

ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-PD-1 Y MÉTODOS PARA PREPARARLO

LISTADO DE SECUENCIAS

Esta solicitud se presenta electrónicamente a través de EFS-Web e incluye una lista de secuencias presentada electrónicamente en formato.xml en formato ST.26. El archivo.xml contiene una lista de secuencias titulada "025-PCT-SEQ-Listing.xml" creada el 8 de noviembre de 2024 y que tiene un tamaño de 23.068 bytes y 24.576 bytes en disco. La lista de secuencias contenida en este archivo.xml es parte de la especificación y se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La divulgación se refiere al campo de la biomedicina, en particular a un anticuerpo monoclonal anti-PD-1, que combina opcionalmente otro agente terapéutico tal como interferón- α 2b humano pegilado, y a métodos de preparación y aplicación del mismo.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

La proteína de muerte programada 1 (PD-1) es conocida en la técnica. En suma, es un miembro inhibidor de la familia de receptores CD28, que también incluye CD28, CTLA-4, ICOS y BTLA. La PD-1 se expresa en células B activadas, células T, macrófagos y células mieloides. Los miembros iniciales de la familia, CD28 e ICOS, se descubrieron por sus efectos funcionales en el aumento de la proliferación de células T tras la adición de anticuerpos monoclonales.

El gen PD-1 es una proteína transmembrana de tipo I de 50-55 kDa que forma parte de la superfamilia de genes Ig. El PD-1 contiene un motivo inhibidor de tirosina del inmunorreceptor proximal a la membrana (ITIM) y un motivo de conmutación basado en tirosina distal a la membrana (ITSM). Aunque estructuralmente es similar al CTLA-4, el PD-1 carece del motivo MYPPPY que es fundamental para la unión de B7-1 y B7-2. Se han identificado dos ligandos para el PD-1: PD-L1 y PD-L2, que han demostrado regular negativamente la activación de las células T al unirse al PD-1. Tanto el PD-L1 como el PD-L2 son homólogos del B7 que se unen al PD-1, pero no se unen a otros miembros de la familia CD28. Un ligando para el PD-1, el PD-L1, es abundante en una variedad de cánceres humanos. La interacción entre PD-1 y PD-L1 produce una disminución de los linfocitos infiltrantes en el tumor, una disminución de la proliferación mediada por el receptor de células T y la evasión inmunitaria por parte de las células cancerosas. La supresión inmunitaria se puede revertir inhibiendo la interacción local de PD-1 con PD-L1, y el efecto es aditivo cuando también se bloquea la interacción de PD-1 con PD-L2. Se ha descubierto que PD-1 desempeña un papel en la encefalomiелitis autoinmune, el lupus eritematoso sistémico, la enfermedad de injerto respecto de huésped (EICH), la diabetes tipo 1 y la artritis reumatoide.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo que se une preferentemente a PD-1, incluyendo una región determinante de complementariedad de cadena pesada uno (VHCDR1) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21, una región determinante de complementariedad de cadena pesada dos (VHCDR2) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 10, y/o una región determinante de complementariedad de cadena pesada tres (VHCDR3) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 20; y una región determinante de complementariedad de cadena ligera uno (VLCDR1) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 12, una región determinante de complementariedad de cadena ligera dos (VLCDR2) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 13, y/o una región determinante de complementariedad de cadena ligera tres (VLCDR3) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 14.

En un segundo aspecto, esta divulgación está dirigida a un anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo que se une preferentemente a PD-1 que incluye una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 22; y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 6.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo que se une preferentemente a PD-1, que comprende: una región determinante de complementariedad de cadena pesada uno (VHCDR1), una región determinante de complementariedad de cadena pesada dos (VHCDR2) y/o una región determinante de complementariedad de cadena pesada tres (VHCDR3) de u obtenida de (por ejemplo, determinada, derivada o copiada de) una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada como se recita en SEQ ID NO: 5; y una región determinante de complementariedad de cadena ligera uno (VLCDR1), una región determinante de complementariedad de cadena ligera dos (VLCDR2) y/o una región determinante de complementariedad de cadena ligera tres (VLCDR3 obtenida de (por ejemplo, determinada, derivada o copiada de) una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera como se recita en SEQ ID NO: 6.

Un aspecto adicional incluye el hecho de que dicho anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo que se une preferentemente a PD-1 comprende además una región constante de cadena pesada (HCCR) que incluye la secuencia de aminoácidos recitada en SEQ ID NO: 7; y en donde la HCCR incluye opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos modificadas de forma conservadora.

Un aspecto adicional incluye que dicho anticuerpo aislado del aspecto 2 o una porción de unión al antígeno del mismo comprende además una región constante de cadena ligera (LCCR) que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 8; y en donde la LCCR incluye opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos modificadas de forma

conservadora.

Otro aspecto adicional del aspecto 2 incluye el anticuerpo aislado del aspecto 2 o una porción de unión al antígeno del mismo que comprende además una región constante de cadena pesada (HCCR) que incluye la secuencia de aminoácidos citada en SEQ ID NO: 7, y en donde dicha HCCR incluye opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos modificadas de forma conservadora; y en donde dicho anticuerpo aislado

o una porción de unión al antígeno del mismo comprende además una región constante de cadena ligera (LCCR) que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 8, en donde la LCCR incluye opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos modificadas de forma conservadora.

En algunos aspectos, el anticuerpo o la porción de unión al antígeno VH comprende además un péptido señal de cadena pesada (HCSP) que incluye los aminoácidos enumerados en SEQ ID NO: 15 en el extremo N del VH.

En otro aspecto, el anticuerpo o la porción de unión al antígeno del mismo de la presente divulgación incluye una VL, en donde dicha VL comprende además un péptido señal de cadena ligera (LCSP) que incluye los aminoácidos enumerados en SEQ ID NO: 16 en el extremo N de la VL.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo o la porción de unión al antígeno que es una versión humana o humanizada de una especie diferente, y puede ser IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

En otro aspecto, la presente divulgación incluye una composición farmacéutica para tratar, suprimir y/o inhibir un tumor sólido que comprende (i) el anticuerpo o la porción de unión al antígeno del mismo divulgado en este documento; y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptado.

En otro aspecto, se contempla y elabora una molécula de polinucleótido que codifica el anticuerpo o la porción de unión al antígeno de la presente divulgación, que, en una forma de realización, puede ser un vector de expresión. En una forma de realización, dicho vector de expresión codifica un péptido señal de cadena ligera (LCSP) y/o un péptido señal de cadena pesada (HCSP) pero no comprende un intrón. El vector de expresión se puede utilizar en una célula huésped, como E. Coli.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para prevenir, tratar y/o suprimir un tumor en un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz del anticuerpo o la porción de unión al antígeno al sujeto. Dichos tumores pueden incluir carcinoma hepatocelular o tumor sólido que comprende melanoma y/o carcinoma de células renales (RCC).

En un aspecto adicional, la presente divulgación está dirigida a un método para regular la actividad de una o más células T in vitro, ex vivo y/o in vivo en un sujeto, el método comprende: poner en contacto la célula T con un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que

se une preferentemente al receptor de muerte programada humana 1 (hPD-1), en donde el anticuerpo bloquea y/o regula la unión de PD-L1 humana y/o PD-L2 humana a hPD-1, y en donde dicho anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo incluye una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 22; y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 6. En otro aspecto más, el anticuerpo o la porción de unión al antígeno del mismo puede comprender además una región constante de cadena pesada (HCCR) que incluye la secuencia de aminoácidos recitada en SEQ ID NO: 7, y la HCCR incluye opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos modificadas de forma conservadora y/o donde el anticuerpo o la porción de unión al antígeno del mismo comprende además una región constante de cadena ligera (LCCR) que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 8, y donde la LCCR incluye opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos modificadas de forma conservadora.

En otro aspecto, el método descrito en este documento puede regular células T tales como una o más células asesinas naturales, una o más células T citotóxicas, una o más células T auxiliares, una o más células monocíticas, una o más células T de memoria y/o una o más células T reguladoras.

En un aspecto, el anticuerpo o la porción de unión al antígeno divulgada en este documento bloquea la unión de PD-L1 humana y PD-L2 humana a PD-1 humana con una CI_{50} de aproximadamente 1 nM o menos.

Otro aspecto adicional de la presente divulgación incluye un proceso para producir un anticuerpo o una construcción de vector de porción de unión a antígeno que comprende cultivar la célula huésped que contiene un vector de expresión de interés en condiciones que permitan la expresión de dicho anticuerpo o construcción de vector de porción de unión a antígeno; y purificar y/o recuperar el anticuerpo o la construcción de vector de porción de unión a antígeno producido a partir del cultivo.

En un aspecto, el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo para su uso en el tratamiento de tumores sólidos puede comprender opcionalmente otro agente terapéutico. Dicho agente opcional puede ser P1101 y/u otro anticuerpo monoclonal anti-PD1 humano para el tratamiento de tumores sólidos, incluidos, entre otros, RCC y/o melanoma.

La presente divulgación incluye una combinación para su uso en el tratamiento, supresión, prevención y/o inhibición de un tumor sólido en un sujeto, en donde la combinación comprende un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo; y otro agente terapéutico, en donde el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo incluye una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 22; y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 6.

Sin embargo, la combinación anterior, dicho anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo comprende además una región constante de cadena pesada (HCCR) que incluye la secuencia de aminoácidos recitada en SEQ ID NO: 7, en donde la HCCR incluye

opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos modificadas de forma conservadora; y en donde dicho anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo comprende además una región constante de cadena ligera (LCCR) que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 8, y en donde la LCCR incluye opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos modificadas de forma conservadora.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para prevenir, tratar y/o suprimir un tumor sólido en un sujeto, tal como un ser humano, que comprende administrar una cantidad eficaz de P1101 y P1801 de manera serial o combinada al sujeto. El régimen de administración puede ser de cualquier manera serial o combinada. En algunos aspectos, P1101 se administra antes que P1801, o viceversa, y se puede realizar con diferentes tiempos de administración y combinaciones. El tumor sólido tratado incluye carcinoma hepatocelular, melanoma y/o carcinoma de células renales.

En una forma de realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo que se une preferentemente a PD-1, que comprende: una región determinante de complementariedad de cadena pesada uno (VHCDR1) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21, una región determinante de complementariedad de cadena pesada dos (VHCDR2) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 10, y/o una región determinante de complementariedad de cadena pesada tres (VHCDR3) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 23; y una región determinante de complementariedad de cadena ligera uno (VLCDR1) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 12, una región determinante de complementariedad de cadena ligera dos (VLCDR2) que incluye las secuencias de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 13, y/o una región determinante de complementariedad de cadena ligera tres (VLCDR3) que incluye las secuencias de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 14.

Otra forma de realización de la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo que se une preferentemente a PD-1 que comprende uno o más parátomos que comprenden: al menos uno de los siguientes residuos: Phe2, Ser5, Ser6 y Tyr7 de una secuencia variable de cadena pesada (VHCDR1) de la SEQ ID NO: 19;

al menos uno de los siguientes residuos: Phe2, Ser5 y Tyr6 de una secuencia variable de cadena pesada (VHCDR1) de la SEQ ID NO: 21; al menos uno de los siguientes residuos: Thr13, Gly14, Gly15, Gly16, Ser17 y Tyr18 de una secuencia variable de cadena pesada (VHCDR2) de la SEQ ID NO: 10; al menos uno de los siguientes residuos: Tyr33, Leu34, Asn35, Asp38 y Tyr39 de una secuencia variable de cadena pesada (VHCDR3) de la SEQ ID NO: 11; o al menos uno de los siguientes residuos: Ser31, Tyr33, Leu34, Asn35, Asp38 y Tyr39 de una secuencia variable de cadena pesada (VHCDR3) de la SEQ ID NO: 20.

En una forma de realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado o

una porción de unión a antígeno del mismo que se une preferentemente a PD-1 que comprende uno o más parátomos que comprenden: al menos uno de los siguientes residuos: Asn9 de una secuencia variable de cadena ligera (VLCDR1) de la SEQ ID NO: 12; al menos uno de los siguientes residuos: Tyr12 y Ser18 de una secuencia variable de cadena pesada (VLCDR2) de la SEQ ID NO: 13; o al menos uno de los siguientes residuos: Ser22, Asn23 y Trp25 de una secuencia variable de cadena pesada (VLCDR3) de la SEQ ID NO: 14.

Otra forma de realización de la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo que se une preferentemente a PD-1 que comprende uno o más parátomos que comprenden: al menos uno de los siguientes residuos: Phe2, Ser5, Ser6 y Tyr7 de una secuencia variable de cadena pesada (VHCDR1) de la SEQ ID NO: 19; al menos uno de los siguientes residuos: Phe2, Ser5 y Tyr6 de una secuencia variable de cadena pesada (VHCDR1) de la SEQ ID NO: 21; al menos uno de los siguientes residuos: Thr13, Gly14, Gly15, Gly16, Ser17 y Tyr18 de una secuencia variable de cadena pesada (VHCDR2) de la SEQ ID NO: 10; al menos uno de los siguientes residuos: Tyr33, Leu34, Asn35, Asp38 y Tyr39 de una secuencia variable de cadena pesada (VHCDR3) de la SEQ ID NO: 11; al menos uno de los siguientes residuos: Ser31, Tyr33, Leu34, Asn35, Asp38 y Tyr39 de una secuencia variable de cadena pesada (VHCDR3) de la SEQ ID NO: 20; al menos uno de los siguientes residuos: Asn9 de una secuencia variable de cadena ligera (VLCDR1) de la SEQ ID NO: 12; al menos uno de los siguientes residuos: Tyr12 y Ser18 de una secuencia variable de cadena pesada (VLCDR2) de la SEQ ID NO: 13; o al menos uno de los siguientes residuos: Ser22, Asn23 y Trp25 de una secuencia variable de cadena pesada (VLCDR3) de la SEQ ID NO: 14.

En una forma de realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo que se une preferentemente a PD-1 que comprende: una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la SEQ ID NO: 9 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 6; o una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la SEQ ID NO: 18 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 6; o una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la SEQ ID NO: 19 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 6; o una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la SEQ ID NO: 21 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 6.

En una forma de realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo que se une preferentemente a PD-1 que comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la SEQ ID NO: 5 o una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la SEQ ID NO: 22; y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 6.

En cualquiera de las formas de realización que incluyen el anticuerpo o la porción de unión al antígeno del mismo, dicho anticuerpo o la porción de unión al antígeno del mismo puede comprender además una región constante de cadena pesada (HCCR) que incluye la secuencia

de aminoácidos recitada en SEQ ID NO: 7; y en donde la HCCR incluye opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos modificadas de forma conservadora.

En cualquiera de las formas de realización que incluyen el anticuerpo o la porción de unión al antígeno del mismo, dicho anticuerpo o la porción de unión al antígeno del mismo puede comprender además una región constante de cadena ligera (LCCR) que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 8; y en donde la LCCR incluye opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos modificadas de forma conservadora.

En cualquiera de las formas de realización que incluyen el anticuerpo o la porción de unión al antígeno del mismo, dicho anticuerpo o la porción de unión al antígeno del mismo puede comprender además una región constante de cadena pesada (HCCR) que incluye la secuencia de aminoácidos recitada en SEQ ID NO: 7, y en donde dicha HCCR incluye opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos modificadas de forma conservadora; y una región constante de cadena ligera (LCCR) que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 8, en donde la LCCR incluye opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos modificadas de forma conservadora.

En cualquiera de las formas de realización que incluyen el anticuerpo o la porción de unión al antígeno del mismo, dicha VH puede comprender además un péptido señal de cadena pesada (HCSP) que incluye los aminoácidos enumerados en SEQ ID NO: 15 en el extremo N de la VH. En cualquiera de las formas de realización que incluyen el anticuerpo o la porción de unión al antígeno del mismo, dicha VL puede comprender además un péptido señal de cadena ligera (LCSP) que incluye los aminoácidos enumerados en SEQ ID NO: 16 en el extremo N de la VL. En cualquiera de las formas de realización que incluyen el anticuerpo o la porción de unión al antígeno del mismo, el anticuerpo puede ser humano o humanizado. En cualquiera de las formas de realización que incluyen el anticuerpo o la porción de unión al antígeno del mismo, el anticuerpo puede ser de isotipo IgG4.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica para tratar, suprimir y/o inhibir un tumor sólido que comprende (i) el anticuerpo o la porción de unión al antígeno del mismo como se divulga en cualquiera de las formas de realización enumeradas en este documento; y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptado.

En una forma de realización, la presente divulgación proporciona una molécula de polinucleótido que codifica el anticuerpo o la porción de unión al antígeno en cualquiera de las formas de realización enumeradas en este documento.

En una forma de realización, la presente divulgación proporciona un vector de expresión que comprende la molécula de polinucleótido que codifica el anticuerpo o la porción de unión al antígeno como se describe en cualquiera de las formas de realización enumeradas en el presente documento, dicho vector de expresión que codifica una LCSP y/o HCSP no comprende un intrón. En una forma de realización, la presente divulgación proporciona una célula huésped que comprende el vector de expresión.

En una forma de realización, la presente divulgación proporciona un método para prevenir, tratar y/o suprimir un tumor en un sujeto, que comprende los pasos de: administrar al sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo o la porción de unión al antígeno como se describe en cualquiera de las modalidades de forma de realización enumeradas en el presente documento. El tumor incluye carcinoma hepatocelular o tumor sólido que comprende melanoma y/o carcinoma de células renales (RCC).

En una forma de realización, la presente divulgación proporciona un método para regular la actividad de una o más células T *in vitro*, *ex vivo* y/o *in vivo* en un sujeto, comprendiendo el método los pasos de: poner en contacto la célula T con un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se une preferentemente al receptor de muerte programada humano 1 (hPD-1), en donde el anticuerpo bloquea y/o regula la unión de PD-L1 humano y/o PD-L2 humano a hPD-1, y en donde dicho anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo incluye: una región determinante de complementariedad de cadena pesada uno (VHCDR1) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21, una región determinante de complementariedad de cadena pesada dos (VHCDR2) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 10, y/o una región determinante de complementariedad de cadena pesada tres (VHCDR3) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 23; y una región determinante de complementariedad de cadena ligera uno (VLCDR1) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 12, una región determinante de complementariedad de cadena ligera dos (VLCDR2) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 13, y/o una región determinante de complementariedad de cadena ligera tres (VLCDR3) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 14.

En una forma de realización del método para regular la actividad de una o más células T *in vitro*, *ex vivo* y/o *in vivo* en un sujeto, dicho anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo comprende además una región constante de cadena pesada (HCCR) que incluye la secuencia de aminoácidos citada en SEQ ID NO: 7, y la HCCR incluye opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos modificadas de forma conservadora. En el método, dicho anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo puede comprender además una región constante de cadena ligera (LCCR) que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 8, en donde la LCCR incluye opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos modificadas de forma conservadora. En el método, dichas una o más células T pueden comprender una o más células asesinas naturales, una o más células T citotóxicas, una o más células T auxiliares, una o más células monocíticas, una o más células T de memoria y/o una o más células T reguladoras. En el método, el anticuerpo o la porción de unión al antígeno pueden bloquear la unión de PD-L1 humano y PD-L2 humano a PD-1 humano con una CI50 de aproximadamente 1 nM o menos.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un proceso para producir un anticuerpo o una construcción de vector de porción de unión a antígeno que comprende cultivar la célula huésped como se divulga en cualquiera de las formas de realización enumeradas en este documento en condiciones que permitan la expresión de dicho anticuerpo o construcción de vector de porción de unión a antígeno; y purificar y/o recuperar el anticuerpo o la construcción de vector de porción de unión a antígeno producido a partir del cultivo.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo para su uso en el tratamiento de tumores sólidos que comprende: una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la SEQ ID NO: 5 o una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la SEQ ID NO: 22; una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 6; y opcionalmente comprende otro agente terapéutico. El anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo puede comprender además: una región constante de cadena pesada (HCCR) que incluye la secuencia de aminoácidos recitada en SEQ ID NO: 7, en donde la HCCR incluye opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos modificadas de manera conservadora; y una región constante de cadena ligera (LCCR) que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 8, y en donde la LCCR incluye opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos modificadas de manera conservadora; y opcionalmente comprende otro agente terapéutico. Dicho otro agente terapéutico puede comprender P1101, P1801 y/u otro anticuerpo monoclonal anti-PD1 humano. En el anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo para su uso, dicho tumor sólido puede comprender carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renales y/o melanoma.

