencia divulgada en la presente descripción (o una secuencia sustancialmente idéntica o similar a la misma, por ejemplo, una secuencia al menos 85 %, 90 %, 95 % o más, idéntica a la secuencia especificada).

Otros anticuerpos anti-LAG-3 ilustrativos se divulgan, por ejemplo, en los documentos US2011150892 y US2018066054.

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-LAG-3 pueden usarse en combinación con una proteína de fusión heterodimérica bifuncional IL-15/Rα x anti-PD1 de la invención. Hay varios anticuerpos anti-LAG-3 en desarrollo clínico, que incluyen REGN3767, de Regeneron y TSR-033 (Tesaro).

IX. **Tratamientos**

Una vez elaboradas, las composiciones de la invención encuentran uso en varias aplicaciones oncológicas, mediante tratamiento del cáncer, generalmente al promover la activación de las células T (por ejemplo, las células T ya no están suprimidas) con la unión de las proteínas de fusión a Fc heterodiméricas de la invención.

En consecuencia, las composiciones de proteínas Fc heterodiméricas de la invención encuentran uso en el tratamiento contra estos tipos de cáncer.

A. Administración

En este contexto, la administración “en combinación”, como se usa en la presente descripción, significa que se suministran dos tratamientos al sujeto durante el curso de la dolencia del sujeto con el trastorno, por ejemplo, los dos o más tratamientos se suministran después que el sujeto se ha diagnosticado con el trastorno y antes que el trastorno se ha curado o eliminado o el tratamiento se interrumpe por otras razones. En algunas modalidades, el suministro de un tratamiento todavía se produce cuando comienza el suministro del segundo, de modo que hay superposición en términos de administración. Esto a veces se denomina en la presente descripción “suministro concurrente” o “simultáneo”. En otras modalidades, el suministro de un tratamiento finaliza antes de comenzar el suministro del otro tratamiento. En algunas modalidades de cualquier caso, el tratamiento es más eficaz debido a la administración combinada. Por ejemplo, el segundo tratamiento es más eficaz, por ejemplo, se observa un efecto equivalente con menos del segundo tratamiento, o el segundo tratamiento reduce los síntomas en mayor medida que lo que se observaría si el segundo tratamiento se administrara en ausencia del primer tratamiento, o la situación análoga se observa con el primer tratamiento. En algunas modalidades, el suministro es de modo que la reducción de un síntoma u otro parámetro relacionado con el trastorno es mayor que lo que se observaría con un tratamiento suministrado en ausencia del otro. El efecto de los dos tratamientos puede ser parcialmente aditivo, totalmente aditivo o más que aditivo. El suministro puede ser de modo que un efecto del primer tratamiento suministrado aún sea detectable cuando se suministra el segundo.

B. Formulaciones para la administración *in vivo*

Las formulaciones de los anticuerpos usados de acuerdo con la presente invención se preparan para ser almacenadas al mezclar un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (como se indica generalmente en Remington’s Pharmaceutical Sciences 16ta edición, Osol, A. Ed. [1980]), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Modalidades administrativas

Las proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 divulgadas en la presente descripción y los agentes quimioterapéuticos de la invención se administran a un sujeto

de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo.

Todas las referencias citadas se incorporan expresamente en la presente descripción en su totalidad.

Si bien se describieron anteriormente modalidades particulares de la invención a fines ilustrativos, los expertos en la técnica podrán apreciar que las numerosas variaciones de los detalles pueden llevarse a cabo sin apartarse de la invención tal como se la describe en la reivindicaciones adjuntas.

X. Ejemplos

A continuación se proporcionan ejemplos para ilustrar la presente invención. Estos ejemplos no pretenden limitar la presente invención a ninguna aplicación particular o conceptos de operación. Para todas las posiciones de regiones constantes analizadas en la presente invención, la numeración es de acuerdo con el índice EU según Kabat (Kabat y otros, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ta Ed., Servicio de Salud Pública de Estados Unidos, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, incorporado en su totalidad por referencia). Los expertos en la técnica de anticuerpos, apreciarán que esta convención consiste de numeración no secuencial en regiones específicas de una secuencia de inmunoglobina, lo que permite una referencia normalizada para conservar posiciones en familias de inmunoglobinas. En consecuencia, las posiciones de cualquier inmunoglobulina dada según lo define el índice EU no corresponderán necesariamente a su secuencia secuencial.

En las publicaciones de EE. UU. 2015/0307629, 2014/0288275 y WO2014/145806 se describen técnicas científicas generales y específicas, las cuales se incorporan expresamente por referencia en su totalidad y en particular para las técnicas descritas en la misma. Los ejemplos 1 y 2 del documento U.S. Ser. No. 62,416, 087, presentado el 1 de noviembre de 2016 se incorporan expresamente por referencia en su totalidad, incluidas las figuras correspondientes.

A. Ejemplo 1: IL-15/Rα-Fc

1. Modificación por ingeniería genética de proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc

Con el fin de abordar la vida media corta de los heterodímeros IL-15/IL-15Rα, generamos el complejo IL-15/IL-15Rα(sushi) como una fusión Fc (en la presente descripción, denominadas colectivamente proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc) con el

objetivo de facilitar la producción y promover el reciclaje mediado por FcRn del complejo y prolongar su vida media.

Los plásmidos que codifican IL-15 o el dominio sushi de IL-15Rα se construyeron mediante síntesis génica estándar, seguida de subclonación en un vector de expresión pTT5 que contiene parejas de fusión Fc (por ejemplo, regiones constantes como se representa en la Figura 10). En las Figuras 13A-G se representan dibujos esquemáticos de formatos de proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc ilustrativas.

Una proteína ilustrativa del formato IL-15/Rα-heteroFc (Figura 13A) es XENP20818, cuyas secuencias se representan en la Figura 14, con secuencias para proteínas adicionales de este formato. Una proteína ilustrativa del formato scIL-15/Rα-Fc (Figura 13B) es XENP21478, cuyas secuencias se representan en la Figura 15. Una proteína ilustrativa del formato ncIL-15/Rα-Fc (Figura 13C) es XENP21479, cuyas secuencias se representan en la Figura 16.

Las proteínas se produjeron mediante transfección transitoria en células HEK293E y se purificaron mediante un proceso de purificación de dos etapas que comprenden cromatografía de proteína A y cromatografía de intercambio iónico.

Se probaron proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc ilustrativas en el formato scIL-15/Rα-Fc (XENP21478) y en el formato ncIL-15/Rα-Fc (XENP21479) en un ensayo de proliferación celular. Las PBMC humanas se trataron con los artículos de prueba en las concentraciones indicadas. Las PBMC se tiñeron con anti-CD8-FITC (RPA-T8), anti-CD4-PerCP/Cy5.5 (OKT4), anti-CD27-PE (M-T271), anti-CD56-BV421 (5.1H11), anti-CD16-BV421 (3G8) y anti-CD45RA-BV605 (Hi100) para clasificar los siguientes tipos celulares: células T $CD4^+$, células T $CD8^+$, y células NK (CD56+/CD16+), 4 días después del tratamiento,. Ki67 es una proteína estrictamente asociada con la proliferación celular, y se realizó la tinción para Ki67 intracelular mediante anti-Ki67-APC (Ki-67) y Foxp3/conjunto de tampones de tinción de factor de transcripción (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Mass.). El porcentaje de Ki67 en los tipos celulares anteriores se midió mediante el uso de FACS (representados en las Figuras 17A-C). Los datos muestran que las proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc ilustrativas indujeron una fuerte proliferación de células T $CD8^+$ y células NK.

2. Proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc modificadas por ingeniería genética para reducir la potencia

Con el fin de mejorar además la PK y prolongar la vida media, razonamos que disminuir la potencia de las fusiones de IL-15/Rα-Fc disminuiría la penetración del antígeno y, por lo tanto, aumentaría la vida media circulante. Al examinar la estructura de cristal de las interfaces IL-15:IL-2Rß e IL-15:cadena gamma común, así como el modelado mediante el uso del software MOE, predijimos que los residuos en estas interfaces pueden sustituirse con el fin de reducir la potencia. La Figura 18 representa un modelo estructural de los complejos IL-15:receptor que muestran ubicaciones de los residuos predichos donde realizamos sustituciones isostéricas por ingeniería genética (con el fin de reducir el riesgo de inmunogenicidad). Las secuencias para las variantes ilustrativas de IL-15 diseñadas genéticamente con el objetivo de reducir la potencia se representan en la Figura 19.

Los plásmidos que codifican IL-15 o IL-15Rα(sushi) se construyeron mediante síntesis génica estándar, seguida de subclonación en un vector de expresión pTT5 que contiene parejas de fusión Fc (por ejemplo, regiones constantes como se representa en la Figura 10). Las sustituciones identificadas como se describieron anteriormente se incorporaron mediante técnicas de mutagénesis estándar. Las proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc ilustrativas del formato “scIL-15/Rα-Fc” modificadas por ingeniería genética para reducir la potencia incluyen XENP29281, XENP24050, XENP29284, XENP29285, XENP29286, cuyas secuencias se representan en la Figura 21. Las proteínas se produjeron y purificaron como se describe generalmente en el ejemplo 1A.

a. Actividad in vitro de las proteínas de fusión de scIL-15/Rα-Fc que comprenden variantes de IL-15 diseñadas genéticamente para disminuir la potencia

Se probaron proteínas de fusión de scIL-15/Rα-Fc ilustrativas que comprenden variantes de IL-15 en ensayos de proliferación celular. Se incubaron PBMC humanas con los artículos de prueba indicados a las concentraciones indicadas durante 3 días. Después de la incubación, las PBMC se tiñeron con anti-CD3-PE (OKT3), anti-CD4-FITC (RPA-T4), anti-CD8-eF660 (SIDI8BEE), anti-CD16-BV421 (3G8), anti-CD45RA-APC/Fire750 (HI100), anti-CD56-BV605 (5.1H11) y anti-Ki67-PE/Cy7 (Ki-67) y se analizaron por citometría de flujo. La Figura 22 representa el porcentaje de poblaciones celulares T CD4 y CD8 que expresan Ki67 indicativo de proliferación.

Los datos muestran que varias de las fusiones de scIL-15/Rα-Fc ilustrativas que comprenden variantes de IL-15 diseñadas genéticamente con el objetivo de reducir la potencia demostraron una potencia reducida con relación a las fusiones de scIL-15/Rα-

Fc que comprenden WT IL-15. En particular, los datos muestran que las fusiones de scIL-15/Rα-Fc que comprenden la variante de IL-15(D30N/E64Q/N65D) no tenían actividad o una actividad drásticamente reducida en la proliferación de varias poblaciones de linfocitos en el contexto de fusiones de scIL-15/Rα-Fc, en comparación con fusiones de scIL-15/Rα-Fc que comprenden variantes de IL-15(N4D/N65D) o IL-15(D30N/N65D). Por otro lado, la fusión de scIL-15/Rα-Fc que comprende la variante de IL-15(D30N) tuvo poca a ninguna reducción en la potencia con respecto a la fusión de scIL-15/Rα-Fc que comprende WT IL-15.

B. Ejemplo 2: Brazo dirigido a PD-1

Como se describió anteriormente, la expresión de PD-1 se regula positivamente en linfocitos infiltrantes de tumores activados. Por consiguiente, dirigir las proteínas de fusiones de IL-15/Rα-Fc de la invención a linfocitos que expresan PD-1 podría ser un enfoque útil para dirigir las fusiones de IL-15/Rα-Fc al entorno tumoral y evitar la toxicidad sistémica. Además, ya que sería útil combinar las proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas de la invención con anticuerpos de bloqueo a PD-1, o administrar proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas de la invención después del tratamiento con anticuerpos de bloqueo a PD-1, es importante que el brazo dirigido a PD-1 de la proteína de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida no se una al mismo o similar epítopo que el anticuerpo de bloqueo a PD-1. Los anticuerpos de bloqueo a PD-1 contemplados en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, nivolumab y pembrolizumab.

Las secuencias para varios mAb anti-PD-1 cuyas regiones variables se contemplan para usar en la presente descripción se representan en las Figuras 25-26. Para investigar si los dominios de unión anti-PD-1 descritos anteriormente compitieron con nivolumab y pembrolizumab, realizamos una caracterización de epítopos en tándem en los mAb quiméricos. La caracterización de epítopos en tándem se realizó mediante el uso del instrumento Octet HTX. Los biosensores HIS1K se usaron en primer lugar para capturar PD-1-His, seguido de inmersión en 100 nM de un primer anticuerpo y luego inmersión en 100 nM de un segundo anticuerpo. Los anticuerpos probados fueron XENP16432 (un mAb anti-PD-1 bivalente basado en nivolumab; secuencia representada en la Figura 24A), XENP21461 (pembrolizumab; secuencia representada en la Figura 24B, mAb quimérico A, mAb quimérico B y un mAb basado en 1C11. También se incluyó PD-L1-Fc para investigar el bloqueo de la interacción PD-1: PD-L1 por los anticuerpos. Las respuestas de BLI se normalizaron frente a la respuesta de BLI de sumergir el biosensor

en tampón HBS-EP seguido de inmersión en los anticuerpos anti-PD-1. Si el par de anticuerpos proporcionaba una respuesta BLI normalizada inferior a 0,5, se consideraba que el par competía o competía parcialmente y estaba en el mismo grupo de epítopos, es decir, reconocía epítopos muy similares o que se solapaban en gran medida. Si el par de anticuerpos proporcionaba una respuesta BLI normalizada superior a 0,5, se consideraba que el par no competía y se unía a diferentes epítopos. La respuesta BLI normalizada para cada uno de los pares de anticuerpos se resume en la Figura 27.

La caracterización muestra que el mAb A y el mAb B anti-PD-1 no compiten con nivolumab o pembrolizumab, mientras que el mAb basado en 1C11 compite con nivolumab y pembrolizumab. Además, mAb A no parece bloquear la interacción PD-1:PD-L1, mientras que mAb B bloquea la interacción PD-1:PD-L1.

Para mayor facilidad, los dominios de unión a PD-1 que compiten con nivolumab y/o pembrolizumab se denominan en la presente descripción anti-PD-1[C], y los dominios de unión a PD-1 que no compiten con nivolumab y/o pembrolizumab se denominan anti-PD-1[NC].

C. Ejemplo 3: Fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1

Aquí, describimos la generación y caracterización de fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1, denominadas en conjunto en la presente descripción como fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1.

1. Generación y caracterización física de fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1

Los plásmidos que codifican IL-15, dominio sushi de IL-15Rα, o las regiones variables anti-PD-1 se construyeron mediante síntesis génica estándar, seguida de subclonación en un vector de expresión pTT5 que contiene parejas de fusión Fc (por ejemplo, regiones constantes como se representa en la Figura 11). En la Figuras 28 se representan dibujos esquemáticos de fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 ilustrativas.

Un formato ilustrativo particular, el formato “scIL-15/Rα x Fab” (Figura 28C) comprende IL-15Rα(sushi) fusionado a IL-15 mediante un enlazador de longitud variable (denominado “scIL-15/Rα”) que luego se fusiona al N-terminal de una región Fc heterodimérica, con una cadena pesada variable (VH) fusionada al otro lado del Fc heterodimérico, mientras que una cadena ligera correspondiente se transfecta por separado para formar un Fab con la VH.

Generamos fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 en este formato con brazos dirigidos anti-PD-1[C] y brazos dirigidos anti-PD-1[NC]. Las fusiones que comprenden brazos dirigidos anti-PD-1[C] se denominan en la presente descripción fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [C]PD-1, mientras que las fusiones que comprenden brazos dirigidos anti-PD-1[NC] se denominan en la presente descripción, fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1.

Como se describe en el ejemplo 1B(a), las fusiones de scIL-15/Rα-Fc que comprenden la variante de potencia IL-15(D30N/D64N/N65D) fueron casi completamente inactivas en la proliferación de diversas poblaciones de linfocitos. En consecuencia, generamos prototipos de fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 (tanto [C] como [NC]) con la variante de IL-15(N4D/N65D). Se generaron fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [C]PD-1 prototipo mediante el uso de las regiones variables de 1C11 humanizado, y se generaron fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 prototipo mediante el uso de la variable regiones de mAb A y mAb B humanizados. Las secuencias para una proteína de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a [C]PD-1 ilustrativa como tal se representan en la Figura 29; y las secuencias para las proteínas de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 ilustrativas como tales se representan en la Figura 30. La proteína de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a [C]PD-1 ilustrativa XENP25850 y las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 también se generaron con Fc de Xtend (M428L/N434S). También se generó una proteína de fusión de control de IL-15/Rα-Fc dirigido a RSV, XENP26007, cuyas secuencias se representan en la Figura 31.

Las proteínas se produjeron mediante transfección transitoria en células HEK293E y se purificaron mediante un proceso de purificación de dos etapas que comprenden cromatografía de proteína A y cromatografía de intercambio iónico.

2. 3B: las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 se activan in vitro

En un primer experimento que investigaba la actividad de la fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a PD-1, se estimularon PBMC humanas durante 48 horas con 100 ng/mL de anti-CD3 (OKT3) unido a la placa, luego se marcaron con CFSE y se incubaron con los artículos de prueba indicados durante 4 días a 37 ºC. La proliferación de células T $CD8^+$ y $CD4^+$ se midió por dilución de CFSE y se usó colorante Zombie para excluir las células muertas. Los datos que representan el porcentaje de proliferación de células T $CD8^+$ y células T $CD4^+$ se representan en la Figura 32.

Los datos muestran que cada una de las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 (versiones [C] y [NC]) son activas en la proliferación de células T $CD8^+$ y $CD4^{+.}$ Además, la fusión de control de IL-15/Rα-Fc dirigido a RSV también fue activa en la proliferación de células T, mientras que el mAb anti-PD-1 XENP28519 solo no lo fue.

3. Las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 son selectivas para los linfocitos activados

Después de la unión de las citocinas a sus receptores, las quinasas Janus (JAK) asociadas con los receptores fosforilan las proteínas STAT, que luego se trasladan al núcleo para regular los procesos corriente abajo. Por lo tanto, la fosforilación de proteínas STAT (en particular, STAT5, que incluye STAT5a y STAT5b) es uno de los primeros eventos de señalización desencadenados por la unión de IL-15 a sus receptores. En consecuencia, se investigó la capacidad de las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 de inducir la fosforilación de STAT5 en varios tipos celulares.

Para este experimento, se usaron PBMC tanto frescas como activadas. Las PBMC activadas, usadas como sustitutos para linfocitos activados en el entorno tumoral, que tienen las expresión de PD-1 se prepararon al estimular las PBMC frescas con 100 ng/mL de anti-CD3 (OKT3) unido a la placa durante 2 días. Se incubaron PBMC frescas y activadas con XENP25850 a las concentraciones indicadas durante 15 minutos a 37 ^{o}C. Para clasificar las diversas poblaciones celulares después de la incubación, las PBMC se tiñeron con anti-CD3-BUV395 (UCHT1), anti-CD4-BV605 (RPA-T4) y anti-CD8-Alexa700 (SK1) durante 30-45 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron e incubaron durante 20-60 minutos con 90 % de metanol que se enfrió previamente (-20 ^{o}C). Después de la incubación con metanol, las células se volvieron a lavar y se tiñeron con anti-CD25-BV421 (M-A251), anti-CD45RA-BV510 (HI100) y anti-pSTAT5-Alexa647 (pY687) para marcar las diversas poblaciones celulares y la fosforilación de STAT5. Los datos que representan la inducción de la fosforilación de STAT5 en varias poblaciones celulares T $CD8^+$ y $CD4^+$ se representan en la Figura 33. En particular, los datos muestran que la proteína de fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a PD-1, XENP25850, demostró un efecto aumentado sobre las células T de las PBMC activadas mientras mantenía un efecto mínimo sobre las células T de las PBMC frescas. Esto sugiere que, en un entorno clínico, las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 serán selectivas para linfocitos infiltrantes de tumores activados en el entorno tumoral.