En una forma de realización, la presente divulgación proporciona una combinación para su uso en el tratamiento, supresión, prevención y/o inhibición de un tumor sólido en un sujeto, en donde la combinación comprende un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo; y otro agente terapéutico, en donde el anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo incluye: una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la SEQ ID NO: 5 o una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la SEQ ID NO: 22; y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 6. Dicho anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo puede comprender además una región constante de cadena pesada (HCCR) que incluye la secuencia de aminoácidos recitada en SEQ ID NO: 7, en donde la HCCR incluye opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos modificadas de forma conservadora; y una región constante de cadena ligera (LCCR) que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 8, y en donde la LCCR incluye opcionalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos modificadas de forma conservadora. En la combinación, dicho agente terapéutico puede comprender P1101, P1801 y/u otro anticuerpo monoclonal anti-PD1 humano. En la combinación, dicho P1101, P1801 y/u otro anticuerpo monoclonal anti-PD1 humano se puede administrar en serie. En la combinación, dicho P1101 y/o P1801 se administra

antes de otro anticuerpo monoclonal anti-PD1 humano. En la combinación, dicho tumor sólido puede incluir carcinoma hepatocelular, melanoma y/o carcinoma de células renales.

En una forma de realización, la presente divulgación proporciona una proteína recombinante que comprende (i) el anticuerpo o una porción de unión al antígeno divulgada en este documento; y (ii) una secuencia de etiqueta opcional para la detección de la expresión y/o purificación.

En otra forma de realización, cualquiera de las formas de realización que incluyen el anticuerpo o la porción de unión al antígeno del mismo puede utilizarse en un método para tratar el cáncer, en donde el método comprende administrar el anticuerpo aislado o una porción de unión al antígeno del mismo a un sujeto. En una forma de realización, el cáncer comprende carcinoma hepatocelular, melanoma y/o carcinoma de células renales.

En una forma de realización, cualquiera de las formas de realización que incluyen el anticuerpo o la porción de unión al antígeno del mismo se puede utilizar para la fabricación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico del cáncer. En una forma de realización, el cáncer comprende carcinoma hepatocelular, melanoma y/o carcinoma de células renales.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para una comprensión más completa de las características y ventajas de la presente divulgación, se hace referencia ahora a la descripción detallada de la divulgación junto con las figuras que la acompañan y en las que:

Las figuras 1(a) a 1(r) indican las secuencias de aminoácidos de P1801. La figura 1(a) indica la cadena pesada completa de P1801, que incluye tres CDR y un dominio variable más regiones constantes. También incluye péptidos señal de la cadena pesada, que finalmente serán escindidos por la célula huésped. La secuencia completa de la cadena pesada se indica como SEQ ID NO: 1. La figura 1(b) indica la cadena ligera completa de P1801, que incluye tres CDR y un dominio variable más regiones constantes. También incluye péptidos señal de la cadena ligera, que finalmente serán escindidos por la célula huésped. La secuencia completa de la cadena ligera se indica como SEQ ID NO: 2. La figura 1(c) indica la cadena pesada de P1801 sin péptido señal de la cadena pesada (SEQ ID No: 3). La figura 1(d) indica la cadena ligera de P1801 sin péptido señal de la cadena ligera (SEQ ID No: 4). La figura 1(f) denota la región variable de cadena pesada completa de P1801 (SEQ ID No:5). La figura 1(g) denota la región variable de cadena ligera completa de P1801 (SEQ ID No:6). La figura 1(h) denota la región constante de cadena pesada de P1801 (SEQ ID No:7). La figura 1(i) denota la región constante de cadena ligera de P1801 (SEQ ID No:8). La figura 1(j) denota la CDR1 de cadena pesada de P1801 (SEQ ID No:9). La figura 1(k) denota la CDR2 de cadena pesada de P1801 (SEQ ID No:10). La figura 1(l) denota la CDR3 de cadena pesada de P1801 (SEQ ID No:11). La figura 1(m) denota la CDR1 de cadena ligera de P1801 (SEQ ID No:12). La figura 1(n) indica la CDR2 de la cadena ligera de P1801 (SEQ

ID No:13). La figura 1(o) indica la CDR3 de la cadena ligera de P1801 (SEQ ID No:14). La figura 1(p) indica Péptido señal de la cadena pesada de P1801 (SEQ ID No: 15). La figura 1(q) indica péptido señal de cadena ligera de P1801 (SEQ ID No: 16). La Figura 1(r) indica que la secuencia bisagra se encuentra en cadenas pesadas (SEQ ID No: 17). La Figura 1(s) indica una CDR1 de cadena pesada alternativa de P1801 (SEQ ID No: 18). La Figura 1(t) indica una CDR1 de cadena pesada alternativa de P1801 (SEQ ID No: 19). La Figura 1(u) indica una CDR1 de cadena pesada alternativa de P1801 (SEQ ID No: 20). La Figura 1(v) indica una CDR1 de cadena pesada alternativa de P1801 (SEQ ID No: 21). La Figura 1(w) indica una región variable de cadena pesada completa alternativa de P1801 (SEQ ID No: 22). La Figura 1(x) indica una CDR3 de cadena pesada alternativa de P1801 (SEQ ID No: 23).

La figura 2 muestra la estructura química de P1101. IFN significa interferón- α 2b humano. mPEG significa polímero de polietilenglicol y cada mPEG tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kD a 30 kD y/o cada mPEG tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kD.

La figura 3 muestra una prueba ELISA de competencia para probar la capacidad de interferencia de un mAb anti-hPD-1 murino seleccionado (mP1801) en comparación con un mAb anti-PD1 conocido comercialmente.

Las figuras 4(a) a 4(c) indican diferentes formas de realización de regímenes de administración de una combinación de moléculas de la presente divulgación; por ejemplo, P1101 y un anticuerpo monoclonal anti-PD1, como P1801. La flecha continua y la flecha punteada pueden ser la molécula 1, como P1101, y la molécula 2 puede ser un anticuerpo monoclonal anti-PD1, como P1801, respectivamente, o viceversa.

La figura 5 denota otra forma de realización diferente de regímenes de administración de una combinación de las moléculas de la presente divulgación. Por ejemplo, la molécula 1 puede ser P1101 o un anticuerpo monoclonal anti-PD1, como P1801. La molécula 2 puede ser P1101 o un anticuerpo monoclonal anti-PD1, como P1801, o viceversa.

La figura 6 denota otra forma de realización diferente de regímenes de administración de una combinación de moléculas divulgadas en la presente divulgación. Por ejemplo, la molécula 1 puede ser P1101 o un anticuerpo monoclonal anti-PD1, como P1801. La molécula 2 puede ser P1101 o un anticuerpo monoclonal anti-PD1, como P1801.

La Figura 7 denota otra forma de realización de regímenes de administración de una combinación de moléculas divulgadas en la presente divulgación. Por ejemplo, la Figura 7(a) muestra que la molécula 1 puede ser hIgG4 (como control isotópico), P1101 o un anticuerpo monoclonal anti-PD1 como P1801, Cemiplimab, Pembrolizumab o Novolumab administrados individualmente. La Figura 7(b) muestra una versión de alternancia entre la molécula 1 y 2, donde la molécula 1 puede ser mP1101, la molécula 2 puede ser P1801 y viceversa.

Las figuras 8(a) y 8(b) indican el ensayo de unión de P1801 en comparación con varios mAb anti-PD1 disponibles comercialmente respecto del antígeno PD1. El eje Y es la longitud de onda y

el eje X es el tiempo en segundos. Como se muestra en la figura 8(a), la segunda línea desde arriba es P1801 y está marcada con una flecha. Como se muestra en la figura 8(b), la tercera línea desde arriba es P1801 y está marcada con una flecha.

La figura 9 muestra la especificidad de unión de P1801. P1801 se une específicamente a PD-1, pero no a PD-L1, PD-L2, CTLA4 o CD28, ya que estos son planos e indetectables.

La figura 10 indica el volumen tumoral medio de RCC de 7 grupos diferentes, como se describe en los protocolos del Ejemplo 9.

La figura 11 indica la medida real del tumor RCC del grupo 1 del Ejemplo 9. La figura 12 indica la medida real del tumor RCC del grupo 6 del Ejemplo 9.

La figura 13 denota cinco cohortes diferentes que se utilizan para un sujeto para determinar la dosis de efecto de P1101 + P1801.

La figura 14 muestra un refinamiento adicional de la cohorte de dosis de la figura 13 para la dosis efectiva de P1101 + P1801. El círculo superior corresponde al carcinoma de células renales y el inferior al melanoma.

La figura 15 es otro ejemplo de otra cohorte.

La figura 16 es una imagen generada con ChimeraX de la reconstrucción 3D final de PD1-AcroBio + PS 00066 + PS00067 a una resolución nominal de 2,9A.

La figura 17 es una imagen generada con ChimeraX del mapa final 2.9A coloreado por los valores de resolución local calculados por cryoSPARC 4.4.

La figura 18 es una imagen de la estructura del complejo P1801/PD1 resuelta por criomicroscopía electrónica.

La figura 19 es una imagen de la estructura del complejo P1801/PL1/PD1 resuelta por criomicroscopía electrónica que muestra una superposición de P1801/PD1 y PD-L1/PD1.

La figura 20 es una imagen del mapeo del epítipo P1801. La figura 21 es una imagen del mapeo del epítipo PD-L1.

La figura 22 es un modelo de los CDR P1801 en la interfaz de unión de PD-1. La figura 23 es un gráfico de la unión del epítipo de los anticuerpos anti-PD-1.

Si bien a continuación se analiza en detalle la forma de realización y el uso de diversas formas de realización de la presente divulgación, debe tenerse en cuenta que la presente divulgación proporciona muchos conceptos inventivos aplicables que pueden incorporarse en una amplia variedad de contextos específicos. Las formas de realización específicas analizadas en el presente documento son meramente ilustrativas de formas específicas de realizar y utilizar la divulgación y no delimitan el alcance de la divulgación.

Para facilitar la comprensión de esta divulgación, a continuación se definen una serie de términos. Los términos definidos en el presente documento tienen significados que entiende comúnmente una persona con conocimientos ordinarios en las áreas relevantes para la presente divulgación. Términos como "un", "una" y "el" o "la" no tienen por objeto referirse únicamente a

una entidad singular, sino que incluyen la clase general de la que se puede utilizar un ejemplo específico para ilustrar. La terminología del presente documento se utiliza para describir formas de realización específicas de la divulgación, pero su uso no delimita la divulgación, excepto como se describe en las reivindicaciones.

i. Definiciones

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “molécula aislada” se refiere a una molécula (donde la molécula es, por ejemplo, un polipéptido, un polinucleótido o un anticuerpo) que en virtud de su origen o fuente de derivación (1) no está asociada con componentes naturalmente asociados que la acompañan en su estado nativo, (2) está sustancialmente libre de otras moléculas de la misma fuente, por ejemplo, especie, célula de la que se expresa, biblioteca, etc., (3) es expresada por una célula de una especie diferente, o (4) no se produce en la naturaleza. Por lo tanto, una molécula que se sintetiza químicamente, o se expresa en un sistema celular diferente del sistema del que se origina naturalmente, estará “aislada” de sus componentes naturalmente asociados. También se puede producir una molécula sustancialmente libre de los componentes que naturalmente le están asociados mediante aislamiento, utilizando técnicas de purificación bien conocidas en la técnica. La pureza o homogeneidad de la molécula puede ensayarse mediante una serie de medios conocidos en la técnica. Por ejemplo, la pureza de una muestra de polipéptido puede analizarse mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción del gel para visualizar el polipéptido utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. Para ciertos fines, se puede proporcionar una resolución más alta mediante el uso de HPLC u otros medios bien conocidos en la técnica de purificación.

Un “anticuerpo” es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a un objetivo, como un carbohidrato, un polinucleótido, un lípido, un polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Tal como se utiliza en el presente documento, el término abarca no solo los anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también, a menos que se especifique lo contrario, cualquier porción de unión a antígeno de los mismos que compita con el anticuerpo intacto por la unión específica, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno. Las porciones de unión a antígeno incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, anticuerpos de dominio (dAbs, por ejemplo, anticuerpos de tiburón y camélido), fragmentos que incluyen regiones determinantes de complementariedad (CDR), anticuerpos de fragmento variable de cadena simple (scFv), maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv, y polipéptidos que contienen al menos una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir unión a antígeno específica al polipéptido objetivo. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, como IgG, IgA o IgM (o subclase de las mismas), y el anticuerpo no necesita ser de ninguna clase en particular. Según la secuencia de aminoácidos

del anticuerpo de la región constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellas pueden dividirse en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son conocidas en la técnica.

Una “región variable” de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o a la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, ya sea sola o en combinación. Como se sabe en la técnica, las regiones variables de las cadenas pesada y ligera consisten cada una en cuatro regiones marco (FR) conectadas por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), también conocidas como regiones hipervariables, y contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos. Si se desean variantes de una región variable objeto, particularmente con sustitución en residuos de aminoácidos fuera de una región CDR (es decir, en la región marco), se puede identificar una sustitución de aminoácidos apropiada, preferiblemente, una sustitución de aminoácidos conservadora, comparando la región variable objeto con las regiones variables de otros anticuerpos que contienen secuencias CDR1 y CDR2 en la misma clase canónica que la región variable objeto.

En ciertas formas de realización, la delimitación definitiva de una CDR y la identificación de los residuos que comprenden el sitio de unión de un anticuerpo se logran resolviendo la estructura del anticuerpo y/o resolviendo la estructura del complejo anticuerpo-ligando. En ciertas formas de realización, esto se puede lograr mediante cualquiera de una variedad de técnicas conocidas por los expertos en la materia, como la cristalografía de rayos X. En ciertas formas de realización, se pueden emplear varios métodos de análisis para identificar o aproximar las regiones CDR. En ciertas formas de realización, se pueden emplear varios métodos de análisis para identificar o aproximar las regiones CDR. Ejemplos de dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, la definición de Kabat, la definición de Chothia, la definición de AbM, la definición de contacto y la definición conformacional. En una forma de realización, las CDR de la presente divulgación se determinan mediante la definición de Kabat. En otra forma de realización, las CDR se determinan mediante la definición de Chothia.

Tal como se utiliza en el presente documento, el sistema de “índice UE” o “numeración UE” se basa en la numeración secuencial de la primera IgG humana secuenciada (el anticuerpo UE). Debido a que la referencia más común para esta convención es el manual de secuencias de Kabat, el índice UE a veces se utiliza erróneamente como sinónimo del índice Kabat. El índice UE no proporciona inserciones ni deleciones, y por lo tanto, en algunos casos, las comparaciones de las posiciones de IgG entre las subclases y especies de IgG pueden no ser claras, en particular en las regiones bisagra. No obstante, la convención ha sido suficiente para permitir una comparación directa entre las regiones Fc en numerosos estudios de función de estructura de Fc.

Tal como se utiliza en este documento, la “definición conformacional” de CDR se refiere a las posiciones de los CDR que pueden identificarse como los residuos que realizan contribuciones entálpicas a la unión del antígeno.

Tal como se utiliza en el presente documento, una CDR puede hacer referencia a las CDR definidas mediante cualquier método conocido en la técnica, incluidas combinaciones de métodos. Los métodos utilizados en el presente documento pueden utilizar las CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos métodos. Para cualquier forma de realización dada que contenga más de una CDR, las CDR pueden definirse de acuerdo con cualquiera de las definiciones de Kabat (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland (1991), IMGT, Chothia (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)), Martin, extendida, AbM (software de modelo de anticuerpo AbM que utiliza Oxford Molecular), de contacto, conformacional y/o cualquier método de determinación de CDR bien conocido en la técnica.

Los CDR se consideran comúnmente como bucles estructurados que participan en la unión de antígenos y exhiben una composición de aminoácidos hipervariable. La definición de un CDR en función de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos puede utilizar diferentes esquemas de numeración o utilizar diferentes definiciones de longitudes de CDR. Por ejemplo, las definiciones de CDR de Kabat (e IMGT) se basan en alineaciones de secuencias, mientras que la definición de CDR de Chothia refleja mejor la estructura de bucle en la arquitectura 3D de los anticuerpos. El esquema de numeración de Kabat se considera a menudo como el estándar que se adopta ampliamente para numerar los residuos de anticuerpos. El esquema de numeración de Chothia puede basarse en la alineación de las estructuras de los anticuerpos y garantiza una mejor correspondencia con los bucles estructurales. El esquema de numeración de Chothia establece que los residuos alineados topológicamente de diferentes anticuerpos se localizan en el mismo número de posición y que la definición de CDR de Chothia corresponde en la mayoría de las secuencias de anticuerpos a los bucles estructurales de unión al antígeno. Las CDR definidas en los aminoácidos hipervariables según Kabat y basadas en la topología de bucle en la nomenclatura de Chothia tienen para algunas CDR una ubicación desplazada y/o comprenden longitudes de bucle diferentes.

El esquema de numeración Martin se centra en la alineación estructural de diferentes regiones de la estructura de longitudes no convencionales. El esquema de numeración Martin destacó los residuos que están ausentes en la mayoría de las secuencias y estructuras y, por lo tanto, los define como posiciones de delección y propone una corrección del punto de inserción dentro de la región de la estructura 3 del dominio de la cadena pesada. El esquema de numeración Martin utiliza el software de numeración ABnum y proporciona un esquema de numeración que consiste en el sistema de numeración Chothia corregido por el software ABnum, que integra secuencias de Kabat, IMGT y las bases de datos PDB. El esquema de numeración IMGT es una referencia en inmunogenética e inmunoinformática y proporciona un sistema de numeración

estandarizado para todas las secuencias de proteínas de la superfamilia de inmunoglobulinas, incluidos los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos, así como las cadenas de receptores de células T de diferentes especies. El esquema de numeración IMGT se basa en la alineación de la secuencia de aminoácidos de los genes V de la línea germinal. El esquema de numeración IMGT cubre todos los dominios variables y desarrolló varias herramientas para analizar las secuencias de longitud completa. Alternativa o adicionalmente, se puede utilizar cualquier otro método o métodos nuevos no mencionados en la presente divulgación para determinar las CDR.

Como se conoce en la técnica, una “región constante” de un anticuerpo se refiere a la región constante de la cadena ligera del anticuerpo o a la región constante de la cadena pesada del anticuerpo, ya sea sola o en combinación.

Tal como se utiliza en el presente documento, “anticuerpo monoclonal” se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, ya que se dirigen contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante del antígeno. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a utilizar de acuerdo con la presente divulgación pueden fabricarse mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein, 1975, *Nature* 256:495, o pueden fabricarse mediante métodos de ADN recombinante como los descritos en la Patente de EE. UU. N.º 4.816.567. Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de bibliotecas de fagos generadas utilizando las técnicas conocidas en la materia.

Tal como se utiliza en el presente documento, el anticuerpo “humanizado” se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígenos de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una CDR del receptor se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. El anticuerpo humanizado puede comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR o marco importadas, pero que se incluyen para refinar y

optimizar aún más el rendimiento del anticuerpo.

Términos como “tratar”, o “tratamiento”, “alivio” o “aliviar” se refieren a (1) medidas terapéuticas que curan, retrasan, disminuyen los síntomas y/o detienen la progresión de una afección o trastorno patológico diagnosticado y/o (2) medidas profilácticas o preventivas que previenen y/o retrasan el desarrollo de una afección o trastorno patológico objetivo. Por lo tanto, aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen el trastorno; aquellos propensos a padecer el trastorno; y aquellos en quienes se debe prevenir el trastorno. En ciertos aspectos, un sujeto es “tratado” exitosamente para el cáncer de acuerdo con los métodos de la presente divulgación si el paciente muestra, por ejemplo, remisión total, parcial o transitoria de un cierto tipo de cáncer.