D. Ejemplo 4: Las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 se combinan con el bloqueo de PD-1

1. El bloqueo de PD-1 no interfiere con la actividad de las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 in vitro

Se estimularon las PBMC frescas con 100 ng/mL de anti-CD3 (OKT3) unido a la placa durante 2 días. Las PBMC activadas se preincubaron durante 30 minutos con 100 µg/mL de XENP16432, pembrolizumab o XENP15074 (mAb anti-RSV como control). Después de la preincubación, se incubaron las PBMC frescas con los artículos de prueba indicados a las concentraciones indicadas durante 15 minutos a 37 °C. Para clasificar varias poblaciones celulares después de la incubación, las PBMC se tiñeron primero con anticuerpos anti-CD3-BUV395 (UCHT1), anti-CD4-BV605 (RPA-T4), anti-CD25-BV421 (M-A251) y anti-CD45RA-BV510 (HI100). Después de la primera tinción, las células se permeabilizaron mediante el uso de PerFix EXPOSE (Beckman Coulter, Indianápolis, Ind.). Después de la permeabilización, las células se tiñeron con anti-CD8-PerCP/Cy5.5 (RPA-T8), anti-pSTAT5-AF647 y anti-PD-1-APC-Fire750 (EH12.2H7). Después de la segunda tinción, las células se analizaron por citometría de flujo para investigar la fosforilación de STAT5 en células T CD8+CD45RA-CD25+PD-1+ (como se representa en la Figura 34) y CD4+CD45RA-CD25+PD-1+ (datos no mostrado).

Los datos muestran que la preincubación de PBMC con XENP16432 o pembrolizumab redujo la activación de células T por la fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a [C]PD-1 XENP25937 en comparación con cuando las PBMC se preincubaron con mAb anti-RSV XENP15074, que indica, como se esperaba, que los mAb anti-PD-1 impidieron la unión de la fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a [C]PD-1 XENP25937 a células T. Por otro lado, la preincubación de PBMC con XENP16432 o pembrolizumab no afectó la activación de las células T por la fusión IL-15/Rα-Fc dirigida a [NC]PD-1 XENP28523 en comparación con cuando las PBMC se preincubaron con mAb anti-RSV XENP15074. Esto sugiere que las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 podrían apilarse con mAb anti-PD-1 sin efecto negativo.

2. Las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 se combinan sinérgicamente con el bloqueo de PD-1 in vivo

Las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigida a PD-1 se evaluaron en un modelo de enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) conducido en ratones inmunodeficientes NSG (NOD-SCID-gamma). Cuando se injertan ratones NSG con PBMC humanas, las PBMC

humanas desarrollan una respuesta autoinmune contra las células de ratón y posteriormente GVHD. Como tal, la GVHD es un modelo de respuesta antitumoral. El tratamiento de ratones NSG injertados con huPBMC con fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 debería potenciar la proliferación de las células T injertadas y potenciar la GVHD.

En un primer estudio de GVHD, los ratones NSG se injertaron con 10 x 10^6 de PBMC humanas a través de IV-OSP en el día -1 y se dosificaron por vía intraperitoneal con los artículos de prueba indicados a las concentraciones indicadas en los días 0, 7, 14 y 21. Los pesos corporales se evaluaron dos veces por semana como un indicador de GVHD (cambio en el peso corporal como porcentaje del peso corporal inicial representado en la Figura 35), y se extrajo sangre los días 7, 10 y 14 para evaluar la expansión de varios linfocitos (los datos para el día 14 se representan respectivamente en la Figura 36). La expresión de CD25 en células T CD8+ y CD4 + también se evaluó como un marcador de activación de células T (como se representa en la Figura 37).

Los datos muestran que cada una de las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 (tanto [C] como [NC]) mejoraron la GVHD en comparación con el bloqueo de PD-1 solo (ya sea XENP16432 o XENP28437) así como por scIL-15/Rα-Fc XENP24050 solo como lo indican los recuentos de células CD45+, células T CD3+, células T CD8+ y células T CD4+. Sin embargo, de acuerdo con los datos in vitro anteriores, la combinación de la fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a [C]PD-1 XENP25850 con XENP28437 condujo a una reducción en los diversos recuentos de células, mientras que combinaba fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 XENP28532 (basado en el mAb A) y XENP28692 (basado en el mAb B) dieron como resultado GVHD adicionalmente mejorado como se indica por los recuentos de células. También se observa una tendencia similar mediante el uso del cambio en el peso corporal como indicador de GVHD como se representa en la Figura 35, así como para la activación de las células T CD8+ y CD4+ como se representa en la Figura 37. Además, como se representa en la Figura 38, parece haber una preferencia para las células T CD4+ por las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 como se indica por una relación más baja de células T CD8+ a CD4+.

En un segundo estudio de GVHD, los ratones NSG se injertaron con 10 x 106 de PBMC humanas a través de IV-OSP en el día -1 y se dosificaron por vía intraperitoneal con los artículos de prueba indicados a las concentraciones indicadas en los días 0, 7, 14 y 21. Los pesos corporales se evaluaron dos veces por semana como un indicador de GVHD

y se extrajo sangre los días 7, 10 y 14 para evaluar la expansión de varios linfocitos (como se representa en la Figura 39 para el día 10). La expresión de CD25 en células T CD8+ y CD4+ también se evaluó como se representa en la Figura 40.

Como anteriormente, los datos muestran que la fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a [NC]PD-1 expandió los recuentos de células T en comparación con el bloqueo anti-PD-1 solo. Además, los datos muestran una clara respuesta a la dosis para la expansión de células T, como lo indica la GVHD mejorada con concentraciones más altas (0,3 mg/kg frente a 0,1 mg/kg) de la fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a [NC]PD-1 XENP28532. En particular, la combinación de XENP28532 (a 0,3 mg/kg) y mAb de bloqueo a PD-1 XENP28437 mejoró la expresión de CD25 en células T CD8+ y CD4+.

E. Ejemplo 5: Generación de fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 que tienen variantes alternativas de potencia de IL-15

1. Las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 que comprenden la variante de IL-15(N4D/N65D) demuestran una farmacocinética menos que favorable

En otro estudio para investigar la farmacocinética de las variantes de potencia de IL-15/Rα-F con Xtend, se administraron a monos cinomolgos una primera dosis única intravenosa (i.v.) de XENP22853 (WT IL-15/Rα-heteroFc con Xtend), XENP24306 (IL-15(D30N/E64Q/N65D)/Rα-heteroFc con Xtend), XENP24113 (IL-15(N4D/N65D)/Rα-heteroFc con Xtend), XENP24294 (scIL-15(N4D/N65D)/Rα-Fc con Xtend), y XENP25937 (IL-15(N4D/N65D)/Rα-Fc dirigida a [C]PD-1 con Xtend) a concentraciones variables.

La Figura 41 representa la concentración sérica de los artículos de prueba con el tiempo después de la primera dosis. Como se esperaba, la incorporación de variantes de potencia además de la sustitución de Xtend (como en XENP24306 y XENP24113) mejora en gran medida la farmacocinética de las fusiones de IL-15/Rα-Fc (en comparación con XENP22583). Inesperadamente, la fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a PD-1 XENP25937 que comprende la variante de IL-15(N4D/N65D) demostró una farmacocinética sustancialmente inferior en comparación con XENP24306. De manera similar, la fusión de IL-15/Rα-heteroFc XENP24113 y la fusión de scIL-15/Rα-Fc XENP24294 (que tienen la misma variante de potencia IL-15(N4D/N65D)) demostraron una farmacocinética reducida en comparación con XENP24306. Esto sugiere que la farmacocinética inferior puede deberse a la variante de potencia de IL-15 particular en lugar del formato de la fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a PD-1. Si bien se esperaba una

disminución en la farmacocinética para XENP25937 (así como también XENP24113) en base a las fusiones de IL-15/Rα-Fc que tienen la variante de IL-15(N4D/N65D) que demuestra una mayor potencia in vitro que las fusiones de IL-15/Rα-Fc que tienen la variante de IL-15(D30N/E64Q/N65D) (como se representa en el ejemplo 1B(a)), la disminución en la farmacocinética fue inesperadamente desproporcionada con respecto al aumento en la potencia. En consecuencia, se buscó identificar variantes de potencia de IL-15 alternativas para usar en las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 de la invención.

2. Modificación por ingeniería genética de fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 que comprenden variantes de IL-15 con modificaciones en la interfaz IL-15:CD132

Se observó que la variante de IL-15(N4D/N65D) tiene sus dos sustituciones en la interfaz de IL-15 responsables de la unión a CD122, mientras que IL-15(D30N/E64Q/N65D) tiene dos sustituciones (E64Q y N65D) en la interfaz IL-15:CD122; y una sustitución (D30N) en la interfaz IL-15 responsable de la unión a CD132. En consecuencia, razonamos que la modificación en la interfaz IL-15:CD132 puede contribuir a la farmacocinética superior observada para XENP24306. Por lo tanto, generamos fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 ilustrativas adicionales que comprenden las variantes de IL-15(D30N/N65D), cuyas secuencias se representan en la Figura 42.

F. Ejemplo 6: Las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 inducen la internalización de PD-1 en las células T

En otro experimento que investigaba la actividad de la fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a PD-1, se incubaron PBMC humanas marcadas con CFSE durante 4 días a 37 °C con 20 ng/mL de anti-CD3 (OKT3) unido a la placa y lo siguiente artículos de prueba: XENP28532 (fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a PD-1 que comprende un brazo de αPD-1 basado en el mAb A), XENP24306 (fusión de IL-15/Rα-Fc no dirigida al control) y XENP26007 (fusión de control de IL-15/Rα-Fc dirigido a RSV). A continuación, las células se marcaron con αPD-1 XENP16432, que, como se muestra en el ejemplo 2C y la Figura 34, no compite por la unión con el brazo dirigido a PD-1 de XENP28532, y se analizaron mediante citometría de flujo. Los datos que representan el porcentaje de diversas poblaciones celulares T que son PD-1+ se representan en la Figura 44. Sorprendentemente, observamos una reducción dependiente de la dosis de PD-1 en las células T después del tratamiento con la fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a PD-1, en

comparación con el tratamiento con los controles XENP24306 y XENP26007, lo que indica que los receptores PD-1 se internalizaron. Esto sugiere una posible acción de larga duración para la IL-15/Rα-G. Fc dirigida a PD-1, en donde después del aclaramiento eventual de las moléculas de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1, la inhibición inmune por ligandos de PD-1 (por ejemplo, PD-L1 y PD-L2) podría permanecer disminuida.

G. Ejemplo 7: Identificación de un mAb C a [NC]PD-1 de cinomolgos con reactividad cruzada

Para facilitar el desarrollo clínico, es útil investigar varios parámetros de las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 tales como farmacocinéticas, farmacodinámicas y toxicidad en monos cinomolgos. En consecuencia, buscamos identificar los brazos dirigidos a [NC]PD-1 con reactividad cruzada para PD-1 humana y de cinomolgos. Identificamos un dominio de unión anti-PD-1 adicional (referido en la presente descripción como mAb C) que humanizamos mediante el uso de la optimización del contenido de cadenas (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. No. 7,657,380, emitida el 2 de febrero de 2010), cuyas secuencias se representan en las Figuras 43 (secuencias de dominio variable) y 45 (mAb bivalentes como XENP28536, XENP28537, XENP28538 y XENP28539).

1. El mAb C anti-PD-1 tiene reactividad cruzada para PD-1 humana y cinomolgos

Investigamos la unión de XENP28536, XENP28537, XENP28538 y XENP28539 a PD-1 humana y de cinomolgos mediante el uso de Octet, como se describió en general anteriormente. En particular, se usaron biosensores anti-Fc humano (AHC) para capturar los anticuerpos y se sumergieron en múltiples concentraciones de PD-1-His humana y de cinomolgos para determinar KD, cuyos datos se representan en la Figura 46. Los datos muestran que las variantes humanizadas XENP25836 y XENP25837 se unieron a humanos y cinomolgos con KD similar. En particular, las variantes humanizadas XENP25838 y XENP28539 perdieron su capacidad para unirse a PD-1 tanto de humanos como de cinomolgos. En comparación, XENP28519 (mAb A humanizado) se une más estrechamente a PD-1 humana, pero no presenta reactividad cruzada para PD-1 de cinomolgos.

2. El mAb C anti-PD-1 no compite por la unión con nivolumab y pembrolizumab

Para investigar si el mAb C compitió con nivolumab y pembrolizumab, realizamos una caracterización de epítopos en tándem en el mAb C quimérico como se describe en el

ejemplo 2C. Los datos se representan en la Figura 47 para XENP16432, XENP21461 y mAb C quimérico. La caracterización muestra que el mAb C anti-PD-1 no compite con nivolumab o pembrolizumab, y es un bloqueador parcial de la interacción PD-1:PD-L1.

H. Ejemplo 8: Fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 basadas en el mAb C

Las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 en el formato “scIL-15/Rα x Fab” basadas en variantes de mAb C e IL-15 se diseñaron por ingeniería genética y produjeron como se describe generalmente en el ejemplo 3, cuyas secuencias ilustrativas se representan en la Figura 48. Cabe señalar que las fusiones se produjeron con variantes de IL-15(N4D/N65D), así como variantes de IL-15(D30N/N65D) en línea con la noción descrita en el ejemplo 5 de que las variantes de IL-15 que comprenden modificaciones en la interfaz IL-15:CD132 pueden tener farmacocinéticas mejoradas. Además, las secuencias para los análogos Fc de Xtend (M428L/N434S) se representan en la Figura 49.

1. 8A: Las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 basadas en el mAb C son activas in vitro

a. 8A(a): Inducción de la proliferación de células T

Las PBMC humanas se estimularon con 500 ng/mL de anti-CD3 (OKT3) unido a la placa durante 48 horas, se marcaron con CFSE y se incubaron durante 4 días a 37 °C con los siguientes artículos de prueba: XENP28543 (IL-15/Rα-Fc dirigida a [NC]PD-1 basado en el mAb C_H1L1 e IL-15(N4D/N65D)), XENP28532 (IL-15/Rα-Fc dirigida a [NC]PD-1 basado en el mAb A_H1L1 e IL-15(N4D/N65D)), XENP24306 (IL-15/Rα-heteroFc no dirigido basado en IL-15(D30N/E64Q/N65D)) y XENP26007 (control de IL-15/Rα-Fc dirigido a RSV basado en motavizumab e IL-15(N4D)/N65D)). Después de la incubación, las células se tiñeron con los siguientes anticuerpos: anti-LAG-3-PE (3DS223H), anti-CD8-PerCP-Cy5.5 (SK1), anti-CD3-PE-Cy7 (OKT3), anti-PD-1-Alexa647 (XENP16432, teñido con el estuche de marcaje de anticuerpos Alexa Fluor™ 647), anti-CD45RO-APC-Fire750 (UCHL1), anti-HLA-DR-Alexa700 (L243), anti-TIGIT-BV421 (A15153G), anti-CD16-BV605 (3G6), anti-CD56-BV605 (HCD56), anti-CD25-BV711 (M-A251), anti-CD45RA-BV785 (HI100), anti-CD4-BUV395 (SK3) y Zombie Aqua-BV510 y se analizaron por flujo de varias poblaciones celulares.

Investigamos la proliferación de diversas poblaciones celulares T basadas en la dilución de CFSE (Zombie Aqua para excluir las células muertas), cuyos datos se representan en la Figura 50. Ambas fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 indujeron la

proliferación de células T CD8+ y CD4+. En particular, las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 son más potentes para inducir la proliferación de células T $CD4^+$ en comparación con la fusión de IL-15(D30N/E64Q/N65D)/Rα-Fc no dirigida (así como la fusión de control de IL-15/Rα-Fc dirigido a RSV), pero menos potente para inducir la proliferación de células T CD8+. Además, XENP28532 (brazo dirigido a PD-1 basado en el mAb A) parecía más potente que XENP28543 (brazo dirigido a PD-1 basado en el mAb C) para inducir la proliferación de células T CD8+ y CD4+.

Curiosamente, como se muestra en la Figura 51, XENP28532 fue más potente para inducir la proliferación de células T CD8+LAG-3+ en comparación con la fusión de IL-15(D30N/E64Q/N65D)/Rα-Fc no dirigida (así como la fusión de control de IL-15/Rα-Fc dirigido a RSV). Además, XENP28543 fue más potente para inducir la proliferación de células T CD8+LAG-3+ que la proliferación de células T CD8+ en masa (EC50 276,8 frente a 71,94). En conjunto, esto apoya la idea de que las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 pueden ser selectivas para las células T que expresan puntos de control tales como los que se encontrarían en el entorno tumoral.

También investigamos la proliferación de poblaciones de memoria (CD45RA-) y vírgenes (CD45RA+), como se representan en la Figura 52. En particular, mientras que las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 fueron más potentes que la fusión de IL-15(D30N/E64Q/N65D)/Rα-Fc no dirigida para inducir la proliferación de células T CD4+CD45RA-, eran menos potentes para inducir la proliferación de células T CD4+CD45RA+, lo que sugiere una selectividad por las células T de memoria.

Finalmente, investigamos la expresión de PD-1 en varias poblaciones celulares T (teñidas mediante el uso de XENP16432, que, como se muestra en la presente descripción, se une a un epítopo diferente que el mAb A y el mAb C). Los datos, como se representan en la Figura 53, muestran una reducción dependiente de la dosis de PD-1 en células T CD4+CD45RA- después del tratamiento con ambas fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1, en comparación con el tratamiento con los controles XENP24306 y XENP26007, lo que indica que los receptores PD-1 fueron internalizados. En particular, la regulación negativa de PD-1 fue inducida de manera más potente por XENP28532, con un brazo dirigido a PD-1 basado en el mAb A.

b. 8A(b): Inducción de secreción de citocinas

Las PBMC humanas se preestimularon con diversas concentraciones de anti-CD3 (OKT3) unidos a la placa durante 48 horas a 37 °C, se marcaron con CFSE y se incubaron con los artículos de prueba indicados durante 4 días a 37 °C. El sobrenadante se recolectó y evaluó mediante el estuche de panel proinflamatorio 1 humano V-PLEX (de acuerdo con el protocolo del fabricante; Meso Scale Discovery, Rockville, Md). Los datos representados en la Figura 54 muestran que tanto XENP28532 como XENP28543 fueron capaces de estimular de forma potente la secreción de IFNγ. En particular, XENP28532 (brazo dirigido a PD-1 basado en el mAb A) parecía más activo que XENP28543 (brazo dirigido a PD-1 basado en el mAb C) en la inducción de la secreción de IFNγ.

c. 8A(c): el bloqueo de PD-1 no interfiere con la actividad de la fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a [NC]PD-1 basada en el mAb C in vitro

Investigamos la interferencia potencial del bloqueo de PD-1 con la actividad de la fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a [NC]PD-1 basada en el mAb C como se describe en el ejemplo 4A. Los datos que se representan en la Figura 55 muestran que la preincubación de PBMC con XENP16432 o pembrolizumab no afectó la activación de las células T por la fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a [NC]PD-1 XENP28543 en comparación a cuando las PBMC se preincubaron con mAb anti-RSV XENP15074. Esto sugiere que las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 con el brazo dirigido a PD-1 basadas en el mAb C podrían apilarse con mAb anti-PD-1 sin efecto negativo.