Un “anticuerpo humano” es aquel que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o que se ha elaborado utilizando cualquiera de las técnicas para elaborar anticuerpos humanos que se describen en el presente documento. Esta definición de anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígenos no humanos.

El término “anticuerpo quimérico” se refiere a anticuerpos en los que las secuencias de la región variable se derivan de una especie y las secuencias de la región constante se derivan de otra especie, como un anticuerpo en el que las secuencias de la región variable se derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de la región constante se derivan de un anticuerpo humano.

El término “suprimir” y/o “regular” la actividad de PDL1 y/o PDL2, como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de una molécula de unión anti-PD1, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo para unirse a PD1, que a su vez, en algunos aspectos, puede suprimir la actividad de PDL1 y/o PDL2 al disminuir al menos aproximadamente un 10 %, o al menos un 15 %, o al menos un 20 %, o al menos un 25 %, o al menos un 30 %, o al menos un 35 %, o al menos un 40 %, o al menos un 45 %, o al menos un 50 %, o al menos un 55 %, o al menos un 60 %, o al menos un 65 %, o al menos un 70 %, o al menos un 75 %, o al menos un 80 %, o al menos un 85 %, o al menos un 90 %, o al menos un 95

%, o al menos un 98 %, o al menos un 99 %, o al menos un 100% de la actividad de PDL1 y/o PDL2 cuando las células o una muestra entran en contacto con una molécula de unión anti-PD1, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente divulgación.

El término “epítopo” se refiere a la porción de una molécula capaz de ser reconocida por un anticuerpo y de unirse a él en una o más de las regiones de unión al antígeno del anticuerpo. Los epítomos a menudo consisten en una agrupación superficial de moléculas, como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. En algunas formas de realización, el epítopo puede ser un epítopo proteico. Los epítomos proteicos pueden ser

lineales o conformacionales. En un epítopo lineal, todos los puntos de interacción entre la proteína y la molécula que interactúa (como un anticuerpo) se producen linealmente a lo largo de la secuencia primaria de aminoácidos de la proteína. Un “epítopo no lineal” o “epítopo conformacional” comprende polipéptidos no contiguos (o aminoácidos) dentro de la proteína antigénica a la que se une un anticuerpo específico para el epítopo.

El término “epítopo antigénico” como se utiliza en el presente documento, se define como una porción de un antígeno al que un anticuerpo puede unirse específicamente según se determina mediante cualquier método bien conocido en la técnica, por ejemplo, mediante inmunoensayos convencionales. Una vez que se determina un epítopo deseado en un antígeno, es posible generar anticuerpos para ese epítopo. Alternativamente, durante el proceso de descubrimiento, la generación y caracterización de anticuerpos puede dilucidar información sobre epítopos deseables. Se puede realizar para examinar de forma competitiva los anticuerpos para determinar su unión al mismo epítopo. Un enfoque para lograr esto es realizar estudios de competencia y competencia cruzada para encontrar anticuerpos que compitan o compitan de forma cruzada entre sí para unirse a PD-1, por ejemplo, los anticuerpos compiten por unirse al antígeno.

Los presentes anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos contienen residuos de aminoácidos “paratopo” y “no paratopo”. Un aminoácido “paratopo” de un presente anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede tener, por ejemplo, un núcleo atómico dentro de aproximadamente 4 Å de un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo se une preferentemente a la isoforma PD-1. Debido a que cada isoforma forma un complejo estructuralmente diferente con los presentes anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, los residuos de paratopo pueden ser diferentes para cada isoforma. Un “anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo se une preferentemente al residuo de paratopo PD-1”, por ejemplo, tiene un núcleo atómico dentro de aproximadamente 4 Å de un núcleo atómico de anticuerpo humano o una porción de unión al antígeno del mismo se une preferentemente a PD-1. Un residuo de “anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo se une preferentemente al paratopo PD-1” puede tener, por ejemplo, un núcleo atómico dentro de aproximadamente 4 Å de un núcleo atómico de todas las isoformas.

Un residuo se designa como residuo paratópico independientemente de su ubicación dentro de una región CDR o FW (Framework), según se define en la nomenclatura de Kabat. Muchos residuos paratópicos se encuentran dentro de regiones CDR, como se muestra en la TABLA 15, por ejemplo. Sin embargo, algunos residuos paratópicos se encuentran dentro de las regiones FW. Un aminoácido “no paratópico” es cualquier aminoácido del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que no sea un aminoácido “paratópico”, independientemente de si el residuo se encuentra en una región CDR o FW.

Los términos “Muerte programada 1”, “Muerte celular programada 1”, “Proteína PD-1”, “PD-1”, PD1”, “PD-1”, “PD-1”, “PD-1” y “PD-1” se utilizan indistintamente e incluyen variantes,

isoformas, homólogos de especies de PD-1 humana y análogos que tienen al menos un epítipo común con PD-1. La secuencia completa de PD-1 se puede encontrar en GenBank con el número de acceso U64863 y se incorpora aquí como referencia.

El término “agonista” se refiere a una sustancia que promueve (es decir, induce, provoca, potencia o aumenta) la actividad biológica o el efecto de otra molécula. El término agonista abarca sustancias que se unen al receptor, como un anticuerpo, y sustancias que promueven la función del receptor sin unirse a él (por ejemplo, activando una proteína asociada).

El término “antagonista” o “inhibidor” se refiere a una sustancia que previene, bloquea, inhibe, neutraliza o reduce una actividad biológica o un efecto de otra molécula, como un receptor.

Tal como se utiliza en el presente documento, un “anticuerpo anti-PD-1” se refiere a un anticuerpo que es capaz de inhibir la actividad biológica de PD-1 y/o los eventos posteriores mediados por PD-1. Los anticuerpos anti-PD-1 abarcan anticuerpos que bloquean, antagonizan, suprimen o reducen (en cualquier grado, incluso significativamente) la actividad biológica de PD-1, incluidos los eventos posteriores mediados por PD-1, como la unión y la señalización posterior de PD-L1, la unión y la señalización posterior de PD-L2, la inhibición de la proliferación de células T, la inhibición de la activación de células T, la inhibición de la secreción de IFN, la inhibición de la secreción de IL-2, la inhibición de la secreción de TNF, la inducción de IL-10 y la inhibición de las respuestas inmunitarias antitumorales. Para los fines de la presente divulgación, se entenderá que el término “anticuerpo anti-PD-1” (denominado indistintamente “anticuerpo PD-1”) abarca todos los términos, títulos y estados y características funcionales identificados previamente mediante los cuales el PD-1 en sí, una actividad biológica de PD-1 o las consecuencias de la actividad biológica, se anulan, disminuyen o neutralizan sustancialmente en cualquier grado. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-PD-1 se une a PD-1 y regula positivamente una respuesta inmunitaria antitumoral. En el presente documento se proporcionan ejemplos de anticuerpos anti-PD-1, como P1801. En una forma de realización, P1801 se genera primero como una versión murina y luego se puede humanizar para uso humano. En algunas formas de realización, RMP 1-14, que es una versión conocida del anticuerpo monoclonal anti-PD1 murino, se puede utilizar para demostrar la eficacia en modelos de ratones.

Los términos “polipéptido”, “oligopéptido”, “péptido” y “proteína” se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a cadenas de aminoácidos de cualquier longitud. La cadena puede ser lineal o ramificada, puede comprender aminoácidos modificados y/o puede estar interrumpida por elementos que no sean aminoácidos. Los términos también abarcan una cadena de aminoácidos que se ha modificado de forma natural o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, como la conjugación con un componente de marcación. También se incluyen en la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluidos, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras

modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que los polipéptidos pueden presentarse como cadenas individuales o cadenas asociadas.

Como se conoce en la técnica, “polinucleótido” o “ácido nucleico”, como se usan indistintamente en el presente documento, se refieren a cadenas de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse a una cadena mediante la ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, como nucleótidos metilados y sus análogos. Si están presentes, la modificación de la estructura del nucleótido puede impartirse antes o después del ensamblaje de la cadena. La secuencia de nucleótidos puede ser interrumpida por componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede modificarse aún más después de la polimerización, como por ejemplo mediante conjugación con un componente de marcado. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, “tapones”, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales por un análogo, modificaciones internucleotídicas como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (p. ej., metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (p. ej., fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellas que contienen fracciones colgantes, como, por ejemplo, proteínas (p. ej., nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), aquellas con intercaladores (p. ej., acridina, psoraleno, etc.), aquellas que contienen quelantes (p. ej., metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellas que contienen alquilantes, aquellas con enlaces modificados (p. ej., ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del polinucleótido o los polinucleótidos. Además, cualquiera de los grupos hidroxilo presentes habitualmente en los azúcares se puede sustituir, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, proteger mediante grupos protectores estándar o activar para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales, o se puede conjugar con soportes sólidos. El OH terminal 5' y 3' se puede fosforilar o sustituir con aminas o grupos de cobertura (capping) orgánicos de entre 1 y 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también se pueden derivatizar a grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares ribosa o desoxirribosa que son generalmente conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares alfa- o beta-anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares piranosa, azúcares furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos tales como metil ribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden ser reemplazados por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero no se limitan a, formas de realización en las que el fosfato se reemplaza por P(O)S (“tioato”), P(S)S (“ditioato”), (O)NR₂ (“amidato”), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ (“formacetal”), en los que cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C) que contiene opcionalmente

un enlace éter (—O—), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o aralilo. No todos los enlaces en un polinucleótido necesitan ser idénticos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en este documento, incluidos el ARN y el ADN.

Un anticuerpo que se “une preferentemente” o “se une específicamente” (usados indistintamente en el presente documento) a un epítipo son términos que se entienden en la técnica, y también se conocen en la técnica métodos para determinar dicha unión específica o preferencial. Se dice que una molécula exhibe “unión específica” o “unión preferencial” si reacciona o se asocia con mayor frecuencia, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con una célula o sustancia particular que con células o sustancias alternativas. Un anticuerpo se “une específicamente” o “se une preferencialmente” a un objetivo si se une con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración que la que se une a otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específica o preferencialmente a un epítipo PD-1 es un anticuerpo que se une a este epítipo con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración que la que se une a otros epítipos PD-1 o epítipos que no sean PD-1. Al leer esta definición, también se entiende que, por ejemplo, un anticuerpo (o fracción o epítipo) que se une de forma específica o preferencial a un primer objetivo puede o no unirse de forma específica o preferencial a un segundo objetivo. Como tal, la “unión específica” o la “unión preferencial” no requieren necesariamente (aunque pueden incluir) una unión exclusiva. Generalmente, pero no necesariamente, la referencia a la unión significa una unión preferencial.

Tal como se utiliza en este documento, “sustancialmente puro” se refiere a un material que es al menos 50% puro (es decir, libre de contaminantes), al menos 90% puro, al menos 95% puro, al menos 98% puro o al menos 99% puro.

Una “célula huésped” incluye una célula individual o un cultivo celular que puede ser o ha sido receptor de uno o más vectores para la incorporación de insertos de polinucleótidos. Las células huésped incluyen la progenie de una sola célula huésped, y la progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN genómico) a la célula progenitora original debido a una mutación natural, accidental o deliberada. Una célula huésped incluye células transfectadas *in vivo* con uno o más polinucleótidos de esta divulgación. Un ejemplo es *E. Coli*.

Tal como se utiliza en el presente documento, cualquier rango de concentración, rango de porcentaje, rango de relación o rango de números enteros debe entenderse que incluye el valor de cualquier número entero dentro del rango mencionado y, cuando corresponda, fracciones del mismo (como una décima y una centésima de un número entero), a menos que se indique lo contrario.

Tal como se utiliza en la técnica, los términos “receptor Fc” y “FcR” describen un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluidas las variantes alélicas y las formas empalmadas alternativamente de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen

FcγRIIA (un “receptor activador”) y FcγRIIB (un “receptor inhibidor”), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplasmáticos. Los FcR se analizan y son conocidos en la técnica. “FcR” también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto.

El término “competir”, como se utiliza en el presente documento con respecto a un anticuerpo, significa que un primer anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, se une a un epítipo de una manera suficientemente similar a la unión de un segundo anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, de modo que el resultado de la unión del primer anticuerpo con su epítipo cognado disminuye de forma detectable en presencia del segundo anticuerpo en comparación con la unión del primer anticuerpo en ausencia del segundo anticuerpo. La alternativa, en la que la unión del segundo anticuerpo a su epítipo también disminuye de forma detectable en presencia del primer anticuerpo, puede darse, pero no necesariamente. Es decir, un primer anticuerpo puede inhibir la unión de un segundo anticuerpo a su epítipo sin que ese segundo anticuerpo inhiba la unión del primer anticuerpo a su epítipo respectivo. Sin embargo, cuando cada anticuerpo inhibe de forma detectable la unión del otro anticuerpo con su epítipo o ligando cognado, ya sea en la misma medida, en mayor medida o en menor medida, se dice que los anticuerpos “compiten de forma cruzada” entre sí por la unión de su(s) epítipo(s) respectivo(s). La presente divulgación abarca tanto los anticuerpos competitivos como los de competencia cruzada. Independientemente del mecanismo por el que se produce dicha competencia o competencia cruzada (por ejemplo, impedimento estérico, cambio conformacional o unión a un epítipo común o parte del mismo), el experto en la materia apreciará, basándose en las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, que dichos anticuerpos competitivos y/o de competencia cruzada están abarcados y pueden ser útiles para los métodos divulgados en el presente documento.

Una “región Fc funcional” posee al menos una función efectora de una región Fc de secuencia nativa. Las “funciones efectoras” ejemplares incluyen la unión a C1q; citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos; fagocitosis; regulación negativa de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B), etc. Dichas funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpos) y se pueden evaluar utilizando varios ensayos conocidos en la técnica para evaluar dichas funciones efectoras de anticuerpos.

Una “región Fc de secuencia nativa” comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc que se encuentra en la naturaleza. Una “región Fc variante” comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácidos, pero que conserva al menos una función efectora de la región Fc de secuencia nativa. Preferiblemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de

secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc variante de la presente invención puede poseer al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental, al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia con la misma, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, o al menos un 99,5 % de identidad de secuencia con la misma.

Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "dosis" y "dosificación" se refieren a una cantidad de ingrediente(s) activo(s) que se pretende administrar a un sujeto cada vez. Cada dosis y dosificación puede contener una cantidad constante y/o variable de ingrediente(s) activo(s), que, dependiendo del contexto, puede ser diferente en cada dosis o dosificación. La dosis unitaria o dosificación unitaria puede ser en forma de comprimido, cápsula, sobre o líquido, etc. Por ejemplo, una dosis (por ejemplo, en forma de uno o dos comprimidos separados) puede ser de 0,5 mg de compuesto A o incluir 0,5 mg de compuesto A y 0,1 mg de compuesto B. Dependiendo del contexto, los términos dosis y dosificación se pueden utilizar indistintamente. Tal como se utiliza en el presente documento, una "dosis eficaz", "dosis efectiva" o "cantidad eficaz" de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para producir uno o más resultados beneficiosos o deseados. En aspectos más específicos, una cantidad eficaz previene, alivia, mejora los síntomas de la enfermedad y/o prolonga la supervivencia del sujeto que se está tratando. Para uso profiláctico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen, entre otros: eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retrasar la aparición de la enfermedad, incluidos los síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Para uso terapéutico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen, entre otros, resultados clínicos como la reducción de uno o más síntomas de una enfermedad como, por ejemplo, cáncer, incluidos, por ejemplo, sin limitación, tumores sólidos, la disminución de la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, la mejora del efecto de otro medicamento y/o el retraso de la progresión del cáncer en pacientes. Una dosis eficaz puede administrarse en una o más administraciones. Para los fines de esta divulgación, una dosis eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para lograr un tratamiento profiláctico o terapéutico, ya sea directa o indirectamente. Como se entiende en el contexto clínico, una dosis eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica puede o no lograrse junto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por lo tanto, una "dosis eficaz" o "cantidad eficaz" puede considerarse en el contexto de la administración de uno o más agentes terapéuticos, y un agente

único puede considerarse administrado en una cantidad eficaz si, junto con uno o más agentes adicionales, puede lograrse o se logra un resultado deseable.

Un “individuo” o un “sujeto” es un mamífero, un ejemplo no limitativo es un ser humano. Los mamíferos también incluyen, pero no se limitan a, animales de granja (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, pollos, etc.), animales de deporte, mascotas, primates, caballos, perros, gatos, ratones y ratas.

Tal como se utiliza en el presente documento, “vector” o “vector de expresión” significa una construcción que es capaz de administrar y expresar uno o más genes o secuencias de interés en una célula huésped. Los ejemplos de vectores incluyen, entre otros, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudos, vectores de plásmidos, cósmidos o fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónicos, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas y ciertas células eucariotas, como las células productoras.

Tal como se utiliza en el presente documento, “secuencia de control de expresión” significa una secuencia de ácido nucleico que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Una secuencia de control de expresión puede ser un promotor, como un promotor constitutivo o inducible, o un potenciador. La secuencia de control de expresión está unida operativamente a la secuencia de ácido nucleico que se va a transcribir.

Tal como se utiliza en el presente documento, “vehículo farmacéuticamente aceptable” o “excipiente farmacéuticamente aceptable” incluye cualquier material que, cuando se combina con un ingrediente activo, permite que el ingrediente conserve la actividad biológica o la estabilidad y no es reactivo con el sistema inmunológico del sujeto. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar, como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones como una emulsión de aceite/agua y varios tipos de agentes humectantes. Los diluyentes preferidos para la administración en aerosol o parenteral son la solución salina tamponada con fosfato (PBS) o la solución salina normal (0,9%). Las composiciones que comprenden dichos vehículos se formulan mediante métodos convencionales conocidos.

El término “kon”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad de asociación de un anticuerpo a un antígeno. Específicamente, las constantes de velocidad (kon y koff) y las constantes de disociación de equilibrio se miden utilizando anticuerpos de longitud completa y/o fragmentos de anticuerpos Fab (es decir, univalentes) y PD-1.

El término “koff”, como se utiliza en este documento, se refiere a la constante de velocidad de disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno.

El término “modulador inmunitario” se refiere a una sustancia capaz de alterar (por ejemplo, inhibir, disminuir, aumentar, potenciar o estimular) la respuesta inmunitaria (tal como se define en el presente documento) o el funcionamiento de cualquier componente del sistema

inmunitario innato, humoral o celular de un mamífero huésped. Por lo tanto, el término “modulador inmunitario” abarca el “potenciador de células efectoras inmunitarias” tal como se define en el presente documento y el “inhibidor de células inmunosupresoras” tal como se define en el presente documento, así como una sustancia que afecta a otros componentes del sistema inmunitario de un mamífero.

El término “respuesta inmunitaria” se refiere a cualquier respuesta detectable a una sustancia particular (como un antígeno o inmunógeno) por parte del sistema inmunitario de un mamífero huésped, como las respuestas inmunitarias innatas (por ejemplo, la activación de la cascada de señalización del receptor Toll), las respuestas inmunitarias mediadas por células (por ejemplo, respuestas mediadas por células T, como las células T específicas del antígeno y las células no específicas del sistema inmunitario) y las respuestas inmunitarias humorales (por ejemplo, respuestas mediadas por células B, como la generación y secreción de anticuerpos en el plasma, la linfa y/o los fluidos tisulares).

El término “inmunogénico” se refiere a la capacidad de una sustancia de causar, provocar, estimular o inducir una respuesta inmunitaria, o de mejorar, potenciar, aumentar o prolongar una respuesta inmunitaria preexistente, contra un antígeno particular, ya sea solo o cuando está unido a un portador, en presencia o ausencia de un adyuvante.

El término “inhibidor de células inmunosupresoras” o “inhibidor de ISC” se refiere a una sustancia capaz de reducir o suprimir la cantidad o la función de las células inmunosupresoras de un mamífero. Entre los ejemplos de células inmunosupresoras se incluyen las células T reguladoras (“T regs”), las células supresoras derivadas de mieloides y los macrófagos asociados a tumores.