2. 8B: Las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 basadas en el mAb C mejoran la GVHD in vivo y se combinan con el bloqueo de PD-1

En el segundo estudio de GVHD descrito en el ejemplo 4B, también investigamos la actividad in vivo de XENP28543 a diversas concentraciones, solo y en combinación con el bloqueo de PD-1. Los datos que representan el cambio en el peso corporal (como porcentaje del peso corporal inicial) a lo largo del tiempo se representan en la Figura 56, y los datos que representan el peso corporal (como porcentaje del peso corporal inicial) en los días 11, 14 y 18 se representan en la Figura 57. También investigamos la expansión y activación de varias poblaciones de linfocitos, cuyos datos se representan en las Figuras 58-59 para el día 14. En conjunto, los datos muestran que la combinación de la fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a [NC]PD-1 con el bloqueo de PD-1 mejoró significativamente la GVHD sobre el tratamiento con fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 solas. La mejora en efecto es especialmente pronunciada en el contexto de

combinaciones de concentraciones más bajas (es decir, 0,1 mg/kg) de fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 con bloqueo de PD-1.

3. 8C: Las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 basadas en el mAb C se combinan con el bloqueo de PD-1 para mejorar la actividad antitumoral en ratones NSG En el día -15 los ratones NSG (10 por grupo) se inocularon por vía intradérmica con 3 x 106 células MCF-7 transducidas con pp65. A continuación, los ratones se inyectaron por vía intraperitoneal con 5 x 106 PBMC humanas (o PBS para el control) y se trataron con los artículos de prueba indicados en el día 0, y se trataron además con los artículos de prueba indicados en los días 7, 14, 21, 29 y 36. El volumen del tumor se midió con un calibre tres veces por semana, los pesos corporales se midieron una vez por semana y se extrajo sangre una vez por semana.

El volumen del tumor a lo largo del tiempo se representa en la Figura 60, y el volumen del tumor en los días 26, 28, 30, 33, 35 y 37 se representa en la Figura 61. Los datos muestran que el día 28, la combinación de XENP28543 con el bloqueo de PD-1 redujo significativamente el tamaño del tumor durante el tratamiento con el bloqueo de PD-1 solo. También investigamos la expansión y activación de varias poblaciones de linfocitos, cuyos datos se representan en las Figuras 62-63. En particular, las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1, solas o en combinación con el bloqueo de PD-1, permitieron una inducción temprana significativamente mejorada (día 7 posterior a la dosis) de la activación de células T CD8+ en comparación con bloqueo de PD-1 solo; y ambas, las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 en combinación con el bloqueo de PD-1 permitieron una inducción temprana significativamente mejorada (día 7 posterior a la dosis) de la activación de células T CD4+ en comparación con el bloqueo de PD-1 solo. Además, para el día 14, las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1, solas o en combinación con el bloqueo de PD-1, permitieron una expansión significativamente mejorada de numerosas poblaciones de linfocitos en comparación con el bloqueo de PD-1 solo.

I. Ejemplo 9: Fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 que tienen un brazo dirigido a PD-1 con afinidad optimizada

1. 9A: Optimización de la afinidad del ABD basado en el mAb C

Como se describe en el ejemplo 8A, en ciertos contextos tales como la regulación negativa in vitro de PD-1, la proliferación de células T y la inducción de la secreción de citocinas, XENP28532 (brazo dirigido a PD-1 basado en el mAb A) apareció más potente

y/o activo que XENP28543 (brazo dirigido a PD-1 basado en el mAb C). Como se indica en el ejemplo 7A, el mAb bivalente basado en el mAb A humanizado (XENP28519) se unió más fuertemente que el mAb bivalente basado en el mAb C humanizado (XENP28536) a PD-1 humana. En vista de esto, razonamos que la afinidad del brazo dirigido a PD-1 por PD-1 puede afectar la actividad de la fusión de la IL-15/Rα-Fc dirigida a PD-1. Por consiguiente, diseñamos por ingeniería genética variantes de afinidad optimizadas del mAb C. Se construyó una biblioteca de variantes mediante mutagénesis estándar para introducir mutaciones puntuales en las regiones pesadas o ligeras variables de XENP28536. Cuyas secuencias ilustrativas se representan en las Figuras 43 (secuencias de dominio variable) y 64 (mAb bivalentes). Las pantallas de afinidad de las variantes de mAb C[PD-1]_H1L1 diseñadas por ingeniería genética por afinidad (en formato IgG1 bivalente con variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236_/S267K) se realizaron en Octet como se describe en general anteriormente, cuyos datos se representan en la Figura 65. De 304 variantes que tienen una mutación de un solo punto en la región variable pesada o variable ligera, solo identificamos 11 variantes (incluidos los mAb C[PD-1]_H1_L1.1 y mAb_C[PD-1]_H1_L1.3) que tienen más de 2 veces la afinidad mejorada sobre la WT. Las sustituciones favorables de VH estaban en las posiciones 32, 52A y 97 (numeración según Kabat); y las sustituciones VL favorables estaban en las posiciones 27D, 30, 93 y 94 (numeración según Kabat).

Para mejorar aún más la afinidad, se combinaron variantes favorables de VH de sustitución única y variantes de VL de sustitución única. Estas nuevas variantes combinadas de VH/VL se construyeron en el contexto de fusiones de IL15/Rα-Fc dirigidas a PD-1. Los datos que representan la afinidad de las fusiones por PD-1 se muestran en la Figura 66. En particular, H1.19_L1.1 tiene una mayor afinidad que H1.132_L1.1, a pesar de que H1.132_L1 proporcionó una mayor afinidad que H1.19_L1, lo que sugiere una mejora de la afinidad sinérgica proporcionada por la sustitución de F32L en VH (numeración según Kabat) como en H1.19.

A continuación, se combinaron sustituciones simples favorables en la VH y/o la VL con nuevas variantes construidas en el contexto de fusiones de IL15/Rα-Fc dirigidas a PD-1. Los datos que representan la afinidad de las fusiones por PD-1 se representan en la Figura 67. La variante de triple sustitución VL L1.140 (que comprende histidina en la posición 27D, tirosina en la posición 30 y treonina en la posición 93; numeración de acuerdo con Kabat) demostró una mejora de 36 veces en la KD sobre el tipo salvaje, y

se combina bien con variantes de VH (por ejemplo, H1.132 y H1.175) para ejercer una mejora de ~ 100 veces en la KD sobre el tipo salvaje.

En particular, se generó una escalera de variantes de afinidad al combinar sustituciones individuales en VH o VL, así como mediante la combinación de variantes de VH y variantes de VL que encuentran uso para ajustar la potencia y selectividad de fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1.

Las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 en el formato “scIL-15/Rα x Fab” basadas en el mAb C de afinidad mejorada y variantes de IL-15 se diseñaron por ingeniería genética y se produjeron como se describe generalmente en el ejemplo 3, cuyas secuencias ilustrativas se representan en la Figura 68 como XENP30046, XENP30047, XENP30049 y XENP30050. Además, las secuencias para los análogos Fc de Xtend (M428L/N434S) se representan en la Figura 69.

2. 9B: Las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 con unión mejorada de PD-1 tienen una actividad mejorada in vitro

A continuación, investigamos el impacto del brazo dirigido a PD-1 con afinidad mejorada (así como la variante de IL-15(D30N/N65D)) en las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 de la invención. Se estimularon PBMC humanas durante 48 horas con 500 ng/mL de anti-CD3 (OKT3) unido a la placa y luego se marcaron con CFSE y se incubaron con los artículos de prueba durante 4 días a 37 ºC. Las células se tiñeron con los siguientes anticuerpos: anti-CD8-PerCP-By5.5 (SK1), anti-CD3-PE-Cy7 (OKT3), anti-PD-1-Alexa647 (XENP16432, teñido con el estuche de marcaje de anticuerpos Alexa Fluor™ 647), anti-CD45RO-APC-Fire750 (UCHL1), anti-HLA-DR-Alexa700 (L243), anti-CD107a-BV421 (H4A3), anti-CD16-BV605 (3G6), anti-CD56-BV605 (HCD56), anti-CD25-BV711 (M-A251), anti-CD45RA-BV785 (M-A251), anti-CD4-BUV395 (SK3), y Zombie Aqua (BV510) y se analizaron por citometría de flujo de diversas poblaciones celulares.

Investigamos la proliferación de diversas poblaciones celulares T basadas en la dilución de CFSE (Zombie Aqua para excluir las células muertas), cuyos datos se representan en la Figura 70; la activación de diversas poblaciones celulares T basadas en la expresión de CD25 (un marcador de activación de células T en etapa tardía), cuyos datos se representan en las Figuras 71-72; y expresión de PD-1 en diversas

poblaciones, cuyos datos se representan en la Figura 73 para células T CD4+CD45RA-PD-1+.

En conjunto, los datos muestran que la actividad de las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 se correlaciona con la afinidad por PD-1. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 70, XENP30046 (que tiene un brazo dirigido a PD-1 con afinidad mejorada) induce la proliferación de células T CD8+ y CD4+ de manera más potente que XENP28543 (aumento de 2 veces). En particular, incluso la regulación negativa de PD-1 en células T por las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 se correlaciona con la afinidad a PD-1, como se muestra en la Figura 73. Además, los datos muestran que la variante de IL-15(D30N/N65D) no afecta drásticamente la actividad de las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1.

3. 9C: las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 con unión a PD-1 mejorada tienen una actividad mejorada in vivo

Los ratones NSG se injertaron con 10 x 10^6 de PBMC humanas a través de IV-OSP en el día -1 y se dosificaron por vía intraperitoneal en los días 0, 7 y 14 con los siguientes artículos de prueba: XENP28437 (el mAb anti-PD-1 basado en pembrolizumab con variantes de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S67K), y XENP29481 (fusión de control de IL-15/Rα-Fc dirigido a RSV que tiene la variante de IL-15 D30N/N65D; cuyas secuencias se representan en la Figura 31). Los pesos corporales se evaluaron dos veces por semana como un indicador de GVHD, cuyos datos se representan en las Figuras 74-75 como un cambio en el peso corporal inicial. En particular, el tratamiento con XENP30046 solo (que tiene un brazo dirigido a PD-1 con afinidad mejorada) dio como resultado una pérdida de peso corporal significativa medida en los días 11 y 18 en comparación con el tratamiento con PBS, mientras que el tratamiento con XENP28543 solo no produjo una pérdida de peso significativa (en comparación con el tratamiento con PBS).

Se extrajo sangre los días 7, 10 y 14 para investigar la expansión de los linfocitos humanos, así como también para investigar la secreción de citocinas, cuyos datos se representan en la Figura 76. En conjunto, los datos muestran generalmente una actividad mejorada por las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 que tienen un brazo dirigido a PD-1 con afinidad mejorada. Además, los datos muestran que la IL-15/Rα-Fc dirigida a [NC]PD-1 se combina productivamente con el bloqueo de PD-1 (XENP28437).

Además, como se muestra en las Figuras 78 y 79, XENP30046 mejoró significativamente la expansión de células CD45+, células T CD3+, células T CD4+, células T CD8+ y células NK el día 11 en comparación con la dosificación con XENP28543 que se sostiene para todas las poblaciones (excepto las células NK) hasta el día 14. Además, como se muestra en la Figura 77, XENP30046 mejoró significativamente la activación temprana (día 7 posterior a la dosis) de las células T CD8+ y CD4+ (como lo indica la expresión de CD25) en comparación con XENP28543.

J. Ejemplo 10: Ajuste fino de la potencia y selectividad de las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 al ajustar la afinidad por PD-1 y la potencia de IL-15

Aunque las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 se diseñaron con el objetivo de dirigirlas al entorno tumoral a través del brazo dirigido a PD-1, el resto de citocina todavía es capaz de señalizar antes de llegar al sitio del tumor y puede contribuir a la toxicidad sistémica. En consecuencia, buscamos reducir además la potencia de IL-15 al construir fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 con la variante de IL-15(D30N/E64Q/N65D), que como se describe en el ejemplo 1B(a) tiene una actividad drásticamente reducida. Las secuencias para fusiones ilustrativas de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 que comprenden la variante de IL-15(D30N/E64Q/N65D) se representan en las Figuras 30 y 48-49 como XENP30428, XENP30429, XENP30430, XENP30519, XENP30516, XENP30517, y XENP30455. Además, construimos XENP30432, una fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a RSV que comprende la variante de IL-15(D30N/E64Q/N65D) (cuyas secuencias se representan en la Figura 32), para actuar como un sustituto para investigar el comportamiento de las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 que comprenden la variante de IL-15(D30N/E64Q/N65D) fuera del entorno tumoral.

1. 10A: La actividad in vitro de las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 ajustadas para la afinidad a PD-1 y la potencia de IL-15

La actividad in vitro de fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 adicionales que tienen diversas afinidades de unión a PD-1 y potencias de IL-15. Se estimularon PBMC humanas durante 48 horas con 500 ng/mL de anti-CD3 (OKT3) unido a la placa y luego se marcaron con CFSE y se incubaron con los artículos de prueba durante 4 días a 37 ºC. Las células se tiñeron con los siguientes anticuerpos: anti-CD8-PerCP-Cy5.5 (SK1), anti-CD3-PE-Cy7 (OKT3), anti-PD-1-Alexa647 (XENP16432, teñido con el estuche de marcaje de anticuerpos Alexa Fluor™ 647), anti-CD45RO-APC-Fire750 (UCHL1), anti-HLA-DR-Alexa700 (L243), anti-CD107a-BV421 (H4A3), anti-CD16-BV605 (3G6), anti-

CD56-BV605 (HCD56), anti-CD25-BV711 (M-A251), anti-CD45RA-BV785 (M-A251), anti-CD4-BUV395 (SK3), y Zombie Aqua (BV510) y se analizaron por flujo de diversas poblaciones celulares.

Investigamos la proliferación de diversas poblaciones celulares T basadas en la dilución de CFSE (Zombie Aqua para excluir las células muertas), cuyos datos se representan en la Figura 80; la activación de diversas poblaciones celulares T basadas en la expresión de CD25 (un marcador de activación de células T en etapa tardía), cuyos datos se representan en las Figuras 81-82; y expresión de PD-1 en diversas poblaciones, cuyos datos se representan en la Figura 83-84.

Los datos muestran que XENP30272 (que tiene una unión a PD-1 de mayor afinidad) es más potente para inducir la proliferación y activación de diversas poblaciones celulares T que XENP30046 (que tiene una unión a PD-1 de menor afinidad), lo que demuestra la importancia de ajustar la afinidad a PD-1. En particular, mientras que XENP30429 (fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 que tienen la variante de IL-15(D30N/E64Q/N65D)) fue solo 1,8 a 2.5 menos activo en las células T CD8+ y CD4+ en comparación con XENP30046 (fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 que tienen la variante de IL-15(N4D/N65D)), XENP30432 (sustituto IL-15/Rα-Fc dirigido a RSV que tiene la variante de IL-15(D30N/E64Q/N65D)) fue 12 veces menos activo en células T CD8+ y 530 veces menos activo en células T CD4+ en comparación con XENP30046 (basado en la actividad proliferativa como se representa en la Figura 80). Esto sugiere que las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 que tienen la variante de IL-15(D30N/E64Q/N65D) deberían retener la actividad en el entorno del tumor, mientras permanecen sustancialmente inactivas fuera del entorno del tumor.

2. 10B: Actividad in vivo de las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 sintonizadas para la potencia de IL-15

La expansión in vivo de linfocitos mediante fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 sintonizadas para la potencia de IL-15 se investigó en un estudio de GVHD. Los ratones NSG se injertaron con 10 x 106 de PBMC humanas a través de IV-OSP en el día -1 y se dosificaron por vía intraperitoneal con los artículos de prueba indicados a las concentraciones indicadas en los días 0, 7 y 14. Se extrajo sangre los días 7, 10 y 14 para evaluar la expansión y activación de varios linfocitos (cuyos datos se muestran en las Figuras 85-86). En conjunto, los datos muestran que cuando la afinidad a PD-1 es equivalente, la IL-15 de mayor potencia (por ejemplo, XENP30046) permite una mayor

expansión (y activación temprana) de las células T en comparación con la IL-15 de menor potencia (por ejemplo, XENP30429).

K. Ejemplo 11: IL-15/Rα-Fc dirigida a [NC]PD-1 con Xtend

Los análogos de Xtend de las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 se diseñaron por ingeniería genética con el objetivo de ampliar además las farmacocinéticas y farmacodinámicas, cuyas secuencias se representan a lo largo de las Figuras.

1. 11A: Los análogos de Xtend demuestran una actividad comparable in vitro

Investigamos si los análogos de Xtend eran comparables a las moléculas no Xtend. Se estimularon PBMC humanas durante 48 horas con 500 ng/mL de anti-CD3 (OKT3) unido a la placa y luego se marcaron con CFSE y se incubaron con los artículos de prueba durante 4 días a 37 ºC. Los artículos de prueba usados fueron fusiones de IL-15/Rα-XtendFc dirigidas con la variante de IL-15(N4D/N65D), IL-15(D30N/N65D) o IL-15(D30N/E64Q/N65D) y brazos dirigidos basados en el mAb C_H1L1 (baja afinidad), mAb C_H1_L1.1 (alta afinidad), mAb C_H1_L1.3 (afinidad intermedia) o αRSV. Después de la incubación con los artículos de prueba, las células se tiñeron con los siguientes anticuerpos: anti-CD25-PE (M-A251), anti-CD8-PE-Cy7 (SK1), anti-PD-1-Alexa647 (XENP16432, teñido con el estuche de marcaje de anticuerpos Alexa Fluor™ 647), anti_CD45RO-APC-Fire750 (UCHL1), anti-CD16-BV605 (3G6), anti-CD56-BV605 (HCD56), anti-CCR7-GV711 (G043H7), anti-CD45RA-BV785 (HI100), anti-CD4-BUV395 (SK3), anti-CD3-BUV496 (UCHT1), anti-CD95-BUV737 (DX2), anti-CD28-BV650 (CD28.2) y Zombie Aqua (BV510), y analizados por citometría de flujo para diversas poblaciones celulares.

Investigamos la proliferación de diversas poblaciones de linfocitos basados en la dilución de CFSE (Zombie Aqua para excluir las células muertas), cuyos datos se representan en la Figura 87; la activación de diversas poblaciones celulares T basadas en la expresión de CD25, cuyos datos se representan en la Figura 88; y expresión de PD-1 en diversas poblaciones, cuyos datos se representan en la Figura 89. En conjunto, los datos muestran las mismas tendencias que en el ejemplo 10. Además, los datos muestran que los análogos de Xtend son comparables a los análogos que no son de Xtend. Por ejemplo, el EC50 para XENP30046 es comparable al EC50 para XENP30290 (el análogo de Xtend a XENP30046).

2. 11B: Los análogos de Xtend demuestran la actividad antitumoral y se combinan con el bloqueo de PD-1

Para este estudio, se usaron ratones NSG que eran MHC I/II-DKO (NSG-DKO) y por lo tanto, resistentes a GVHD. En el día -15 los ratones NSG-DKO (10 por grupo) se inocularon por vía intradérmica con 3 x 106 células MCF-7 transducidas con pp65. A continuación, los ratones se inyectaron por vía intraperitoneal con 2.5 x 106 de PBMC humanas y se trataron con los artículos de prueba indicados/combinaciones de artículos de prueba en el día 0, y se trataron además con los artículos de prueba indicados en los días 7, 14 y 21. El volumen del tumor se midió con un calibre tres veces por semana, los pesos corporales se midieron una vez por semana y se extrajo sangre una vez por semana.