El término “administración intradérmica (*intradermal administration*)”, “i.d.” o “administrado por vía intradérmica”, en el contexto de la administración de una sustancia a un mamífero, incluido un ser humano, se refiere a la administración de la sustancia en la capa de la dermis de la piel del mamífero. La piel de un mamífero se compone de una capa de epidermis, una capa de dermis y una capa subcutánea. La epidermis es la capa exterior de la piel. La dermis, que es la capa intermedia de la piel, contiene terminaciones nerviosas, glándulas sudoríparas y glándulas sebáceas, folículos pilosos y vasos sanguíneos. La capa subcutánea está formada por grasa y tejido conectivo que alberga vasos sanguíneos y nervios más grandes. En cambio, en la administración intradérmica, la “administración subcutánea” se refiere a la administración de una sustancia en la capa subcutánea y la “administración tópica” se refiere a la administración de una sustancia sobre la superficie de la piel.

El término “prevenir” o “prevenir” se refiere a (a) evitar que ocurra un trastorno o (b) retrasar la aparición de un trastorno o la aparición de los síntomas de un trastorno.

El término “antígeno asociado a tumores (*tumour-associated antigen*)” o “TAA” se refiere a un antígeno que se expresa específicamente en células tumorales o que se expresa con mayor frecuencia o densidad en células tumorales que en células no tumorales del mismo tipo

de tejido. Los antígenos asociados a tumores pueden ser antígenos que normalmente no expresa el huésped; pueden estar mutados, truncados, mal plegados o ser manifestaciones anormales de moléculas que normalmente expresa el huésped; pueden ser idénticos a moléculas que se expresan normalmente pero que se expresan en niveles anormalmente altos; o pueden expresarse en un contexto o medio que es anormal. Los antígenos asociados a tumores pueden ser, por ejemplo, proteínas o fragmentos de proteínas, carbohidratos complejos, gangliósidos, haptenos, ácidos nucleicos o cualquier combinación de estas u otras moléculas biológicas.

El término “vacuna” se refiere a una composición inmunogénica para administración a un mamífero con el fin de provocar una respuesta inmunitaria contra un antígeno particular en el mamífero. Una vacuna contiene típicamente un agente (conocido como “antígeno” o “inmunógeno”) que se asemeja o deriva del objetivo de la respuesta inmunitaria, como un microorganismo causante de una enfermedad o células tumorales. Una vacuna destinada al tratamiento de un tumor, como un cáncer, contiene típicamente un antígeno que se deriva de un TAA que se encuentra en el tumor objetivo y es capaz de provocar inmunogenicidad contra el TAA en el tumor objetivo.

El término “régimen de inmunoterapia basado en vacunas” se refiere a un régimen terapéutico en el que se administra una vacuna en combinación con uno o más moduladores inmunitarios. La vacuna y los moduladores inmunitarios pueden administrarse juntos en una única formulación o administrarse por separado.

El término “porción de unión al antígeno” de un anticuerpo (o simplemente “porción de anticuerpo”), como se utiliza en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, PD-1). Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término “porción de unión al antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1;

(iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb, que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que permite que se formen como una cadena proteica única en la que las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv)). Dichos anticuerpos de cadena única también están destinados a estar incluidos dentro del término “porción de unión al antígeno” de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por aquellos con

experiencia en la materia, y los fragmentos se examinan para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

El término “anticuerpo humano”, como se utiliza en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones de estructura como las regiones CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la divulgación pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término “anticuerpo humano”, como se utiliza en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, como un ratón, se han injertado en secuencias de estructura humana.

El término “anticuerpo monoclonal humano” se refiere a anticuerpos que muestran una única especificidad de unión que tienen regiones variables en las que tanto la región de estructura como la región CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una forma de realización, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionados a una célula inmortalizada.

El término “anticuerpo humanizado” o “anticuerpo humano recombinante”, como se utiliza en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir del mismo (descrito más adelante), (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatorios recombinantes, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones de estructura y CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Sin embargo, en ciertas formas de realización, dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se utiliza un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, si bien se derivan de y están relacionadas con las secuencias VH y VL de la línea germinal humana, pueden no

existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos in vivo.

Como se utiliza en este documento, “isotipo” se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada.

Las frases “un anticuerpo que reconoce un antígeno” y “un anticuerpo específico para un antígeno” se utilizan indistintamente en este documento con el término “un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno”.

El término “derivados de anticuerpos humanos” se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo humano, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

El término “anticuerpo quimérico” se refiere a anticuerpos en los que las secuencias de la región variable se derivan de una especie y las secuencias de la región constante se derivan de otra especie, como un anticuerpo en el que las secuencias de la región variable se derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de la región constante se derivan de un anticuerpo humano.

El término “Kassoc” o “Ka”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a la tasa de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, mientras que el término “Kdis” o “Kd”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a la tasa de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. El término “KD”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de disociación, que se obtiene a partir de la relación entre Kd y KA (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de KD para anticuerpos se pueden determinar utilizando métodos establecidos en la técnica. Un método para determinar la KD de un anticuerpo es mediante el uso de resonancia de plasmón de superficie, como por ejemplo mediante el uso de un sistema de biosensores como un sistema Biacore (marca registrada).

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “alta afinidad” respecto de un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una KD de aproximadamente 10^{-8} M o menos, aproximadamente 10^{-9} M o menos, o aproximadamente 10^{-10} M o menos respecto de un antígeno objetivo. Sin embargo, la unión de “alta afinidad” puede variar para otros isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, la unión de “alta afinidad” para un isotipo IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una KD de aproximadamente 10^{-7} M o menos, aproximadamente 10^{-8} M o menos, o aproximadamente 10^{-9} M o menos.

Tal como se utiliza en el presente documento, “aproximadamente” significa dentro de un rango de error aceptable para el valor particular según lo determine una persona con conocimientos ordinarios en la materia, lo que dependerá en parte de cómo se mida o determine el valor, es decir, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, “aproximadamente” puede significar dentro de 1 o más de 1 desviación estándar según la práctica en la materia. Alternativamente, “aproximadamente” puede significar un rango de hasta $\pm 5\%$, $\pm 10\%$, $\pm 15\%$ o $\pm 20\%$. Además, particularmente con respecto a sistemas o procesos biológicos, los términos

pueden significar hasta un orden de magnitud o hasta ± 3 veces un valor. Cuando se proporcionan valores particulares en la solicitud y las reivindicaciones, a menos que se indique lo contrario, se debe asumir que el significado de “aproximadamente” está dentro de un rango de error aceptable para ese valor particular. La referencia a “aproximadamente” de un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) formas de realización que están dirigidas a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, la descripción que hace referencia a “aproximadamente X” incluye la descripción de “X”. Los rangos numéricos incluyen los números que definen el rango. Adicionalmente o alternativamente, a lo largo de esta divulgación, los valores expresados en un formato de rango deben interpretarse de manera flexible para incluir no solo los valores numéricos explícitamente citados como los límites del rango, sino también para incluir todos los valores numéricos individuales o subrangos abarcados dentro de ese rango como si cada valor numérico y subrango se citara explícitamente. Por ejemplo, un rango de “aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 5 %” o “aproximadamente 0,1 % a 5 %” debe interpretarse para incluir no solo aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 5 %, sino también los valores individuales (por ejemplo, 1 %, 2 %, 3 % y 4 %) y los subrangos (por ejemplo, 0,1 % a 0,5 %, 1,1 % a 2,2 %, 3,3 % a 4,4 %) dentro del rango indicado y puede tener hasta dos decimales para dicho número. La afirmación “sobre X a Y” tiene el mismo significado que “sobre X a aproximadamente Y”, a menos que se indique lo contrario. Asimismo, la afirmación “sobre X, Y o sobre Z” tiene el mismo significado que “sobre X, sobre Y o sobre Z”, a menos que se indique lo contrario.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “modificaciones de secuencia conservadoras” pretende referirse a modificaciones de aminoácidos que no afectan ni alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Dichas modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y eliminaciones de aminoácidos. Las modificaciones se pueden introducir en un anticuerpo de la divulgación mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras son aquellas en las que el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas en beta (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR de un anticuerpo de la divulgación se pueden reemplazar con otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadena lateral y el anticuerpo alterado se puede analizar para determinar la función retenida (es decir, las funciones establecidas en (c) a (l) anteriormente) utilizando los

ensayos funcionales descritos en este documento.

El término “tratamiento” o “terapia” se refiere a la administración de un agente activo con el propósito de curar, sanar, aliviar, alterar, remediar, mejorar, optimizar o afectar una condición (por ejemplo, una enfermedad), los síntomas de la condición, o para prevenir o retrasar la aparición de los síntomas, complicaciones, indicios bioquímicos de una enfermedad, o de otra manera detener o inhibir un mayor desarrollo de la enfermedad, condición o trastorno de una manera estadísticamente significativa.

Un “evento adverso” (EA) como se utiliza en el presente documento es cualquier signo (incluido un hallazgo de laboratorio anormal), síntoma o enfermedad desfavorable y generalmente no intencionado, incluso indeseable, asociado con el uso de un tratamiento médico. Por ejemplo, un evento adverso puede estar asociado con la activación del sistema inmunológico o la expansión de células del sistema inmunológico (por ejemplo, células T) en respuesta a un tratamiento. Un tratamiento médico puede tener uno o más EA asociados y cada EA puede tener el mismo nivel de gravedad o uno diferente. La referencia a métodos capaces de “alterar los eventos adversos” significa un régimen de tratamiento que disminuye la incidencia y/o gravedad de uno o más EA asociados con el uso de un régimen de tratamiento diferente.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “fármaco” se refiere a cualquier compuesto que posea una actividad biológica deseada y un grupo funcional reactivo disponible para preparar el conjugado de la divulgación. La actividad biológica incluye la actividad para su uso en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de una enfermedad en humanos u otros animales. Por lo tanto, siempre que tenga el grupo funcional reactivo necesario, el compuesto implicado en el término “fármaco” incluye fármacos identificados en la farmacopea nacional oficial, así como, por ejemplo, la farmacopea homeopática oficial de los Estados Unidos, el formulario nacional oficial o cualquier suplemento de los mismos. Los fármacos ejemplares se establecen en la Referencia de escritorio del médico (PDR) y en el Libro naranja mantenido por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA).

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “fármaco biológico” se refiere a cualquier compuesto o proteína que posee una actividad biológica deseada y un grupo funcional reactivo disponible para preparar el conjugado de la divulgación. La actividad biológica incluye la actividad para su uso en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de una enfermedad en humanos u otros animales. Por lo tanto, siempre que tenga el grupo funcional reactivo necesario, el compuesto o proteína implicado en el término “fármaco biológico” incluye fármacos identificados en la farmacopea nacional oficial, así como, por ejemplo, en el Libro Púrpura mantenido por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA).

Tal como se utiliza en este documento, el término CHC se refiere al carcinoma hepatocelular, que es un cáncer que comienza en el hígado. Es diferente de los cánceres de hígado “secundarios”, que se han propagado al hígado desde otros órganos.

El término “agentes citotóxicos” se refiere a sustancias que inhiben o bloquean la actividad de expresión celular, la función celular y/o dan lugar a la destrucción celular. El término incluye radioisótopos, agentes quimioterapéuticos y toxinas, como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas (incluidos fragmentos y/o variantes de las mismas) derivadas de bacterias, hongos, plantas o animales. Los ejemplos de agentes citotóxicos incluyen, entre otros: auristatinas (por ejemplo, auristatina E, auristatina F, MMAE y MMAF), clortetraciclina, metotanol, ricina, cadena A de ricina, cobustatina, dokamicina, dorastatina, adriamicina, daunorrubicina, paclitaxel, cisplatino, cc1065, bromuro de etidio, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, dicetona de dihidroxiantracnosis, actinomicina, toxina de difteria, exotoxina A de *Pseudomonas* (PE), PE40, abrina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, α -Sarcina, gelonina, retstrictocina, fenomicina, enomicina, curicina, crocotina, caliqueamicinas, sapaonaria officinalis, así como glucocorticoides y otros agentes quimioterapéuticos, así como radioisótopos como At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212 o Bi213, P32 y Lu (incluido Lu177). Los anticuerpos también se pueden conjugar con enzimas activadoras de profármacos anticancerígenos que pueden convertir un profármaco en la forma activa.

La Figura 1(a) denota la cadena pesada completa de P1801, incluyendo tres CDR y un dominio variable más regiones constantes. También incluye péptidos señal de la cadena pesada, que serán finalmente escindidos por la célula huésped. La secuencia completa de la cadena pesada se denota como SEQ ID NO: 1. La Figura 1(b) denota la cadena ligera completa de P1801, incluyendo tres CDR y un dominio variable más regiones constantes. También incluye péptidos señal de la cadena ligera, que serán finalmente escindidos por la célula huésped. La secuencia completa de la cadena ligera se denota como SEQ ID NO: 2. La Figura 1(c) denota la cadena pesada de P1801 sin péptido señal de la cadena pesada (SEQ ID No: 3). La Figura 1(d) denota la cadena ligera de P1801 sin péptido señal de la cadena ligera (SEQ ID No: 4). La Figura 1(f) denota la región variable de la cadena pesada completa de P1801 (SEQ ID No: 5). La figura 1(g) denota la región variable de cadena ligera completa de P1801 (SEQ ID No:6). La figura 1(h) denota la región constante de cadena pesada de P1801 (SEQ ID No:7). La figura 1(i) denota la región constante de cadena ligera de P1801 (SEQ ID No:8). La figura 1(j) denota la CDR1 de cadena pesada de P1801 (SEQ ID No:9). La figura 1(k) denota la CDR2 de cadena pesada de P1801 (SEQ ID No:10). La figura 1(l) denota la CDR3 de cadena pesada de P1801 (SEQ ID No:11). La figura 1(m) denota la CDR1 de cadena ligera de P1801 (SEQ ID No:12). La figura 1(n) denota la CDR2 de cadena ligera de P1801 (SEQ ID No:13). La figura 1(o) indica la cadena ligera CDR3 de P1801 (SEQ ID No:14). La figura 1(p) indica Péptido señal de la cadena pesada de P1801 (SEQ ID No: 15). La figura 1(q) indica péptido señal de cadena ligera de P1801 (SEQ ID No: 16). La figura 1(r) indica que la secuencia bisagra se encuentra en las cadenas pesadas (SEQ ID No: 17). La figura 1(s) indica una CDR1 de cadena pesada alternativa de P1801 (SEQ ID No: 18). La figura 1(t) indica una CDR1 de cadena pesada alternativa de P1801 (SEQ ID No:

19). La figura 1(u) indica una CDR1 de cadena pesada alternativa de P1801 (SEQ ID No: 20). La figura 1(v) indica una CDR1 de cadena pesada alternativa de P1801 (SEQ ID No: 21). La figura 1(w) indica una CDR2 de cadena pesada alternativa de P1801 (SEQ ID No: 10). La figura 1(x) indica una CDR3 de cadena pesada alternativa de P1801 (SEQ ID No: 23).

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “P1801” se refiere al anticuerpo monoclonal anti-PD-1 de la presente divulgación tal como se indica en la Figura 1. Las secuencias de aminoácidos detalladas, como las cadenas pesadas/ligeras y todas las CDR o CDR alternativas, se indican en las Figuras 1(a) a 1(o) y en las Figuras 1(a) a 1(o) más la(s) Figura(s), sin péptidos señal. La Figura 1 indica el mapeo de P1801 humano con CDR alternativa en las Figuras 1(s).

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “P1101”, “Ropeg” y/o “interferón- α 2b humano pegilado” se utilizan indistintamente. P1101 es conocido en la técnica, por ejemplo, véanse los números de patente de EE. UU.: US 8.143.214 B2, US 8.273.343, US 8.617.532 y/o US 8.106.160 B2, cuyo contenido se incorpora en su totalidad al presente documento. Véanse también los números de solicitud de patente de EE. UU.: US20170326206A1, US20220152156A1, US20220362343A1 y/o US20230057788A1, cuyo contenido se incorpora en su totalidad al presente documento. En suma, por ejemplo, en el mismo se describen la fórmula química, el método de fabricación y sus usos. Para mayor comodidad, su estructura se denota En suma en la Figura 2. Más específicamente, el interferón es la versión que es funcional en sujetos humanos para P1101.

Tal como se utiliza en este documento, el término “mP1101” se refiere a la misma estructura de pegilación y enlazador que P1101, excepto que el interferón es la versión de ratón que es funcional en sujetos murinos.

ii. Composición y perfil molecular

Secuencia de péptidos

Las figuras 1(a) a 1(x) muestran las diversas formas de realización de la secuencia de aminoácidos de P1801. La tabla 1 a continuación muestra las características moleculares de P1801.

Tabla 1

Propiedad	Descripción
Fórmula molecular	$C_{6410}H_{9854}N_{1690}O_{2014}S_{42}$
Peso molecular	146.799 Da
Forma física/apariencia	Líquido transparente incoloro, esencialmente libre de partículas visibles.

Coeficiente de extinción a 280 nm	1,621 mLmg ⁻¹ cm ⁻¹
pI	6.6

En ciertas formas de realización, el anticuerpo de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada de un gen de inmunoglobulina de cadena pesada de línea germinal particular y/o una región variable de cadena ligera de un gen de inmunoglobulina de cadena ligera de línea germinal particular.

En una forma de realización, el ácido nucleico que codifica P1801 y el vector que expresa dichos aminoácidos contienen moléculas de ácido nucleico que codifican péptidos señal (SEQ ID No: 15 para la cadena pesada y SEQ ID No: 16 para la cadena ligera), donde el péptido señal se encuentra en el extremo N del dominio variable de la cadena pesada y/o de la cadena ligera. Además, en una forma de realización, el ácido nucleico que codifica el péptido señal de la cadena ligera no incluye ningún intrón. Estos péptidos señal pueden expresarse primero en una célula huésped y posteriormente escindirse por la célula huésped antes de la secreción o liberación a la solución fuera de la célula huésped, lo que da como resultado P1801.

Moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo P1801

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la divulgación. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico está "aislado" o "se vuelve sustancialmente puro" cuando se purifica a partir de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándar, que incluyen tratamiento alcalino/SDS, bandeo de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, ADN o ARN y pueden contener o no secuencias intrónicas. En una forma de realización preferida, el ácido nucleico es una molécula de eADN.

Los ácidos nucleicos de la presente divulgación se pueden obtener utilizando técnicas estándar de biología molecular. Para los anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos que portan genes de inmunoglobulina humana como se describe más adelante), los ADNc que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo elaborado por el hibridoma se pueden obtener mediante técnicas estándar de amplificación por PCR o clonación de ADNc. Para los anticuerpos obtenidos a partir de una biblioteca de genes de inmunoglobulina (por ejemplo, utilizando técnicas de presentación en fagos), el ácido nucleico que codifica el anticuerpo se puede recuperar de la biblioteca.

Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican los segmentos VH y VL, estos fragmentos de ADN pueden manipularse aún más mediante técnicas estándar de ADN recombinante, por ejemplo, para convertir los genes de la región variable en genes de cadena

de anticuerpos de longitud completa, en genes de fragmentos Fab o en un gen scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica VL o VH se une operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. El término "unido operativamente", tal como se utiliza en este contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN están unidos de tal manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en el marco.

En una forma de realización, el ADN aislado que codifica la región VH se puede convertir en un gen de cadena pesada de longitud completa mediante la unión operativa del ADN que codifica VH a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de genes de regiones constantes de cadena pesada humana son conocidas en la técnica, y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, en particular la región constante de IgG1 o IgG4. Para un gen de cadena pesada de fragmento Fab, el ADN que codifica VH se puede unir operativamente a otra molécula de ADN que codifica solo la región constante CH1 de cadena pesada.

En una forma de realización, el ADN aislado que codifica la región VL se puede convertir en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como en un gen de cadena ligera Fab) mediante la unión operativa del ADN que codifica VL a otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de genes de la región constante de cadena ligera humana son conocidas en la técnica y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, o una región constante kappa.

Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican VH y VL se unen operativamente a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly4-Ser)₃, de modo que las secuencias VH y VL se pueden expresar como una proteína de cadena sencilla contigua, con las regiones VL y VH unidas por el enlazador flexible.

iii. Método de elaboración

La divulgación también proporciona métodos para generar, seleccionar y elaborar anticuerpos anti-PD-1. Los anticuerpos de esta divulgación se pueden elaborar mediante procedimientos conocidos en la técnica. En algunas formas de realización, los anticuerpos se pueden elaborar de forma recombinante y expresarse utilizando cualquier método conocido en la técnica.

Clonación

Los vectores de clonación pueden construirse de acuerdo con técnicas conocidas, o pueden seleccionarse de un gran número de vectores de clonación disponibles en la técnica. Si bien el vector de clonación seleccionado puede variar de acuerdo con la célula huésped que se

pretende utilizar, los vectores de clonación del producto final generalmente tendrán la capacidad de autorreplicarse, poseer un único objetivo para una endonucleasa de restricción particular y/o pueden transportar genes para un marcador que puede usarse para seleccionar clones que contienen el vector. Los ejemplos adecuados incluyen plásmidos y virus bacterianos, por ejemplo, pUC18, pUC19, Bluescript (por ejemplo, pBS SK+) y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ADN de fagos y vectores lanzadera como pSA3 y pAT28. Estos y muchos otros vectores de clonación comerciales están disponibles de varios proveedores.

En esta divulgación se proporcionan además vectores de expresión. Los vectores de expresión son generalmente construcciones de polinucleótidos replicables que contienen un polinucleótido de acuerdo con la divulgación. Se da a entender que un vector de expresión debe ser replicable en las células huésped, ya sea como episomas o como parte integral del ADN cromosómico. Los vectores de expresión adecuados incluyen, entre otros, plásmidos, vectores virales, incluidos adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus, cósmidos y vector(es) de expresión divulgados en la publicación PCT n.º WO 87/04462. Los componentes del vector pueden incluir, en general, entre otros, uno o más de los siguientes: una secuencia señal; un origen de replicación; uno o más genes marcadores; elementos de control transcripcional adecuados (tales como promotores, potenciadores y terminadores). Para la expresión (es decir, la traducción), también se requieren habitualmente uno o más elementos de control de la traducción, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de inicio de la traducción y codones de terminación.

Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés pueden introducirse en la célula huésped mediante cualquiera de los diversos medios adecuados, entre los que se incluyen la electroporación, la transfección empleando cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano u otras sustancias; el bombardeo con microproyectiles; la lipofección; y la infección (por ejemplo, cuando el vector es un agente infeccioso como el virus vaccinia). La elección de introducir vectores o polinucleótidos depende de las características de la célula huésped.

La presente divulgación también proporciona células hospedadoras que comprenden cualquiera de los polinucleótidos descritos en este documento. Cualquier célula hospedadora capaz de sobreexpresar ADN heterólogo puede utilizarse con el fin de aislar los genes que codifican el anticuerpo, polipéptido o proteína de interés. Ejemplos no limitantes de células hospedadoras de mamíferos incluyen, entre otros, células COS, HeLa y CHO. Véase también la publicación PCT n.º WO 87/04462. Las células hospedadoras no mamíferas adecuadas incluyen procariotas (tales como *E. coli* o *B. subtilis*) y levaduras (tales como *S. cerevisiae*, *S. pombe*; o *K. lactis*). En un aspecto, las células hospedadoras expresan los ADNc a un nivel de aproximadamente 5 veces mayor, 10 veces mayor o incluso 20 veces mayor que el del anticuerpo o proteína endógenos correspondientes de interés, si están presentes, en las células hospedadoras. En una forma de realización, P1801 se puede elaborar utilizando células DG44

de ovario de hámster chino (CHO) con una línea celular con deficiencia del gen dhfr (dhfr-) y que provienen de uno de los linajes de células CHO.

La detección de la unión específica de las células huésped a PD-1 o a un dominio de PD-1 se realiza mediante un inmunoensayo o una clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Se puede identificar una célula que sobreexpresa el anticuerpo o la proteína de interés.

Un vector de expresión puede utilizarse para dirigir la expresión de un anticuerpo anti-PD-1. Un experto en la materia está familiarizado con la administración de vectores de expresión para obtener la expresión de una proteína exógena *in vivo*. Véase, por ejemplo, las patentes de EE. UU. números 6.436.908; 6.413.942; y 6.376.471, cuyo contenido se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad. La administración de vectores de expresión incluye la administración local o sistémica, que incluye inyección, administración oral, administración con pistola de partículas o cateterizada y administración tópica. En otra forma de realización, el vector de expresión se administra directamente al tronco o ganglio simpático, o en una arteria coronaria, aurícula, ventrículo o pericardio.

Los vectores se pueden transfectar a una célula huésped y almacenar en un Banco Celular Maestro. Normalmente, se extraen uno o dos viales del Banco Celular Maestro (MCB) de un recipiente con nitrógeno líquido. Después de descongelarlo a unos 37 °C, el vial del MCB se transfiere a un matraz de agitación Tri-forest de 125 ml con medio básico Dynamis precalentado en una cabina de bioseguridad. A continuación, las células se pueden cultivar a unos 37 °C en una incubadora INFORS con agitación.

Paso de cultivo de inóculo: Después de aproximadamente 72-96 horas de crecimiento celular, el cultivo de inóculo inicial se transfiere a un matraz agitador Tri-forest de 500 ml con medio básico Dynamis y aproximadamente 30 ml de células en una cabina de bioseguridad. Este paso de cultivo se puede repetir una o más veces según sea necesario.

Después del crecimiento celular, el medio celular se puede inocular en un SUB50 con un medio básico LC100B. La densidad celular se determina tomando muestras del cultivo y se mide utilizando un contador Beckman Vi-Cell. El pH del cultivo celular en lotes alimentados se controla. El nivel de oxígeno disuelto (OD) se puede mantener en aproximadamente el 45%, mientras se agita. El medio de alimentación y los componentes se pueden agregar individualmente según un programa fijo. Se agrega emulsión antiespumante según sea necesario. La densidad celular de inoculación puede ser de aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células/ml. Una vez que las células alcanzan la densidad celular máxima, se recolecta el cultivo celular. Después de la recolección, el cultivo en lotes alimentados se puede filtrar una o más veces. Después de la filtración, el cultivo se recolecta en una bolsa de almacenamiento de 50 L y se almacena a aproximadamente 4 °C. Los métodos conocidos en la técnica para purificar anticuerpos y otras proteínas también incluyen, por ejemplo, los descritos en las Publicaciones de Patentes de EE. UU. Nros. 2008/0312425, 2008/0177048 y 2009/0187005, cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Propiedades generales

P1801 bloquea la interacción del punto de control inmunológico PD-1 y su ligando PD-L1 para interrumpir el mecanismo de supresión inmunológica. P1801 puede pertenecer a la subclase IgG4 de anticuerpos humanos, que han demostrado exhibir propiedades únicas. Los anticuerpos IgG4 humanos pueden ser funcionalmente monovalentes *in vivo*, debido a la posibilidad de intercambiar medias moléculas (una cadena pesada y una ligera) entre sí, un proceso conocido como intercambio Fab-arm. Los dominios Fab de P1801 están conectados al Fc por la región bisagra con la secuencia de aminoácidos ESKYGPPCPPCP (SEQ ID No: 17) ubicada dentro de la región constante de la cadena pesada, que tiene una mutación S288P para reducir el intercambio Fab-arm. El IgG4 muestra una baja afinidad por el componente 1q del complemento (C1q) y los receptores Fc, lo que resulta en una toxicidad del complemento débilmente inducida y una activación celular dependiente de anticuerpos. Estas propiedades de IgG4 son preferidas en la inmunoterapia contra el cáncer cuando el reclutamiento de la función efectora del huésped no es deseable.

En otra forma de realización, P1801 puede mantener todas las regiones variables y cambiar los tipos de IgG a IgG1, IgG2, IgG3 u otros tipos.

Detección de hibridomas

Los anticuerpos anti-PD1, por ejemplo, P1801, también se pueden generar a partir de la detección de hibridomas. Por ejemplo, los anticuerpos murinos se seleccionaron como uno de los mejores clones por su alta afinidad de unión demostrada en ELISA. Tiene una unión específica con PD1 humano y tiene la capacidad de bloquear la unión de PD1 y PDL1/PDL2. La versión murina de P1801 se humanizó y se formateó como subtipo de inmunoglobulina humana IgG4, porque IgG4 tiene menos respuestas inmunitarias, como ADCC y CDC, que los otros subtipos IgG1 e IgG3; además. Las secuencias de ADN de P1801 se optimizaron por codones para la expresión. Los vectores de expresión de P1801 pueden sintetizarse mediante DNA2.0.

Visualización de fagos

En algunas formas de realización, los anticuerpos pueden prepararse y seleccionarse mediante tecnología de presentación en fagos. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.º 5.565.332; 5.580.717; 5.733.743; y 6.265.150, todas las cuales se incorporan íntegramente al presente documento mediante esta referencia. Alternativamente, la tecnología de presentación en fagos puede utilizarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de repertorios de genes del dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes del dominio V del anticuerpo se clonan en marco en un gen de proteína de cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales

del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que exhibe esas propiedades. Por lo tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La visualización de fagos se puede realizar en una variedad de formatos. Se pueden utilizar varias fuentes de segmentos de genes V para la visualización de fagos. La técnica conocida ha reportado el aislamiento de una serie diversa de anticuerpos anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados de los bazos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V de donantes humanos y se pueden aislar anticuerpos para una serie diversa de antígenos (incluidos los autoantígenos) siguiendo esencialmente las técnicas conocidas en la técnica. En una respuesta inmunitaria natural, los genes de anticuerpos acumulan mutaciones a una tasa alta (hipermutación somática). Algunos de los cambios introducidos conferirán una mayor afinidad, y las células B que muestran inmunoglobulina de superficie de alta afinidad se replican y diferencian preferentemente durante el desafío con antígeno posterior. Este proceso natural se puede imitar empleando la técnica conocida como "reproducción aleatoria de cadenas" conocida en la técnica. En este método, la afinidad de los anticuerpos humanos "primarios" obtenidos por visualización de fagos se puede mejorar reemplazando secuencialmente los genes de la región V de la cadena pesada y ligera con repertorios de variantes naturales (repertorios) de genes del dominio V obtenidos de donantes no inmunizados. Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos con afinidades en el rango pM-nM. Se ha descrito y se conoce en la técnica una estrategia para producir repertorios de anticuerpos de fagos muy grandes (también conocidos como "la madre de todas las bibliotecas"). La redistribución de genes también se puede utilizar para derivar anticuerpos humanos a partir de anticuerpos de roedores, donde el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo de roedor de partida. Según este método, que también se conoce como "impronta de epítomos", el gen del dominio V de la cadena pesada o ligera de los anticuerpos de roedores obtenidos por la técnica de visualización de fagos se reemplaza con un repertorio de genes del dominio V humanos, creando quimeras roedor-humano. La selección basada en el antígeno da como resultado el aislamiento de regiones variables humanas capaces de restaurar un sitio funcional de unión al antígeno, es decir, el epítipo gobierna (imprime) la elección del compañero. Cuando se repite el proceso para reemplazar el dominio V de roedor restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase la publicación PCT n.º WO 93/06213). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos de roedores mediante injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen residuos de CDR ni de estructura de origen de roedores.

En algunas formas de realización, los anticuerpos pueden producirse utilizando tecnología de hibridoma. Se contempla que cualquier sujeto mamífero, incluidos los seres humanos, o células productoras de anticuerpos a partir de ellos, pueden manipularse para que sirvan como base para la producción de líneas celulares de hibridoma de mamíferos, incluidos los seres humanos. La vía y el programa de inmunización del animal huésped se ajustan generalmente

a las técnicas conocidas para la estimulación y producción de anticuerpos, como se describe con más detalle en el presente documento. Normalmente, el animal huésped se inocula por vía intraperitoneal, intramuscular, oral, subcutánea, intraplantar y/o intradérmica con una cantidad de inmunógeno, como se describe en el presente documento.

Los hibridomas se pueden preparar a partir de los linfocitos y células de mieloma inmortalizadas utilizando la técnica general de hibridación de células somáticas. Se pueden utilizar líneas de mieloma disponibles en la hibridación. Generalmente, la técnica implica la fusión de células de mieloma y células linfoides utilizando un fusógeno como polietilenglicol, o por medios eléctricos bien conocidos por los expertos en la materia. Después de la fusión, las células se separan del medio de fusión y se cultivan en un medio de crecimiento selectivo, como el medio de hipoxantina-aminopterin-timidina (HAT), para eliminar las células parentales no hibridadas. Cualquiera de los medios descritos en este documento, suplementado con o sin suero, se puede utilizar para cultivar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales. Como otra alternativa a la técnica de fusión celular, se pueden utilizar células B inmortalizadas por EBV para producir los anticuerpos monoclonales PD-1 de la presente divulgación. Los hibridomas u otras células B inmortalizadas se expanden y subclonan, si se desea, y los sobrenadantes se analizan para determinar la actividad antiinmunógena mediante procedimientos de inmunoensayo convencionales (por ejemplo, radioinmunoensayo, inmunoensayo enzimático o inmunoensayo de fluorescencia).

Los hibridomas que pueden usarse como fuente de anticuerpos abarcan todos los derivados, células de progenie de los hibridomas parentales que producen anticuerpos monoclonales que se unen específica o preferencialmente a PD-1, o una porción del mismo.

Los hibridomas que producen dichos anticuerpos pueden cultivarse *in vitro* o *in vivo* utilizando procedimientos conocidos. Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse de los medios de cultivo o de los fluidos corporales mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas, como precipitación con sulfato de amonio, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía y ultrafiltración, si se desea. La actividad no deseada, si está presente, puede eliminarse, por ejemplo, haciendo pasar la preparación sobre adsorbentes hechos del inmunógeno unido a una fase sólida y eluyendo o liberando los anticuerpos deseados del inmunógeno. La inmunización de un animal huésped con un polipéptido PD-1, o un fragmento que contiene la secuencia de aminoácidos objetivo conjugada con una proteína que es inmunogénica en la especie que se va a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa, albúmina sérica, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja utilizando un agente derivatizante o bifuncional, por ejemplo, éster de maleimidobenzoyl sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxysuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl₂ o R'N=C=NR, donde R y R' son grupos alquilo diferentes, puede producir una población de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales).

En una forma de realización, el anticuerpo P1801 (monoclonal o policlonal) de interés puede secuenciarse y la secuencia de polinucleótidos puede clonarse luego en un vector para expresión o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés puede mantenerse en un vector en una célula huésped y la célula huésped puede luego expandirse y congelarse para uso futuro. La producción de anticuerpos monoclonales recombinantes en cultivo celular puede llevarse a cabo a través de la clonación de genes de anticuerpos de células B por medios conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo: Patente de EE. UU. N.º 7.314.622.

Humanización

En algunas formas de realización, la secuencia de polinucleótidos se puede utilizar para manipulación genética con el fin de “humanizar” el anticuerpo o mejorar la afinidad u otras características del anticuerpo. Los anticuerpos también se pueden personalizar para su uso, por ejemplo, en perros, gatos, primates, equinos y bovinos.

En algunas formas de realización, se pueden obtener anticuerpos completamente humanos utilizando ratones disponibles comercialmente que han sido diseñados para expresar proteínas de inmunoglobulina humana específicas. También se pueden utilizar animales transgénicos que están diseñados para producir una respuesta inmunitaria más deseable (por ejemplo, anticuerpos completamente humanos) o más robusta para la generación de anticuerpos humanizados o humanos. Ejemplos de dicha tecnología son Xenomouse (marca registrada) de Abgenix, Inc., HuMAb-Mouse (marca registrada) y TC Mouse (marca registrada) de Medarex, Inc.

Los anticuerpos también se pueden producir de forma recombinante aislando primero los anticuerpos y las células productoras de anticuerpos de animales hospedadores, obteniendo la secuencia génica y utilizando la secuencia génica para expresar el anticuerpo de forma recombinante en células hospedadoras (por ejemplo, células CHO). Otro método que se puede emplear es expresar la secuencia del anticuerpo en plantas (por ejemplo, tabaco) o leche transgénica. Se han descrito métodos para expresar anticuerpos de forma recombinante en plantas o leche. También se conocen en la técnica métodos para producir derivados de anticuerpos, por ejemplo, de dominio, de cadena sencilla, etc.

También se pueden emplear inmunoensayos y técnicas de clasificación por citometría de flujo, como la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), para aislar anticuerpos específicos para PD-1.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como fuente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión (como los vectores de expresión descritos en la publicación PCT n.º WO 87/04462), que luego se transfectan en células hospedadoras como células de E. coli, células COS de simio, células de ovario de hámster chino

(CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 87/04462. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de los dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas, o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no sea inmunoglobulina. De esa manera, se preparan anticuerpos “quiméricos” o “híbridos” que tienen la especificidad de unión de un anticuerpo monoclonal PD-1 de la presente invención.

Los fragmentos de anticuerpos se pueden producir mediante degradación proteolítica u otra degradación de los anticuerpos, mediante métodos recombinantes como los descritos anteriormente o mediante síntesis química. Los polipéptidos de los anticuerpos, especialmente polipéptidos más cortos de hasta aproximadamente 50 aminoácidos, se pueden preparar mediante síntesis química. Los métodos de síntesis química son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. Por ejemplo, un anticuerpo se podría producir mediante un sintetizador de polipéptidos automatizado que emplee el método de fase sólida. Véanse también las Patentes de EE. UU. N.º 5.807.715; 4.816.567; y 6.331.415, cuyo contenido se incorpora en la referencia en su totalidad.

En algunas formas de realización, un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se une preferentemente a PD-1 puede tener una región determinante de complementariedad de cadena pesada uno (VHCDR1), una región determinante de complementariedad de cadena pesada dos (VHCDR2) y/o una región determinante de complementariedad de cadena pesada tres (VHCDR3) obtenida de (por ejemplo, derivada, determinada o copiada de) la región variable de cadena pesada del anticuerpo P1801 (por ejemplo, la secuencia como se recita en SEQ ID NO: 5; y una región determinante de complementariedad de cadena ligera uno (VLCDR1), una región determinante de complementariedad de cadena ligera dos (VLCDR2) y/o una región determinante de complementariedad de cadena ligera tres (VLCDR3) obtenida de la región variable de cadena ligera del anticuerpo P1801 (por ejemplo, la secuencia como se recita en SEQ ID NO: 6). Dada una secuencia de región variable de cadena pesada o una secuencia de región variable de cadena ligera, un profesional experto podría determinar las seis secuencias CDR basándose en los métodos descritos en este documento o conocidos en la técnica.

En una forma de realización, el análisis del anticuerpo P1801 o una porción de unión a antígeno del mismo que se une preferentemente a PD-1 muestra que P1801 incluye una región determinante de complementariedad de cadena pesada uno (VHCDR1) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 9, una región determinante de complementariedad de cadena pesada dos (VHCDR2) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 10, y/o una región determinante de complementariedad de cadena pesada tres

(VHCDR3) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 11; y una región determinante de complementariedad de cadena ligera uno (VLCDR1) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 12, una región determinante de complementariedad de cadena ligera dos (VLCDR2) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 13, y/o una región determinante de complementariedad de cadena ligera tres (VLCDR3) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 14, según el método de Kabat.

En otra forma de realización, el análisis del anticuerpo P1801 o una porción de unión a antígeno del mismo que se une preferentemente a PD-1 muestra que P1801 incluye una región determinante de complementariedad de cadena pesada uno (VHCDR1) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 18, una región determinante de complementariedad de cadena pesada dos (VHCDR2) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 10, y/o una región determinante de complementariedad de cadena pesada tres (VHCDR3) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 11; y una región determinante de complementariedad de cadena ligera uno (VLCDR1) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 12, una región determinante de complementariedad de cadena ligera dos (VLCDR2) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 13, y/o una región determinante de complementariedad de cadena ligera tres (VLCDR3) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 14, según el método de Kabat.