El volumen del tumor a lo largo del tiempo se representa en la Figura 90, y el volumen del tumor en los días 11, 14, 17, 19, 21, 24, 26 y 28 se representa en la Figura 91 (las estadísticas se realizaron sobre los datos corregidos de la línea de base mediante el uso de la prueba de Mann-Whitney). Los datos muestran que para el día 11, XENP30290 (1 mg/kg) solo y la combinación de XENP30516 (3 mg/kg) con bloqueo de PD-1 redujeron significativamente el tamaño del tumor con respecto al tratamiento con bloqueo de PD-1 solo. Para el día 28, todas las combinaciones de XENP30290 (0,1, 0,3 o 1 mg/kg) o XENP30516 (0,3, 1 o 3 mg/kg) con bloqueo de PD-1 redujeron significativamente el tamaño del tumor en comparación con el tratamiento con bloqueo de PD-1 solo.

Los datos que representan la expansión de diversas poblaciones de linfocitos se representan en las Figuras 92-93 (estadísticas para la expansión de células CD45+ realizadas en datos transformados logarítmicamente mediante el uso de la prueba t no apareada). En particular, por el día 14, las diversas dosis de XENP30290 o XENP30516, solas o en combinación con el bloqueo de PD-1, permitieron una expansión significativamente mejorada de linfocitos en comparación con el bloqueo de PD-1 solo. Aunque las fusiones de control de IL-15/Rα-Fc dirigidas a RSV también expandieron los linfocitos, de acuerdo con los datos representados en el ejemplo 10, las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a RSV indujeron mucha menos expansión de linfocitos que su contraparte (es decir, que tiene una variante de IL-15 equivalente) fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a PD-1; y XENP30518 que comprende la variante de IL-15(D30N/E64Q/N65D) indujo menos expansión de linfocitos que XENP30362 que

comprende la variante de IL-15(N4D/N65D) más potente. Como anteriormente, esto indica que las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 estarán activas en el entorno del tumor, pero permanecerán sustancialmente inactivas fuera del entorno tumoral.

L. Ejemplo 12: Las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 expanden selectivamente las poblaciones de linfocitos PD-1^{+}

El ejemplo 3C mostró que las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 de la invención son selectivas para linfocitos activados. Aquí, se demuestra además in vivo que las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 son particularmente selectivas para poblaciones de linfocitos PD-1+.

Los ratones CD34+ Hu-NSG que son ratones NSG injertados con células madre hematopoyéticas CD34+ humanas para desarrollar un sistema inmunológico humano funcional sin reactividad hacia el huésped se obtuvieron de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). Investigamos los niveles de expresión de PD-1 en diversas poblaciones de linfocitos en sangre extraída de los ratones antes de la dosificación con los artículos de prueba, cuyos datos se representan en la Figura 94. Los datos muestran que los ratones CD34 + Hu-NSG tienen un perfil de expresión de PD-1 similar al de los humanos, es decir, una mayor expresión de PD-1 en poblaciones de memoria efectora. La actividad de las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 en los ratones CD45+ Hu-NSG debería reflejar la actividad de las moléculas en humanos.

A los ratones se dosificaron por vía intraperitoneal 0,3 mg/kg de XENP30046 (IL-15/Rα-Fc dirigida a [NC]PD-1 que comprende mAb C_H1_L1.1 la variante de IL-15(N4D/N65D); n = 5), 0,3 mg/kg de XENP30429 (IL-15/Rα-Fc dirigida a [NC]PD-1 que comprende mAb C_H1_L1.1 la variante de IL-15(D30N/E64Q/N65D); n = 5), 0,3 mg/kg XENP26007 (IL-15/Rα-Fc dirigidas a RSV de control que comprende la variante de IL-15(N4D/N65D); n = 4), o 0,3 mg/kg de XENP30432 (IL-15/Rα-Fc dirigida a RSV de control que comprende la variante de IL-15(D30N/E64Q/N65D); n = 5) el día 0. Se extrajo sangre los días 0, 4, 7 y 10 para investigar la expansión de diversas poblaciones de linfocitos, cuyos datos se representan en las Figuras 95-102.

Los datos muestran que las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 (XENP30046 y XENP30429) expanden las poblaciones celulares PD-1+ (por ejemplo, poblaciones de memoria efectora CD4 y CD8), con una expansión de más de 100 veces en las poblaciones de memoria efectora por XENP30046. La Figura 102 ilustra que la cantidad

de expansión celular por XENP30046 y XENP30429 se correlaciona con la expresión de la línea base de PD-1 en cada una de las poblaciones de linfocitos. Además, como se representan en las Figuras 100 y 101, XENP30429 indujo muy poca expansión de células CD4 y CD8 vírgenes (PD-1 baja), lo que indica que la reducción de la potencia del brazo de IL-15 mejora la selectividad por las células T activadas. En particular, las fusiones de control de IL-15/Rα-Fc dirigidas a RSV (XENP26007 y XENP30432) muestran niveles muy bajos de expansión, lo que indica que las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 de la invención deberían tener una expansión mínima de linfocitos periféricos.

M. Ejemplo 13: Farmacocinéticas y farmacodinámicas de las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 ajustadas para la afinidad a PD-1 y la potencia de IL-15 en monos cinomolgos

Basado en un análisis adicional de los datos recolectados del estudio de cinomolgos descrito en el ejemplo 5A, se encontró que las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 disminuyen la activación de las células NK mientras expanden las células T CD8+ en monos cinomolgos (véase la Figura 103). En particular, como se representa en la Figura 104, la fusión de IL-15/Rα-Fc dirigida a PD-1 fue selectiva para las células T CD8 de memoria efectora.

En otro estudio in vivo en monos cinomolgos, se investigaron las farmacocinéticas y farmacodinámicas de fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a [NC]PD-1 ajustadas para la afinidad a PD-1 y la potencia de IL-15. Los monos cinomolgos (n = 3) se aclimataron durante 13 días (que comienza el día -13), seguido de la administración intravenosa de una primera dosis más baja (dosis 3X) de los artículos de prueba indicados el día 1, y una administración intravenosa de una segunda dosis más alta (dosis 10X) de los artículos de prueba indicados el día 22. Se extrajo sangre a lo largo del estudio para investigar tanto las farmacocinéticas como la farmacodinámicas, cuyos datos se representan en las Figuras 105-106.

La Figura 105 representa la expansión de diversas poblaciones de linfocitos en monos cinomolgos después de la administración con XENP30290 (mAb C_H1_L1.1 x IL-15[N4D/N65D]) o XENP30362 (αRSV x IL-15[N4D/N65D]). En conjunto, los datos muestran que XENP30290 (que tiene una alta afinidad por PD-1 y una mayor potencia de IL-15) permitió farmacodinámicas periféricas sostenidas durante 2-3 semanas con una expansión moderada de células PD1-. En particular, las células T γδ son la

población celular de mayor expansión; las células T $CD4^+$ y $CD8^+$ vírgenes son la población celular de menor expansión; y las células madre $CD8^+$ de memoria son la población relevante de mayor expansión.

La Figura 106 representa la expansión de diversas poblaciones de linfocitos en monos cinomolgos después de la administración con XENP30516 (mAb C_H1_L1.1 x IL-15[D30N/E64Q/N65D]) o XENP30518 (αRSV x IL-15[D30N/E64Q/N65D]). En conjunto, los datos muestran que XENP30516 (que tiene alta afinidad por PD-1 y menor potencia de IL-15) permitió farmacodinámicas periféricas sostenidas con una expansión no significativa de las células PD1-. De acuerdo con XENP30290, las células T γδ son la población celular de mayor expansión; las células T $CD4^+$ y $CD8^+$ vírgenes son la población celular de menor expansión; y las células madre $CD8^+$ de memoria son la población relevante de mayor expansión.

Las Figuras 107-111 representan las farmacocinéticas de los diversos artículos de prueba que tienen diferente afinidad por PD-1 (que incluye el control dirigido a RSV) y/o potencia de IL-15. En conjunto, los datos muestran un impacto aparente tanto de la afinidad a PD-1 como de la potencia de IL-15 en la PK. Por ejemplo, como se ilustra en la Figura 107, XENP30290, que tiene la mayor afinidad por PD-1 y mayor potencia de IL-15, dio como resultado un aclaramiento más rápido que XENP30291 y XENP29439 que tienen menor afinidad por PD-1. Sin embargo, XENP30516, que tiene la mayor afinidad por PD-1, pero una menor potencia de IL-15, dio como resultado un aclaramiento más lento que XENP30290. Esta misma tendencia se ilustra en la Figura 111 para XENP30362 y XENP30518 que son fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a αRSV que tienen respectivamente una mayor y menor potencia de IL-15. En particular, no pareció haber ninguna diferencia aparente en la PK para los artículos de prueba que comprenden IL-15[N4D/N65D] y que comprenden IL-15[D30N/N65D].

Finalmente, la Figura 112 representa la expresión de PD1 en diversas poblaciones de linfocitos después del tratamiento con XENP30290, XENP30516 y XENP30362. Los datos muestran que las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 aumentan la expresión de PD-1. La Figura 113 muestra la correlación entre el pico de expansión de todos los subconjuntos de memoria de células T y el pico de expresión de PD-1. Si bien las implicaciones de esto pueden requerir más investigación, el aumento de la expresión de PD-1 puede proporcionar un lazo de retroalimentación positiva para un efecto mejorado de las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1.

En otro estudio in vivo en monos cinomolgos, se investigaron la selectividad in vivo de fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 conferidas por diferentes variantes de IL-15. Los monos cinomolgos (n = 3) se aclimataron durante 13 días (que comienza el día -13), seguido de la administración intravenosa de las fusiones de IL-15/Rα-Fc de potencia reducida indicadas dirigidas a PD-1 (y dirigidas a RSV de control) en diversas concentraciones de dosis (dosis baja 1X, dosis intermedia 3X, dosis alta 10X o dosis muy alta 30X). Se extrajo sangre a lo largo del estudio para investigar tanto las farmacocinéticas como la farmacodinámicas, cuyos datos se representan en las Figuras 114-119.