Sin embargo, en una forma de realización, el análisis del anticuerpo P1801 o una porción de unión a antígeno del mismo que se une preferentemente a PD-1 muestra que P1801 incluye una región determinante de complementariedad de cadena pesada uno (VHCDR1) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 9, una región determinante de complementariedad de cadena pesada dos (VHCDR2) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 10, y/o una región determinante de complementariedad de cadena pesada tres (VHCDR3) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 20; y una región determinante de complementariedad de cadena ligera uno (VLCDR1) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 12, una región determinante de complementariedad de cadena ligera dos (VLCDR2) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 13, y/o una región determinante de complementariedad de cadena ligera tres (VLCDR3) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 14, según el método de Chothia.

Sin embargo, en una forma de realización, el análisis del anticuerpo P1801 o una porción de unión a antígeno del mismo que se une preferentemente a PD-1 muestra que P1801 incluye una región determinante de complementariedad de cadena pesada uno (VHCDR1) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 18, una región determinante de complementariedad de cadena pesada dos (VHCDR2) que incluye la secuencia de aminoácidos

como se recita en SEQ ID NO: 10, y/o una región determinante de complementariedad de cadena pesada tres (VHCDR3) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 20; y una región determinante de complementariedad de cadena ligera uno (VLCDR1) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 12, una región determinante de complementariedad de cadena ligera dos (VLCDR2) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 13, y/o una región determinante de complementariedad de cadena ligera tres (VLCDR3) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 14, según el método de Chothia.

En una forma de realización, el análisis del anticuerpo P1801 o una porción de unión a antígeno del mismo que se une preferentemente a PD-1 muestra que P1801 incluye una región determinante de complementariedad de cadena pesada uno (VHCDR1) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 19, una región determinante de complementariedad de cadena pesada dos (VHCDR2) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 10, y/o una región determinante de complementariedad de cadena pesada tres (VHCDR3) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 20; y una región determinante de complementariedad de cadena ligera uno (VLCDR1) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 12, una región determinante de complementariedad de cadena ligera dos (VLCDR2) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 13, y/o una región determinante de complementariedad de cadena ligera tres (VLCDR3) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 14, según el método de Chothia.

En otra forma de realización, el análisis del anticuerpo P1801 o una porción de unión a antígeno del mismo que se une preferentemente a PD-1 muestra que P1801 incluye una región determinante de complementariedad de cadena pesada uno (VHCDR1) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 21, una región determinante de complementariedad de cadena pesada dos (VHCDR2) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 10, y/o una región determinante de complementariedad de cadena pesada tres (VHCDR3) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 20; y una región determinante de complementariedad de cadena ligera uno (VLCDR1) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 12, una región determinante de complementariedad de cadena ligera dos (VLCDR2) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 13, y/o una región determinante de complementariedad de cadena ligera tres (VLCDR3) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 14, según el método de Chothia.

En una forma de realización, el análisis del anticuerpo P1801 o una porción de unión a antígeno del mismo que se une preferentemente a PD-1 muestra que P1801 incluye una región determinante de complementariedad de cadena pesada uno (VHCDR1) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 19, una región determinante de

complementariedad de cadena pesada dos (VHCDR2) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 10, y/o una región determinante de complementariedad de cadena pesada tres (VHCDR3) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 11; y una región determinante de complementariedad de cadena ligera uno (VLCDR1) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 12, una región determinante de complementariedad de cadena ligera dos (VLCDR2) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 13, y/o una región determinante de complementariedad de cadena ligera tres (VLCDR3) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 14, según el método de Chothia.

En otra forma de realización, el análisis del anticuerpo P1801 o una porción de unión a antígeno del mismo que se une preferentemente a PD-1 muestra que P1801 incluye una región determinante de complementariedad de cadena pesada uno (VHCDR1) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 21, una región determinante de complementariedad de cadena pesada dos (VHCDR2) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 10, y/o una región determinante de complementariedad de cadena pesada tres (VHCDR3) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 11; y una región determinante de complementariedad de cadena ligera uno (VLCDR1) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 12, una región determinante de complementariedad de cadena ligera dos (VLCDR2) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 13, y/o una región determinante de complementariedad de cadena ligera tres (VLCDR3) que incluye la secuencia de aminoácidos como se recita en SEQ ID NO: 14, según el método de Chothia.

iv. Propiedades

Se han aprobado al menos dos anticuerpos monoclonales humanos anti-PD1 conocidos y aprobados por la FDA, a saber, pembrolizumab (nombre comercial Keytruda) y nivolumab (nombre comercial OPDIVO). Ambos pueden tratar diversas enfermedades, como ciertos tipos de cáncer. Además, los epítopos de pembrolizumab y nivolumab en hPD1 son conocidos en la técnica.

En una forma de realización, como se indica en la Figura 8, por ejemplo, el P1801 de la presente divulgación se une al mismo epítipo de PD1 que el anticuerpo monoclonal anti-PD1 disponible en el mercado, como pembrolizumab y/o nivolumab, con superposición completa. En otra forma de realización, el P1801 se une sustancialmente a la misma región o tiene una superposición sustancial del epítipo de PD1 que el anticuerpo monoclonal anti-PD1 disponible en el mercado, como pembrolizumab y/o nivolumab. En otra forma de realización más, el P1801 se une parcialmente a la misma región del epítipo PD1 que el anticuerpo monoclonal anti-PD1 disponible en el mercado, como pembrolizumab y/o nivolumab. Sorprendentemente e inesperadamente, aunque P1801 se superpone parcialmente al epítipo PD1 en comparación con pembrolizumab y/o nivolumab, lo que sugeriría características más débiles, el rendimiento

cinético de P1801 es sustancialmente el mismo, si no mejor, que el de pembrolizumab y/o nivolumab.

Sin embargo, en una forma de realización, P1801 solo cubre parcialmente PD1, pero inesperadamente tiene un rendimiento al menos equivalente al del anticuerpo monoclonal anti-PD1 comercial existente.

En una forma de realización, la presente divulgación divulga un anticuerpo monoclonal anti-PD1 humano (P1801) con propiedades sustancialmente similares a las del anticuerpo monoclonal anti-PD1 disponible comercialmente (por ejemplo, pembrolizumab y/o nivolumab) en diversos aspectos, como propiedades moleculares y/o eficacia en el tratamiento del cáncer. Las características y propiedades ejemplares incluyen, entre otras, la fuerza de unión contra PD1 medida en KD, la estabilidad/vida útil y/o la capacidad para tratar el cáncer. La Figura 3 denota un ejemplo en un modelo de ratón.

En otra forma de realización, la presente divulgación divulga un anticuerpo monoclonal anti-PD1 humano (P1801) con propiedades sustancialmente mejores que el anticuerpo monoclonal anti-PD1 disponible comercialmente en varios aspectos, tales como propiedades moleculares y/o eficacia en el tratamiento del cáncer. Las características y propiedades ejemplares incluyen, entre otras, la fuerza de unión contra PD1 medida en KD, la estabilidad/vida útil y/o la capacidad para tratar varios tipos de cáncer.

En otra forma de realización, la presente divulgación divulga una combinación de P1101 con un anticuerpo monoclonal anti-PD1 humano (P1801) con propiedades sustancialmente mejores y/o que tienen efectos sinérgicos en comparación con el tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-PD1 disponible comercialmente solo en varios aspectos, como propiedades moleculares y/o eficacia en el tratamiento del cáncer. Las características y propiedades ejemplares incluyen, entre otras, la fuerza de unión contra PD1 medida en KD, la estabilidad/vida útil, la capacidad para tratar el cáncer y/o reducir el tamaño del tumor.

No obstante las alteraciones de la región variable, los expertos en la materia pueden modificar los anticuerpos anti-PD1 de la presente divulgación o sus fragmentos de unión al antígeno que comprenderán anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa o fragmentos inmunorreactivos de los mismos) en los que al menos una fracción de uno o más de los dominios de la región constante se ha eliminado o alterado de otro modo para proporcionar características bioquímicas deseadas, como una mayor localización del tumor o una semivida sérica reducida en comparación con un anticuerpo de aproximadamente la misma inmunogenicidad que comprende una región constante nativa o inalterada. En algunos aspectos, la región constante de los anticuerpos modificados comprenderá una región constante humana. Las modificaciones de la región constante compatibles con esto, las moléculas anti-PD1 descritas en el presente documento comprenden adiciones, deleciones o sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más dominios. Es decir, los anticuerpos modificados descritos en el presente documento pueden comprender alteraciones o modificaciones de uno o más de

los tres dominios constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o del dominio constante de la cadena ligera (CL). En algunos aspectos, se contemplan regiones constantes modificadas en las que uno o más dominios se eliminan parcial o totalmente. En algunos aspectos, los anticuerpos modificados comprenderán construcciones o variantes con dominio eliminado en las que se ha eliminado todo el dominio CH2 (construcciones Δ CH2). En algunos aspectos, el dominio de la región constante omitido se puede reemplazar por un espaciador de aminoácidos corto (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 residuos) que proporciona algo de la flexibilidad molecular que imparte normalmente la región constante ausente.

El anticuerpo anti-PD1 o su fragmento de unión al antígeno se puede modificar adicionalmente para que contenga fracciones químicas adicionales que normalmente no forman parte de la proteína. Esas fracciones derivatizadas pueden mejorar la solubilidad, la semivida biológica o la absorción de la proteína. Las fracciones también pueden reducir o eliminar cualquier efecto secundario deseable de las proteínas y similares. Las fracciones pueden incluir una o más etiquetas o marcadores detectables (por ejemplo, biotina, enzimas indicadoras, etiquetas colorimétricas o fluorescentes, soporte sólido o marcadores radiactivos) para facilitar la detección del anticuerpo o PD-1 en una muestra.

En una forma de realización, el o los paratopos de los anticuerpos anti-PD1 de la presente divulgación o fragmentos de unión al antígeno de los mismos pueden implicar residuos de aminoácidos en todos los CDR de VH y VL o solo en algunos de los CDR (por ejemplo, ciertos CDR pueden no estar implicados en la unión al antígeno). El paratopo para un antígeno particular se puede definir, por ejemplo, mediante mutagénesis por barrido (por ejemplo, mutagénesis por barrido de alanina) de residuos de aminoácidos dentro del anticuerpo, en particular los CDR, que se cree que están expuestos en la superficie (por ejemplo, según se determina mediante modelado cristalográfico) que pueden estar implicados en la unión al antígeno. La evaluación de la unión de los mutantes al antígeno puede determinar entonces si la posición del aminoácido mutado está implicada en la unión al antígeno y, por lo tanto, forma parte del paratopo del anticuerpo.

En otra forma de realización, los paratopos se pueden determinar mediante microscopía crioelectrónica de alta resolución que puede generar un mapa de densidad de molécula a molécula para determinar la distancia de unión entre ciertos aminoácidos entre uno o más CDR y el antígeno.

En una forma de realización, los anticuerpos anti-PD1 de la presente divulgación o sus fragmentos de unión al antígeno comprenden un paratopo de cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 como se muestra en las SEQ ID NO: 9, 18, 19 o 21 (CDR1), 10 (CDR2) y 11 (CDR3). En otra forma de realización preferida, los anticuerpos anti-PD1 de la presente divulgación o sus fragmentos de unión al antígeno comprenden un paratopo de cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 como se muestra en las SEQ ID NO: 12 (CDR1), 13 (CDR2) y 14 (CDR3). En una forma de realización, los anticuerpos anti-PD1 de la

presente divulgación o sus fragmentos de unión al antígeno comprenden un parátipo de cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 como se muestra en las SEQ ID NO: SEQ ID NO: 9, 10 y 11, y un parátipo de cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 como se muestra en las SEQ ID NO: 12, 13 y 14. En otra forma de realización, los anticuerpos anti-PD1 de la presente divulgación o sus fragmentos de unión al antígeno comprenden un parátipo de cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 como se muestra en las SEQ ID NO: SEQ ID NO: 18, 10 y 11, y un parátipo de cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 como se muestra en las SEQ ID NO: 12, 13 y 14. En otra forma de realización, los anticuerpos anti-PD1 de la presente divulgación o fragmentos de unión al antígeno de los mismos comprenden un parátipo de cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 como se muestra en SEQ ID NOs: SEQ ID NOs: 19, 10 y 11, y un parátipo de cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 como se muestra en SEQ ID NOs: 12, 13 y 14. En otra forma de realización más, los anticuerpos anti-PD1 de la presente divulgación o fragmentos de unión al antígeno de los mismos comprenden un parátipo de cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 como se muestra en SEQ ID NOs: SEQ ID NOs: 21, 10 y 11, y un parátipo de cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 como se muestra en SEQ ID NOs: 12, 13 y 14.

Sustituciones de residuos de aminoácidos no paratípicos

Los aminoácidos no paratípicos se pueden sustituir de forma recombinante para formar un dominio variable ligero o pesado con propiedades similares o alteradas en comparación con el dominio variable de la línea germinal. Los dominios variables “modificados” también incluyen delecciones de aminoácidos, así como sustituciones. Por ejemplo, el residuo de aminoácido N-terminal o C-terminal se puede eliminar en un dominio variable modificado.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos no paratípicos, por ejemplo, para aumentar la estabilidad y/o disminuir la tendencia a agregarse. Una estabilidad deficiente puede afectar la capacidad de un fragmento de unión al antígeno, por ejemplo, de plegarse adecuadamente cuando se expresa de forma recombinante, lo que da como resultado que una fracción de los fragmentos expresados no sea funcional. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos con baja estabilidad también pueden ser propensos a formar agregados potencialmente inmunogénicos o pueden tener una averse o una vida útil deterioradas. Los polipéptidos scFv en particular pueden demostrar problemas con la estabilidad, la solubilidad, la expresión, la agregación, los productos de degradación y la capacidad de fabricación general en sistemas de expresión tanto bacterianos como de mamíferos. Las sustituciones de aminoácidos de la estructura que se espera que aumenten la estabilidad y/o disminuyan la tendencia a agregarse de un dominio VH y/o VL, por ejemplo, en un polipéptido scFv, se describen en WO 2007/109254, por ejemplo. De manera similar, se espera que las sustituciones en los residuos correspondientes en los dominios VH y VL actuales aumenten la estabilidad y/o disminuyan la tendencia a agregarse.

v. Portadores farmacéuticamente aceptables

La composición utilizada en la presente divulgación, ya sea P1801 solo, P1101 solo o cualquier combinación de los mismos, puede comprender además vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables, en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones, y pueden comprender tampones como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; parabenos de alquilo como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextranos; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos tales como TWEEN (marca registrada), PLURONICS (marca registrada) o polietilenglicol (PEG).

vi. Dosis

En diversas formas de realización, el anticuerpo anti-PD1 se administra a una concentración de aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 11 mg/kg, aproximadamente 12 mg/kg, aproximadamente 13 mg/kg, aproximadamente 14 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 16 mg/kg, aproximadamente 17 mg/kg, aproximadamente 18 mg/kg, aproximadamente 19 mg/kg o aproximadamente 20 mg/kg.

vii. Combinaciones

Un anticuerpo anti-PD-1 también se puede utilizar junto con, o administrar por separado, simultáneamente y/o secuencialmente con otros agentes que sirven para mejorar y/o complementar la eficacia del anticuerpo para tratar el cáncer. Un ejemplo no limitante de un anticuerpo monoclonal anti-PD1 es P1801, donde la combinación es P1801 + P1101. Tanto un anticuerpo monoclonal anti-PD1, como P1801, o P1101 se pueden denominar primera o segunda molécula en una combinación. Adicionalmente, o alternativamente, el P1801 se puede combinar opcionalmente con otro anticuerpo monoclonal anti-PD1, por ejemplo,

Pembrolizumab, Nivolumab y/o Cemiplimab.

En una forma de realización, se puede utilizar un anticuerpo anti-PD-1 murino (por ejemplo, RMP 1-14) en lugar de P1801 en modelos de ratón. Como alternativa, o adicionalmente, se puede utilizar mP1101, que tiene una versión de ratón de interferón, para modelos murinos.

viii. Administración en serie y combinada

P1101 se puede administrar utilizando varios regímenes y dosis como se informó previamente en la técnica.

Administración en serie

Además, la duración entre la administración en serie de una o más dosis de P1101 o mP1101 a un sujeto puede ser de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18 días, 19 días, 20 días, 21 días, 22 días, 23 días, 24 días, 25 días, 26 días, 27 días, 28 días, 29 días, 30 días, 31 días, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas y/o 10 semanas. En otra forma de realización, la administración en serie de P1101 o mP1101 antes mencionada puede ser seguida por la administración en serie de P1801 con una duración entre la administración de una o más dosis de P1801 a un sujeto de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18 días, 19 días, 20 días, 21 días, 22 días, 23 días, 24 días, 25 días, 26 días, 27 días, 28 días, 29 días, 30 días, 31 días, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas y/o 10 semanas.

La administración en serie anterior en cualquier orden (P1101 primero o P1801 primero) puede proporcionar “sinergia” y resultar “sinérgica”, es decir, el efecto logrado cuando los ingredientes activos se usan juntos es mayor que la suma de los efectos que resultan del uso de los compuestos por separado.

Administración combinada

Una administración combinada también puede proporcionar “sinergia” y resultar “sinérgica”, es decir, el efecto logrado cuando los ingredientes activos se usan juntos es mayor que la suma de los efectos que resultan de usar los compuestos por separado. La presente divulgación también incluye un efecto sinérgico que se puede lograr cuando los ingredientes activos son: (1) coformulados y administrados o suministrados simultáneamente en una formulación de dosificación unitaria combinada; (2) suministrados por alternancia o en paralelo como formulaciones separadas; y/o (3) por algún otro régimen. Cuando se suministran en terapia de alternancia, se puede lograr un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o suministran secuencialmente, por ejemplo, mediante diferentes inyecciones en jeringas separadas. En general, durante la terapia de alternancia, una dosis efectiva de cada ingrediente activo se administra secuencialmente, es decir, en serie, mientras que en la terapia combinada, se administran dosis efectivas de dos o más ingredientes activos juntos.

En una forma de realización, una primera molécula y una segunda molécula pueden administrarse a un sujeto al mismo tiempo mezclando las dos y administrándolas a un sujeto simultáneamente. Alternativa o adicionalmente, las dos moléculas grandes pueden administrarse a un sujeto en cualquier secuencia dada inmediatamente o en un tiempo cercano una tras otra en cualquier orden dado. En otra forma de realización, una molécula grande puede administrarse primero en un régimen dado, luego la segunda molécula grande puede administrarse en un régimen dado. En otra forma de realización, la frecuencia y la duración del régimen pueden diferir en cualquier duración, por ejemplo, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18 días, 19 días, 20 días, 21 días, 22 días, 23 días, 24 días, 25 días, 26 días, 27 días, 28 días, 29 días, 30 días y/o 31 días o más. La primera molécula puede ser P1101 y la segunda molécula puede ser P1801, y viceversa.

En algunas formas de realización, una primera molécula se puede administrar después de un primer régimen durante un primer período de tratamiento y una segunda molécula se puede administrar después de un segundo régimen independiente durante un segundo período de tratamiento independiente, en donde los dos regímenes y/o períodos de tratamiento pueden ser sincronizados, escalonados, secuenciales, alternos o cronometrados de cualquier manera. Por ejemplo, en una situación en la que ambas moléculas se administran una vez cada 2 semanas, los dos regímenes se pueden iniciar el mismo día o en días diferentes (por ejemplo, el segundo régimen se inicia antes o después de que comience el primer régimen). En otro ejemplo más, en un caso en el que la primera molécula se administra una vez cada 5 días durante 3 meses y la segunda molécula se administra una vez cada dos semanas durante un año, los dos regímenes se pueden iniciar el mismo día o en días diferentes (por ejemplo, el segundo régimen se inicia antes o después de que comience el primer régimen, durante el período de tratamiento de la primera molécula en un día en el que se administra la primera molécula o en un día en el que no se administra la primera molécula, o después del final del período de tratamiento de la primera molécula). La dosis de cada administración y/o el tiempo entre cada administración en un régimen pueden permanecer constantes o variar. La primera molécula puede ser P1101 y la segunda molécula puede ser un anticuerpo monoclonal anti-PD1, como P1801. Alternativamente, la primera molécula puede ser un anticuerpo monoclonal anti-PD1, como P1801, y la segunda molécula puede ser P1101.