Se hicieron las siguientes observaciones: XENP30290 indujo la expansión celular PD1+ a una dosis baja 1X (Figura 114); XENP30290 indujo una buena expansión celular de PD1+ a una dosis alta 10X, pero tiene una actividad moderada en las células PD1- como se muestra por la actividad del control dirigido a RSV XENP30362 (Figura 115); XENP30516 indujo una buena expansión celular de PD1+ a una dosis alta 10X con buena selectividad (Figura 116); y XENP30516 indujo una mayor expansión de PD1+ a una dosis muy alta 30X mientras mantenía una excelente selectividad (Figura 117). En conjunto, los datos muestran que el aumento de la dosis da como resultado una mayor selectividad. Además, las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 que comprenden la variante de IL-15[D30N/E64Q/N65D] fueron más selectivas que las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 que comprenden la variante IL-15[N4D/N65D].

N. Ejemplo 14: La IL-15 dirigida a PD-1 revierte la supresión de la proliferación de células T

Además de proliferar las células T efectoras, la IL-15 también puede unirse a receptores en Treg y mejorar su proliferación; sin embargo, las Treg suprimen la respuesta inmune y, por lo tanto, se consideran desfavorables para el tratamiento oncológico.

Se ha informado previamente que la rapamicina promueve la proliferación de Treg CD4+CD25+FOXP3+ in vitro y las Treg expandidas resultantes suprimen la proliferación de células T CD4+ y CD8+ (véase, por ejemplo, Battaglia y otros (2006) Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. J Immunol. 177(12) 8338-8347; y Strauss y otros (2007) Selective survival of naturally occurring human CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells cultured with rapamycin. J Immunol. 178(1) 320-329). Por consiguiente, para los experimentos de la presente descripción que investigan la relación entre IL-15, Treg y

otras células T, se utilizaron Treg expandidas con rapamicina. Las células T CD4+ se enriquecieron a partir de PBMC humanas por selección negativa mediante el uso del estuche de enriquecimiento de células T CD4+ humanas EasySep™ (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canadá). Las Treg se expandieron mediante el uso de Dynabeads™ Human Treg Expander (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Mass.) en RPMI1640 + 10 % de suero fetal bovino + 0,1 µg/mL de rapamicina + 500 U/mL de IL-2 durante 1-4 días. Las Treg se transfirieron a frascos T75 recubiertos con 0,5 µg/mL de anti-CD3 (OKT3, Biolegend, San Diego, California) y se cultivaron con RPMI1640 + 10 % de suero bovino fetal + 0,1 µg/mL de rapamicina + 500 U/mL de IL-2 + 0,5 µg/mL del mAb anti-CD28. Los experimentos que utilizan Treg expandidas con rapamicina se realizaron al menos 8 días después del enriquecimiento inicial de células T CD4+ a partir de PBMC.

1. 14A: Las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 reducen la proliferación de Treg

Para investigar la proliferación de Treg por IL-15, se incubaron 1,25 x 105 de Treg marcadas con Tag-it Violet con las dosis indicadas de fusiones de IL-15/Rα-Fc ilustrativas XENP20818 (WT IL-15) o XENP24045 (IL-15[D30N/E64Q/N65D]) (secuencias representadas en la Figura 120) así como fusiones ilustrativas de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 en RPMI con 10 % de suero bovino fetal (sin ningún otro suplemento) durante 4 días. Los datos que se representan en la Figura 121 muestran que las fusiones de IL-15/Rα-Fc (dirigidas y no dirigidas) inducen la proliferación de las Treg expandidas con rapamicina. En particular, las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 fueron mucho menos potentes para inducir la proliferación de Treg en comparación con las fusiones de IL-15/Rα-Fc no dirigidas.

2. 14B: Las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 mejoran la proliferación de células T efectoras y reducen la supresión de Treg

Se sembraron 1 x 10^5 de PBMC marcadas con CFSE (número fijo) con una relación indicada de Treg expandidas con rapamicina marcadas con Tag-it Violet, y 5 mg/mL de fusiones de IL-15/Rα-Fc ilustrativas dirigidas en anti-CD3 unida a la placa (OKT3; 100 ng/mL). Después de 4 días de incubación a 37 °C, las células se analizaron mediante citometría de flujo. La proliferación se midió mediante dilución de CFSE (para células T) o Tag-it Violet (para Treg) y se usó colorante Zombie para excluir las células muertas.

Los datos representados en la Figura 122 muestran que las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 cambiaron (redujeron) la potencia de la supresión inducida por Treg de

la proliferación de células T de memoria efectora CD8 y CD4. En particular, el cambio por las fusiones de control de IL-15/Rα-Fc dirigidas a RSV fue menor que la reducción en la potencia inducida por las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 (nuevamente, lo que indica que esto debería ser muy efecto específico del entorno tumoral).

Los datos representados en la Figura 123 muestran la relación de recuentos de células Treg/CD8 TEM y Treg/CD4 TEM. Los datos muestran que, en comparación con ningún artículo de prueba, las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 aumentaron la relación Treg/TEM y, sin embargo, la proliferación de células TEM se ve reforzada por las Fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1. Esto indica que aunque las Treg se expanden, las Treg expandidas demuestran en particular una capacidad de supresión disminuida.

3. 14C: Mecanismo para reducir la supresión de la proliferación de células T

a. 14C(a): Las Treg tratadas con la fusión de IL-15/Rα-Fc muestran una población de eTreg reducida a lo largo del tiempo

En un primer experimento para investigar el mecanismo de supresión reducida, las Treg se cultivaron durante 6 días en a) medio Treg completo (RPMI con 10 % de FBS, 0,5 µg/mL de anti-CD28, 100 U/mL de IL-2, 100 ng/mL de rapamicina), b) medio Treg completo sin rapamicina, o c) con 100 ng/mL de IL -15 (en RPMI con 10 % de FBS, 0,5 µg/mL de anti-CD28; sin IL-2; sin rapamicina). Se sembraron 1 x 105 PBMC marcadas con CFSE con la dosis indicada de Treg marcadas con Tag-it Violet en anti-CD3 unido a la placa (OKT3; 100 ng/mL). Se determinó la proliferación de células T CD8+ y CD4+, cuyos datos se representan en la Figura 124. Los datos muestran que las Treg pretratadas con IL-15 muestran una capacidad supresora deteriorada, lo que sugiere que la IL-15 convierte las Treg en un fenotipo menos inmunosupresor.

Para investigar aún más esta observación, las Treg expandidas con rapamicina se trataron con la fusión de IL-15/Rα-Fc XENP22821 (IL-15[N65D]; secuencia representada en la Figura 120) durante 14 días y se analizaron por citometría de flujo. Sorprendentemente, los datos de la Figura 125 que representan la expresión de CD25 y FOXP3 en células CD4+ muestran que el tratamiento con XENP22821 redujo la expresión de FOXP3. Mientras que FOXP3 es generalmente un marcador para Treg, FOXP3alto CD4+CD45RA- son los eTreg verdaderamente supresores, mientras que FOXP3bajo CD4+CD45RA- son células T CD4 efectoras activadas no supresoras (Miyara y otros (2009) Functional delineation and differentiation dynamics of human

CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. Immunity. 30(6):899-911). Los datos de la Figura 126 que representan la expresión de CD45RA y FOXP3 en células CD4+ muestran que el tratamiento con XENP22821 desplaza las poblaciones de CD4+CD45RA- de FoxP3alto a FoxP3bajo, lo que indica que el tratamiento con fusiones de IL-15/Rα-Fc en realidad cambió la población de células eTreg (población disminuida del 5,24 % al 2.72 %) a T CD4 efectoras activadas (población aumentada del 18,2 % al 28,6 %).

Además, los datos de la Figura 127 que representan la expresión de CD25 y CCR4 en células CD4+ muestran que el tratamiento con XENP22821 redujo la expresión de CCR4. Anteriormente se informó que CCR4 está involucrado con la inmunosupresión (Molinaro y otros (2015) CCR4 Controls the Suppressive Effects of Regulatory T Cells on Early and Late Events during Severe Sepsis. PLoS One. 10(7)).

En conjunto, esto indica que aunque las fusiones de IL-15/Rα-Fc (no dirigidas y dirigidas) expanden las poblaciones de Treg existentes, invierten la supresión de la proliferación de células T efectoras al expandir las Treg en fenotipos no inmunosupresores (por ejemplo, FoxP3bajo y CCR4bajo/-).

b. 14C(b): Las fusiones de IL-15/Rα-Fc revierten la supresión de TGFß de la proliferación de células T

En el entorno tumoral, TGFß se expresa tanto por células malignas como por células inmunes (por ejemplo, Treg), y su función es suprimir la proliferación de células T, lo que da como resultado una respuesta inmune antitumoral suprimida (TGVHDer, BA. (2007) Transforming Growth Factor-ß and the Immune Response to Malignant Disease. Clin Cancer Res. 13(21)).

En un experimento para investigar la interacción entre las fusiones de IL-15/Rα-Fc y TGFß, se incubaron PBMC marcadas con CFSE con la dosis indicada de TGFß1, con o sin 10 µg/mL de la fusión de IL-15/Rα-Fc ilustrativa XENP24045 en 100 ng/mL de anti-CD3 (OKT3) unido a la placa durante 4 días a 37 ºC. Después de 4 días, las células se analizaron mediante citometría de flujo. La proliferación de células T se midió mediante dilución de CFSE, cuyos datos se representan en la Figura 128. Los datos muestran que TGFß suprime de forma dependiente de la dosis la proliferación de células T; sin embargo, en particular, la fusión de IL-15/Rα-Fc previene la supresión de TGFβ de la proliferación de células T en todas las dosis probadas.

Esto indica que otro mecanismo por el cual las fusiones de IL-15/Rα-Fc dirigidas a PD-1 revierten la supresión de la proliferación de células T es al invertir las acciones supresoras de TGFß.