En otra forma de realización, una primera molécula y una segunda molécula se pueden administrar de forma alternada en cualquier orden determinado. En una forma de realización, una primera molécula y una molécula se pueden administrar en cualquier orden de período fijo. La Figura 4(a) ilustra un ejemplo de este tipo, en el que las flechas sólidas indican la administración de una primera molécula a un sujeto y la flecha punteada indica la administración de una segunda molécula, en el que cada administración se realiza con 3 días de diferencia. Además, se puede hacer lo contrario, en el que la flecha sólida indica la administración de una segunda

molécula a un sujeto y las flechas punteadas indican la administración de una primera molécula, en el que cada administración se realiza con 3 días de diferencia. En otra forma de realización, un ejemplo ilustrativo es en el que las flechas sólidas indican la administración de P1101 a un sujeto y las flechas punteadas indican la administración de un anticuerpo monoclonal anti-PD1, como P1801. Además, se puede hacer lo contrario, donde las flechas sólidas indican la administración de un anticuerpo monoclonal anti-PD1, como P1801, a un sujeto, y las flechas punteadas indican la administración de P1101.

En una forma de realización no limitante, se pueden administrar dos moléculas de manera secuencial, pero una molécula se puede administrar inicialmente con un número menor de dosis (por ejemplo, 3 dosis), con un período establecido entre cada dosis (por ejemplo, 3 días), seguida de la administración de una segunda molécula con un número doble, triple o cuádruple de dosis de administración, con también un período establecido entre cada dosis (por ejemplo, 3 días). Un ejemplo no limitante se puede ver en la parte superior de la Figura 4(b). Otro ejemplo ilustrativo es donde la flecha sólida indica la administración de P1101 a un sujeto, y las flechas punteadas indican la administración de un anticuerpo monoclonal anti-PD1, tal como P1801. La primera molécula puede ser P1101, y la segunda molécula puede ser P1801, y viceversa.

En una forma de realización no limitante, se pueden administrar dos moléculas de manera secuencial, pero una molécula se puede administrar inicialmente con el mismo número de dosis (por ejemplo, 6 dosis), con un período establecido entre cada dosis (por ejemplo, 3 días), seguida de la administración de una segunda molécula administrada con el mismo número de dosis (por ejemplo, 6 dosis), también con un período establecido entre cada dosis (por ejemplo, 3 días). La Figura 4(b) en la parte inferior indica dicho ejemplo no limitante. En suma, las flechas sólidas indican la administración de P1101 a un sujeto, y las flechas punteadas indican la administración de un anticuerpo monoclonal anti-PD1, tal como P1801. Alternativamente, las flechas sólidas indican la administración de un anticuerpo monoclonal anti-PD1, tal como P1801 a un sujeto, y las flechas punteadas indican la administración de P1101.

En otra forma de realización, una primera molécula y una segunda molécula se pueden administrar de manera alternada para una dosis cada una, pero con 1 o 2 días entre las dos administraciones. Este régimen se puede repetir durante un período fijo (por ejemplo, cada 3, 4, 5 o 6 días), durante dos, tres, cuatro o cinco veces. Alternativa o adicionalmente, esto puede ser seguido por una administración única de cualquiera de las moléculas en una dosis única con un período fijo (por ejemplo, 3, 4, 5 o 6 días). La Figura 4(c) superior ilustra dicho ejemplo no limitante. En una forma de realización, las flechas sólidas indican la administración de P1101 a un sujeto, y las flechas punteadas indican la administración de anticuerpo monoclonal anti-PD1, tal como P1801. Alternativamente, las flechas sólidas indican la administración de anticuerpo monoclonal anti-PD1, tal como P1801 a un sujeto, y las flechas punteadas indican la administración de P1101.

En una forma de realización, una primera molécula y una segunda molécula se pueden

administrar de manera alternada para una dosis cada una, pero con 1 o 2 días entre las dos administraciones. Este régimen se puede repetir durante un período fijo (por ejemplo, cada 3, 4, 5 o 6 días), durante dos, tres, cuatro o cinco veces. La Figura 4(c) inferior ilustra dicho ejemplo no limitante. En una forma de realización, las flechas sólidas indican la administración de P1101 a un sujeto, y las flechas punteadas indican la administración de anticuerpo monoclonal anti-PD1, tal como P1801. Alternativamente, las flechas sólidas indican la administración de anticuerpo monoclonal anti-PD1, tal como P1801 a un sujeto, y las flechas punteadas indican la administración de P1101.

En una forma de realización no limitante, se administran dos moléculas al mismo tiempo o el mismo día, pero una molécula puede administrarse inicialmente con una cantidad menor de dosis, seguida de una cantidad doble, triple o cuádruple de dosis en la segunda, tercera, cuarta o quinta administración, mientras que una segunda molécula se administra con una cantidad constante de dosis. Además, puede hacerse lo contrario, donde una primera molécula se administra con una cantidad constante de dosis, mientras que la segunda molécula puede administrarse inicialmente con una cantidad menor de dosis, seguida de una cantidad doble, triple o cuádruple de dosis en la segunda, tercera, cuarta o quinta administración. En una forma de realización, la primera molécula administrada puede ser P1101, y la segunda molécula puede ser un anticuerpo monoclonal anti-PD1, tal como P1801. Alternativamente, la primera molécula puede ser cualquier anticuerpo monoclonal anti-PD1, tal como P1801, y la segunda molécula puede ser P1101.

En otra forma de realización, una primera molécula puede administrarse en una dosis fija todos los días durante los primeros 13 días, y la segunda molécula puede comenzar a administrarse el día 6, con 5 administraciones más, todas con 3 días de diferencia. Además, las primeras 4 administraciones de las segundas moléculas pueden tener la misma dosis, seguidas de la 5ª administración que tiene el doble de dosis que las primeras 4. A continuación, la 6ª administración puede tener una dosis que se cuadruplica con respecto a las primeras 4 administraciones. Un ejemplo no limitante se puede mostrar en la Figura 5. En una forma de realización, la primera molécula administrada puede ser P1101, y la segunda molécula puede ser un anticuerpo monoclonal anti-PD1, tal como P1801. Alternativamente, la primera molécula puede ser un anticuerpo monoclonal anti-PD1, tal como P1801, y la segunda molécula puede ser P1101.

En otra forma de realización, una primera molécula se puede administrar por vía i.p. o s.c. con 6, 7 u 8 días de diferencia (QW x 4 desde los días 1 a 22), mientras que las segundas moléculas se pueden administrar por vía i.p. o s.c. los días 11, 13, 18, 20, 25 y 27 (BIW x2, del día 11 al día 27). En la Figura 6 se indica un ejemplo. En una forma de realización, la administración de la primera molécula puede ser P1101, y la segunda molécula puede ser un anticuerpo monoclonal anti-PD1, como P1801. Alternativamente, la primera molécula puede ser un anticuerpo monoclonal anti-PD1, como P1801, y la segunda molécula puede ser P1101.

En una forma de realización, la duración entre la administración de una dosis única de P1801 o una dosis única de P1101 a un sujeto puede ser de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18 días, 19 días, 20 días, 21 días, 22 días, 23 días, 24 días, 25 días, 26 días, 27 días, 28 días, 29 días, 30 días, 31 días, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas y/o 10 semanas o más.

En otra forma de realización, la duración entre la administración de un único régimen de P1801 y un único régimen de P1101 a un sujeto puede ser de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18 días, 19 días, 20 días, 21 días, 22 días, 23 días, 24 días, 25 días, 26 días, 27 días, 28 días, 29 días, 30 días, 31 días, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas y/o 10 semanas o más.

ix. Usos

En una forma de realización, el uso del anticuerpo monoclonal anti-PD1 en la presente divulgación mejora la activación de células T CD4⁺ o CD8⁺ específicas de antígeno, mejorando así la inmunidad de un sujeto para tratar, suprimir y/o prevenir el cáncer, como un tumor sólido. Los ejemplos no limitantes de tumores sólidos incluyen melanoma, carcinoma hepatocelular (HCC) y/o tumor renal (carcinoma de células renales o RCC).

En otra realización, la combinación de P1801 y P1101 puede mejorar aún más la inmunidad de un sujeto para tratar, suprimir y/o prevenir el cáncer, como un tumor sólido, en comparación con P1801 solo. Los ejemplos no limitantes incluyen melanoma, carcinoma hepatocelular (HCC), cáncer colorrectal (CCR), melanoma y/o tumor renal (carcinoma de células renales (RCC)).

En una forma de realización, el P1801 actualmente divulgado y/o la combinación de P1801 con P1101 se pueden usar para tratar, suprimir y/o prevenir lo siguiente:

Melanoma avanzado o terapia adyuvante para el melanoma

El P1801 y/o la combinación del P1801 con otra molécula (por ejemplo, el P1101) se pueden utilizar para el tratamiento de sujetos con melanoma irresecable o metastásico. El tratamiento puede combinarse opcionalmente con pembrolizumab y/o nivolumab.

Carcinoma hepatocelular avanzado (CHC)

P1801 y/o la combinación de P1801 con otra molécula (p. ej., P1101) se pueden utilizar para el tratamiento de sujetos con carcinoma hepatocelular (CHC). El sujeto puede haber recibido tratamiento previo con sorafenib. El tratamiento puede combinar opcionalmente además Cemiplimab, pembrolizumab y/o nivolumab.

Tratamiento del carcinoma de células renales (CCR) o carcinoma avanzado de células renales (CCR)

P1801 y/o la combinación de P1801 con otra molécula (p. ej., P1101) se pueden utilizar para el tratamiento adyuvante de sujetos con carcinoma de células renales (CCR) con riesgo intermedio-alto o alto de recurrencia después de una nefrectomía o después de una nefrectomía y resección de lesiones metastásicas. El tratamiento puede combinar opcionalmente además cemiplimab, pembrolizumab y/o nivolumab.

P1801 y/o la combinación de P1801 con otra molécula (p. ej., P1101) se pueden utilizar para el tratamiento de primera línea de sujetos adultos con carcinoma de células renales (CCR) avanzado. Este tratamiento se puede combinar opcionalmente con axitinib y/o cemiplimab, pembrolizumab y/o nivolumab.

Para sujetos adultos con melanoma avanzado

El P1801, o combinado con otra molécula (por ejemplo, el P1101), se puede utilizar para tratar a personas con un tipo de cáncer de piel llamado melanoma que se ha propagado o no se puede extirpar mediante cirugía (melanoma avanzado). Esta terapia se puede combinar opcionalmente con cemiplimab, nivolumab, pembrolizumab y/o ipilimumab.

Para sujetos adultos con melanoma después de que éste y los ganglios linfáticos afectados hayan sido extirpados mediante cirugía para evitar que regrese

El P1801, o combinado con otra molécula (por ejemplo, el P1101), se puede utilizar para tratar a sujetos adultos con melanoma después de que se les haya extirpado el melanoma y los ganglios linfáticos afectados mediante cirugía para evitar que vuelva a aparecer. Esta terapia se puede combinar opcionalmente con cemiplimab, pembrolizumab y/o nivolumab.

Para ciertos sujetos con cáncer de riñón avanzado (carcinoma de células renales)

P1801, o combinado con otra molécula (por ejemplo, P1101), se puede utilizar para tratar a determinados sujetos con cáncer de riñón cuando el cáncer se ha propagado (carcinoma de células renales avanzado) y el sujeto no ha recibido tratamiento para el CCR avanzado. Esta terapia se puede combinar opcionalmente con cemiplimab, nivolumab, pembrolizumab y/o ipilimumab.

Para sujetos recién diagnosticados cuyo cáncer de riñón (carcinoma de células renales) se ha diseminado

El P1801, o combinado con otra molécula (por ejemplo, el P1101), se puede utilizar para tratar a personas con cáncer de riñón cuando el cáncer se ha diseminado (carcinoma de células renales avanzado) y el sujeto no ha recibido tratamiento para el CCR avanzado. Esta terapia se puede combinar opcionalmente con cemiplimab, nivolumab, pembrolizumab y/o cabozantinib.

Para sujetos con cáncer de riñón avanzado previamente tratado (carcinoma de células renales)

El P1801, o combinado con otra molécula (por ejemplo, el P1101), se puede utilizar para tratar a personas con cáncer de riñón (carcinoma de células renales) cuando el cáncer se ha propagado o ha crecido después del tratamiento con otros medicamentos contra el cáncer. Esta terapia se puede combinar opcionalmente con cemiplimab, pembrolizumab y/o nivolumab.

Para sujetos con cáncer de hígado (carcinoma hepatocelular) que han recibido tratamiento con

sorafenib

El P1801, o combinado con otra molécula (por ejemplo, el P1101), se puede utilizar para tratar a personas con cáncer de hígado (carcinoma hepatocelular) si el sujeto ha recibido previamente tratamiento con sorafenib. Esta terapia se puede combinar opcionalmente con cemiplimab, nivolumab, pembrolizumab y/o ipilimumab.

Además, P1801, o combinado con otra molécula (p. ej., P1101), se puede utilizar para tratar a adultos y niños de 12 años de edad o más con un tipo de cáncer de colon o recto (cáncer colorrectal) que se ha propagado a otras partes del cuerpo (metastásico), tiene inestabilidad de microsatélites alta (MSI-H) o deficiencia en la reparación de errores de emparejamiento (dMMR), y el sujeto ha probado el tratamiento con una fluoropirimidina, oxaliplatino e irinotecán, y no funcionó o ya no funciona. Esta terapia se puede combinar opcionalmente con cemiplimab, pembrolizumab y/o nivolumab.

x. Vía de administración y posología

P1801, o combinado con otra molécula (por ejemplo, P1101, nivolumab y/o ipilimumab), se puede formular como inyecciones para uso intravenoso (IV). En una forma de realización, nivolumab (aproximadamente 10 mg/ml) e ipilimumab (aproximadamente 5 mg/ml) son inyecciones para uso intravenoso (IV). En una forma de realización, la dosis de P1101 puede estar entre aproximadamente 50 y aproximadamente 540 ug. Otros ejemplos no limitantes incluyen 6 dosis secuenciales de P1101 a 450 mcg, Q2W con P1801 a 0,3 mg/kg, Q2W; 6 dosis secuenciales de P1101 a 450 mcg, Q2W con P1801 a 0,75 mg/kg, Q2W; 6 dosis secuenciales de P1101 a 450 mcg, Q2W con P1801 a 1,5 mg/kg, Q2W; 6 dosis secuenciales de P1101 a 450 mcg, Q2W con P1801 a 2,0 mg/kg, Q2W; o 6 dosis secuenciales de P1101 a 450 mcg, Q2W con P1801 a 3,0 mg/kg, Q2W. El período de tratamiento puede ser durante un ciclo de tratamiento de 28 días, 35 días, 42 días, 49 días o 56 días.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Afinidad de unión e inhibición de P1801

Este ejemplo se realizó para medir la afinidad de unión y la capacidad de inhibición del anticuerpo P1801 a los antígenos. Se realizó la prueba ELISA de unión directa para medir la especificidad de unión y la reactividad cruzada. Se realizaron la prueba ELISA competitiva y el ensayo del gen reportero basado en células para medir la capacidad de inhibición entre P1801 PD1/PD-L1 y PD1/PD-L2.

Toda la incubación debe realizarse a 25 °C, excepto el recubrimiento de la placa con antígeno, que se realiza a 4 °C. La placa se mantiene alejada de corrientes de aire y otras fluctuaciones de temperatura y se cubre con selladores de placas. Durante todos los pasos de lavado, agregue 300 µL/pocillo de tampón de lavado y luego retire las soluciones de la placa

invirtiendo y secando la placa con una toalla de papel. Repita 3 veces para cada paso de lavado.

Los antígenos se diluyeron a concentraciones apropiadas con 1X DPBS, 50 µL/pocillo durante la noche y se bloquearon con 1 % BSA, 200 µL/pocillo durante 2 horas. Preparación de la muestra e incubación: Diluir la muestra P1801 usando 1 % BSA en diluciones seriadas de 2,5 veces comenzando en 0,8 µg/mL para 8 puntos, luego agregar 50 µL de las soluciones de muestra diluidas en serie recién preparadas a los pocillos por duplicado. Sellar la placa e incubar a 25 °C sin agitar durante 1 hora. La incubación de Ab secundarios se realizó diluyendo Anti-IgG humana de cabra conjugado con peroxidasa, Ab específico del fragmento Fe a 1: 10000 en 1 % BSA, luego agregar 50 µL de la solución de Ab secundario diluida recién preparada a los pocillos de la placa. Selle la placa e incube a 25 °C sin agitar durante 40 minutos. El desarrollo del color se realizó agregando 50 µL/pocillo de solución de sustrato TMB, golpee suavemente la placa para asegurar una mezcla completa y deje que el color se desarrolle durante 2 a 5 minutos. Después de la incubación, detenga la reacción directamente con 50 µL/pocillo de solución de parada. Lea la DO dentro de los 10 minutos y protéjala de la luz. Asegúrese de que no haya burbujas en todos los pocillos.

Medición de la inhibición de PD-1/PD-L1 PD-1/PD-L2 mediante ELISA de unión competitiva

El recubrimiento y bloqueo se realizaron donde los antígenos se diluyeron a concentraciones apropiadas con 1X DPBS, 50 µL/pocillo durante la noche y se bloquearon con 1 % BSA, 200 µL/pocillo durante 2 horas. Preparación de la muestra e incubación para el competidor P1801: realizar una dilución seriada de 2 veces comenzando con 5 µg/mL para 10 puntos usando 1 % BSA como tampón de dilución. Luego, agregar 50 µL de diluciones de muestra a cada pocillo apropiado. Para el aglutinante biotina-hPD-1-mIgG Fe, diluir a solución de trabajo para una concentración de 0,25 µg/mL, luego agregar 50 µL a cada pocillo. Incube la placa con agitación constante (550 rpm) a 25 °C durante 2 horas. La incubación de Ab secundarios se realizó diluyendo el Ab anti-estreptavidina HRP a 1:15000 en 1 % BSA, luego agregue 50 µL de la solución de Ab secundario diluida recién preparada a los pocillos de la placa. Selle la placa e incube a 25 °C con agitación constante (550 rpm) durante 40 min. El desarrollo del color se realizó agregando 50 µL/pocillo de solución de sustrato TMB, golpee suavemente la placa para asegurar una mezcla completa y deje que el color se desarrolle durante 30 min en la oscuridad. Después de la incubación, detenga la reacción directamente con 50 µL/pocillo de solución de parada. Lea la DO dentro de los 10 min y protéjala de la luz. Asegúrese de que no haya burbujas en todos los pocillos.

Se realizó el método analítico para un ensayo de gen reportero basado en células para la medición de la inhibición de PD-1/PD-L1 del anticuerpo anti-PD1 P1801. En suma, la célula Jurkat expresada de manera estable PD-1 (Jurkat/PD1) expresa un reportero de luciferasa impulsado por el elemento de respuesta NFAT (NFAT-RE) a través de la activación del TCR. Sin embargo, mientras que PD-1 en la célula Jurkat se une a PD-L1, la interacción bloquea la luminiscencia mediada por TCR. La luciferasa se induce cuando la célula Jurkat es activada por

el agonista del TCR y la interacción PD-1/PD-L1 es interrumpida por anti-PD 1 (Figura 9). Cuanto más bloquea el anti-PD1, más interacción e induce más luciferasa. La CI50 se puede determinar mediante la curva dosis-respuesta de la muestra de prueba.

La especificidad de la unión *in vitro* de P1801 se muestra en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

Sistema de prueba	Método de administración	Dosis (ng/mL)
Antígenos proteicos humanos	<i>In Vitro</i>	800, 320, 128, 51,2, 20,5, 8,2, 3,3, 1,3

Sistema de ensayo: ELISA de unión directa

Antígeno inmovilizado	Concentración de antígeno (ng/pocillo)	CE de unión 50 (nM)
Fc PD-1-mIgG humano	10	0,24
PD-L1 humano	50	Sin unión a 1,3~800 ng/ml P1801
PD-L2 humano	50	Sin unión a 1,3~800 ng/ml P1801
CTLA-4 humano	50	Sin unión a 1,3~800 ng/ml P1801
CD28 humano	50	Sin unión a 1,3~800 ng/ml P1801

La reactividad cruzada de P1801 se informa a continuación en la Tabla 3:

Tabla 3

Sistema de prueba	Método de administración	Dosis (ng/mL)		
Antígenos proteicos humanos, de mono/cynomolgus y de ratón	<i>In Vitro</i>	800, 320, 128, 51,2, 20,5, 8,2, 3,3, 1,3		

Sistema de ensayo: ELISA de unión directa

Antígeno inmovilizado	Concentración de antígeno (ng/pocillo)	CE de unión 50 (nM)
Fc PD-1-mIgG humano	10	0,57
Cynomolgus PD-1	10	0,44
Ratón PD-1	50	No se detectó ningún enlace

La Tabla 4 muestra la actividad inhibitoria de P1801. Tabla 4

Sistema de prueba	Método de administración	Dosis (ng/mL)
Antígenos proteicos humanos	<i>In Vitro</i>	5000, 2500, 1250, 625, 312,5, 156,3, 78,1, 39,1, 19,5, 9,8

Sistema de ensayo: ELISA de unión competitiva

Antígeno inmovilizado	Concentración de antígeno inmovilizado (ng/pocillo)	Antígeno aglutinante	Concentración de antígeno aglutinante (ng/pocillo)	Inhibición de unión IC 50 (nM)
PD-L1 humano	500	Fc PD-1-mIgG humano	12.5	0,58
PD-L2 humano	50	Fc PD-1-mIgG humano	12.5	0,90
Sistema de ensayo: ensayo de gen reportero basado en células				
Célula reportadora		Célula presentadora de antígeno		Inhibición de unión IC 50 (nM)
NFAT-Luc/PD-1 Jurkat		PD-L1/OKT3-CD14/CD80 CHO-K1		14.6

En resumen, P1801 tiene una afinidad por PD-1 humana (EC₅₀) de 0,57 nM y una afinidad por PD-1 de cinomolgus (EC₅₀) de 0,44 nM. No se observó ninguna diferencia significativa entre la afinidad de unión de P1801 de PD1 humana y de cinomolgus. No se observó ninguna reactividad cruzada entre P1801 y PD-1 de ratón. El efecto de competencia de PD-L1/PD-L2

humana entre P1801 y PD-1 humana se observó tanto en el ensayo ELISA competitivo como en el ensayo basado en células. P1801 se unió a PD-1 humana y reaccionó de forma cruzada con PD-1 de mono, y la eficacia de unión (EC50) no fue significativamente diferente entre PD-1 humana y de mono. P1801 no reaccionó de forma cruzada con PD-1 de ratón. P1801 inhibió la unión de PD-1 a PD-L1 y PD-L2 en un ensayo ELISA de unión competitiva y en un ensayo de gen reportero basado en células. P1801 reacciona con PD-1 humano y de Cynomogus, pero no con PD-1 de ratón.

Ejemplo 2

Unión del epítipo de P1801

La posición de unión del epítipo P1801 se comparó con dos mAb anti-PD1 disponibles comercialmente, a saber, pembrolizumab y nivolumab. Se utilizó la tecnología BLI para determinar el efecto mutuo biomolecular. Esta técnica es un enfoque analítico óptico que analiza el patrón de interferencia de la luz blanca reverberada desde dos superficies: una capa de referencia interna y una capa de proteína sedimentada en la punta del biosensor. Cualquier alteración en el número de moléculas combinadas con la punta del biosensor induce una variación en el patrón de interferencia. En este caso, las interacciones se pueden medir en tiempo real, lo que ofrece la capacidad de supervisar la especificidad de la unión, la relación de asociación y disociación, la concentración, la fidelidad y la precisión. Además, solo las moléculas que se combinan con el biosensor o se separan de él son capaces de cambiar el patrón de interferencia y producir un perfil de reacción en el sistema BLI. Sin embargo, las moléculas sin unión, que varían en el índice de refracción del medio ambiente o varían en la velocidad de flujo no tienen efecto sobre el patrón de interferencia.

Aquí, los anticuerpos monoclonales anti-PD1 P1801 purificados se probaron mediante Octet BMIA para el bloqueo del epítipo de PD-1. Los anticuerpos purificados PD1RB se preincubaron con PD-1/His (anticuerpo 10 ug/ml; PD-1 0,336 ug/ml) durante 1 hora. Los sensores de IgG antihumana (Fc) se cargaron con cada anticuerpo de referencia a 3 µg/ml. La asociación del complejo anticuerpo + antígeno preformado se midió en comparación con la asociación del antígeno solo. Una respuesta de unión alta indica epítopos no superpuestos, mientras que una respuesta menor indica superposición de epítopos. La línea base se realizó durante 30 segundos. La carga de anticuerpos en el sensor se realizó a 4 ug/ml durante 700 segundos. Extinción durante 480 segundos y línea base durante 300 segundos. Asociación del anticuerpo de bloqueo a 10 ug/ml + PD-1 a 0,336 ug/ml durante 600 segundos. En la Figura 8(a) se puede ver el resultado detallado comparando nivolumab y P1801, y en la Figura 8(b) para pembrolizumab. Si P1801 se une al mismo epítipo que nivolumab o pembrolizumab, la línea debería superponerse, pero no fue así. En cambio, ambas líneas marcadas con flechas no se superponen con ninguna otra línea. Esto indica una unión no superpuesta en el objetivo y denota una superposición parcial.

En el caso de ambos anticuerpos de referencia, el P1801 muestra una respuesta clasificada en 0,0453 frente al nivolumab y 0,0426 nm frente al pembrolizumab. Por lo tanto, los resultados mostraron que el P1801 es un bloqueador parcial de PD1 en comparación con los dos sitios de unión del epítipo del mAb anti-PD1 disponibles comercialmente, aunque el P1801 muestra otras características comparables, lo cual es sorprendente e inesperado.

Ejemplo 3

Cinética de unión

Este ejemplo se realizó para medir la afinidad de unión de los anticuerpos P1801 a los antígenos utilizando Biacore 8K. Primero, se realizó la inmovilización de FcRn y C1q en el chip sensor CM5. La inmovilización de FcRn y C1q se realizó a 25 grados Celsius mientras se utilizaba HBS EP como tampón de ejecución. La superficie del chip sensor de las celdas de flujo 1 y 2 se activó con 50 mmol/L de hidroxisuccinimida (NHS) y 200 mmol/L de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) recién mezclados durante 200 s (10 µL/min). Después, se inyectó FcRn y C1q diluidos en 30 mmol/L de NaAC (pH 4,5) en la celda de flujo 2 para lograr la conjugación de la Unidad de Respuesta apropiada respectivamente, mientras que la celda de flujo 1 se configuró como en blanco. Después de la reacción de acoplamiento de amina, los sitios de acoplamiento activos restantes en la superficie del chip se bloquearon con una inyección de 200 s de clorhidrato de etanolamina 1 mol/L. Para medir la afinidad de FcRn y C1q, el ensayo se realizó a 25 °C y el tampón de ejecución fue HBS EP (pH 6,0). Los anticuerpos P1801 diluidos se inyectaron sobre la superficie de las celdas de flujo 1 y 2 como fase de asociación, seguido de la inyección de tampón de ejecución como fase de disociación. A continuación, se midió la afinidad de PD1 humano. El ensayo se realizó a 25 °C y el tampón de ejecución fue HBS EP (pH 7,4). Los anticuerpos P1801 diluidos (2 µg/ml) se inyectaron sobre la superficie como fase de captura, las proteínas PD1 humanas se inyectaron sobre la superficie como fase de asociación seguida de la inyección de tampón de ejecución como fase de disociación. Finalmente, se realizó la caracterización de la unión de Fc P1801 mediante SPR, donde se obtuvieron datos cinéticos de los anticuerpos P1801 respecto de PD1, FcRn y C1q humanos mediante medición de afinidad. Todos los datos se procesaron utilizando el software Biacore 8K Evaluation versión 1.1. La celda de flujo 1 y la inyección en blanco de buffer en cada ciclo se utilizaron como referencia doble para la sustracción de unidades de respuesta. Los datos se enumeran en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5

Sistema de prueba	Método de administración	Dosis (nM)
-------------------	--------------------------	------------

Antígenos proteicos humanos	<i>In Vitro</i>	6,25 ~ 400 para FcRn 0,625 ~ 20 para C1q
-----------------------------------	-----------------	---

Sistema de ensayo: Resonancia de plasma de superficie (Biacore 8K)

Analito	Concentración de analito (nM)	Ligando inmovilizado	Concentración de ligando inmovilizado (Ru)	Ka (1/Sra.)	Kd (1/seg)	KD (nM)	Rmáx (RU)
PD-1 humano	1,5625, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100	P1801 (K014)	~300	5.04E+05	1.26E-03	2,50	47.3
		P1801 (K015)		3,98E+05	1.25E-03	3.13	48.8
P1801	6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200, 400	FcRn	~500	2.43E+05	6.16E-02	253	38.1
P1801	0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20	C1q	844.2	1.00 E+05	5.68E-02	56.8	33.7
Información de referencia							
			KD de FcRn (nM)		KD de C1q (nM)		
Pembrolizumab (anti-PD1 comercial)	IgG 4	228P	66 ± 15		39 ± 7		
IgG 4 de tipo salvaje (228S)			69 ± 11		47 ± 6		
IgG 1			64 ± 11		11 ± 5		

En resumen, P1801 se une a PD-1 humano con afinidades (KD) de 2,50 y 3,13 nM con dos lotes de fármacos, y P1801 se une a FcRn y C1q con una afinidad (KD) comparable a pembrolizumab.

Ejemplo 4

Medidas cinéticas frente a CD64

Este ejemplo muestra el análisis cinético multiciclo de PD1 humano, PD1 de cinomolgus y CD64 humano para el anticuerpo anti-PD1. En este ejemplo, el ligando anti-PD1 Ab se capturó en la superficie de un chip sensor de proteína A. El análisis cinético multiciclo de PD1 humano, PD1 de cinomolgus y CD64 humano para el anticuerpo anti-PD1 se realizó utilizando Biacore T200. Captura del ligando anti-PD1 Ab en la superficie de un chip sensor de proteína A. El anticuerpo anti-PD1 se diluyó primero con 1xHBS-EP+ para obtener una concentración final de

3 µg/ml y se capturó mediante la celda de flujo 2 de un chip sensor de proteína A. El chip contiene el ligando MabSelect SuRe en la superficie, lo que permite la unión específica de la orientación de la región Fc de un anticuerpo. El ensayo se realizó utilizando el asistente de cinética/afinidad. La ruta de flujo fue 2-1, ya que el ligando se inyectó y capturó en la celda de flujo 2 y la celda de flujo 1 actuó como referencia. Se inyectaron series de concentraciones de analitos, PD1 humano, PD1 de cinomolgo y CD64 humano, respectivamente, sobre las superficies de referencia y de ligando consecutivamente como fase de asociación, con breves fases de disociación entre ellas mediante la inyección de tampón de ejecución. A continuación, se inyectó solución de regeneración como fase de regeneración. Todos los datos resultantes se ajustaron a un modelo de unión 1:1 utilizando el software de evaluación Biacore T200 versión 3. La celda de flujo 1 y la inyección en blanco de tampón de ejecución se utilizaron como referencias dobles para la sustracción. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 6.

Tabla 6 Afinidad de unión de P1801 a CD64 por SPR (receptor de IgG Fc gamma RI)

Sistema de prueba	Método de administración	Dosis (µg/mL)
Humano y mono, Cynomolgus/Proteínas	<i>In Vitro</i>	3

Sistema de ensayo: Resonancia de plasma de superficie (Biacore T200)

Ligando (capturado por Fc)	Analito	Concentración de analito (nM)	Ka (1/Sra.)	Kd (1/seg)	KD (nM)	Rmáx (RU)
P1801	PD-1 humano	16, 8, 4, 2, 1	786370	0,001167	1.48	125.145 1
P1801	Cynomolgus PD-1	16, 8, 4, 2, 1	739342	0,001198	1.62	131.306 4
P1801	CD64 humano (FcγRI)	16, 8, 4, 2, 1	2959431	0,00875	0,296	229.663 9

Información de referencia

KD de FcγRI (nM)

Pembrolizumab (anti-PD1 IgG4 228P comercial)	0,125 ± 0,007
IgG4 de tipo salvaje (228S)	0,123 ± 0,001
IgG1	0,023 ± 0,001

En resumen, P1801 se une al PD-1 humano con una afinidad (KD) de 1,48 nM, y una afinidad (KD) al PD1 de cynomolgus de 1,62 nM. P1801 tiene una afinidad (KD) al CD64 humano (receptor de IgG Fc gamma RI) de $2,96 \times 10^{-10}$ M.

Ejemplo 5

Eficacia terapéutica *in vivo*

Este ejemplo tiene como objetivo demostrar la eficacia terapéutica *in vivo* del compuesto de prueba P1801 en el tratamiento del modelo HuCell MC38-hPDL1 en ratones hembra hPD-1 HuGEMM, así como el efecto de P1801 + mP1101. Cada ratón será inoculado por vía subcutánea en la región del flanco posterior derecho con células tumorales HuCell MC38 (1×10^6) en 0,1 ml de PBS para el desarrollo del tumor. El tratamiento se inició cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de aproximadamente 65 mm^3 . El tratamiento con los compuestos de prueba P1801 dio como resultado una disminución significativa del volumen tumoral medio en comparación con el grupo del vehículo. Se inscribieron 30 ratones en el estudio. Todos los animales fueron asignados aleatoriamente a 3 grupos de estudio diferentes. El tamaño medio del tumor en la aleatorización fue de aproximadamente 65 mm^3 . La fecha de aleatorización del tumor se indica como el día 0. Después de la inoculación de células tumorales, se controló diariamente la morbilidad y la mortalidad de los animales. En el momento del seguimiento de rutina, se examinó a los animales para detectar cualquier efecto del crecimiento del tumor y los tratamientos sobre el comportamiento, como la movilidad, el consumo de agua y comida, la ganancia/pérdida de peso corporal (el peso corporal se midió dos veces por semana después de la aleatorización) y cualquier otra anomalía. Se registraron la mortalidad y los signos clínicos observados en cada animal. El volumen del tumor se midió dos veces por semana en dos dimensiones utilizando un calibrador, y el volumen se expresó en mm^3 utilizando la fórmula: $V = (L \times W \times W)/2$, donde V es el volumen del tumor, L es la longitud del tumor (la dimensión más larga del tumor) y W es el ancho del tumor (la dimensión más larga del tumor perpendicular a L). El peso del tumor se midió al final del estudio. La dosificación, así como la medición del peso corporal y del tumor, se realizaron en una cabina de flujo laminar. El día 23 después de la inoculación, el MTV del grupo de control de isotipo alcanzó $3489,56 \text{ mm}^3$, y el MTV del grupo de tratamiento P1801 12mpk y el grupo de tratamiento Nivolumab 12mpk alcanzó $39,39 \text{ mm}^3$ y $236,69 \text{ mm}^3$ respectivamente. El artículo de prueba P1801 comparado con el grupo de control de isotipo mostró un efecto inhibidor tumoral significativo en el modelo subcutáneo HuCell MC38-hPDL1 en ratones hembra hPD-1 HuGEMM (TGI: 98,87%) ($p < 0,001$). En la observación de seguimiento, se observó una respuesta completa (CR) en 6 ratones en el grupo de tratamiento P1801, y una respuesta completa (CR) en 8 ratones en el grupo de tratamiento Nivolumab. Del resultado de supervivencia, el tiempo de supervivencia medio del tratamiento P1801 superó los 50 días, mostró ser significativamente más largo que el grupo de control de isotipo ($p = 0,002$). El tiempo de supervivencia medio del grupo de control positivo de Nivolumab

12mpk también superó los 50 días, lo que demuestra que fue significativamente más largo que el grupo de control de isotipo ($p < 0,001$). Un régimen de administración, por ejemplo, se puede ver en la Figura 6(a) y 6(b).

La inhibición del crecimiento tumoral se resume en la Tabla 7 a continuación:

Tabla 7

Sistema de prueba		Método de administración	Dosis (mg/kg)	Frecuencia de dosificación		
Ratón/ Xenoinjerto subcutáneo MC38-hPD-L1 en ratones HuGEMM con hPD-1 knock-in		Intraperitoneal	12	3 pulg adas de ancho		
Grupo	N	Tamaño del tumor Día 23	Inhibición del crecimiento tumoral		Tiempo de supervivencia medio	
		mm ³ (Media $\pm$ SEM)	%	Valor P	Días	Valor P
Control de isotipo (hlgG4)	10	3489,56 $\pm$ 333,14	N / A	N / A	23	N / A
P1801	10	39,39 $\pm$ 26,80	99	<0,001	>50	0,002
Nivolumab	10	236,69 $\pm$ 199,59	93	<0,001	>50	<0,001
mP1101 P1801	+10	906,83 $\pm$ 289,53	74	0,02	41	0,017

Los datos indican que el P1801 inhibió el crecimiento del tumor MC38-hPD-L1 en ratones hPD-1 en comparación con el grupo de control de isotipo a 12 mg/kg BIW*3. Además, el P1801 prolongó la supervivencia de los ratones hPD-1 con tumores en comparación con el grupo de control de isotipo. La combinación de mP1101 y P1801 también demostró eficacia.

Ejemplo 6

Inducción de IL2

Este ejemplo contiene los resultados del ensayo de respuesta de citocinas en sangre completa de P1801. El ensayo observó que la producción de IL-2 de sangre completa estimulada con SEB1 se vería potenciada por P1801 de manera dependiente de la dosis. La sangre heparinizada de un donante sano se incubó previamente con P1801 y posteriormente se trató con SEB para

inducir la liberación de IL-2. La inducción de IL-2 puede, a su vez, regular y/o activar las respuestas de las células T, suprimiendo y/o tratando así el cáncer.

Después de 2 días de tratamiento, se recogieron los sobrenadantes y se cuantificó la IL-2 mediante ELISA. La sangre entera se diluyó diez veces con medio de cultivo y se preincubó en ausencia (inducción sin SEB y sin tratamiento) o en presencia de artículos de prueba y NC (0,04, 0,2, 1, 5 y 25 µg/mL) durante 60 minutos en una placa de 96 pocillos a 37 °C, incubadora con 5% de CO₂. Posteriormente, las células de sangre entera se estimularon con SEB (0,1 µg/mL) excepto los pocillos de control (inducción sin SEB) y luego se incubaron a 37 °C, incubadora con 5% de CO₂ durante 48 horas. Después de la incubación, los sobrenadantes se recogieron por centrifugación a 500 xg durante 5 minutos, se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -30 °C hasta su análisis mediante ELISA. La IL-2 se cuantificó mediante ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante. En suma, el estándar y los sobrenadantes se diluyeron en serie con el diluyente de calibrador RD5-5. Agregue 100 µL de diluyente de ensayo RD1W a cada pocillo y, posteriormente, agregue 100 µL de blanco, estándares (31,3 ~ 2000 pg/mL) y sobrenadantes diluidos (dilución de 2, 4, 8 y 16 veces) a los pocillos indicados durante dos horas. Lave los pocillos con tampón de lavado diluido tres veces y luego agregue 200 µL de conjugado de IL-2 humana a cada pocillo durante dos horas. Repita el paso de lavado y agregue 200 µL de solución de sustrato a cada pocillo durante 10 a 20 minutos. Por último, agregue 50 µL de solución de parada y determine la densidad óptica (DO) utilizando un lector de microplacas configurado a 450 y 570 nm². Analice los datos utilizando el software Gen5TM de la siguiente manera (A) Promedie las lecturas duplicadas para el blanco, los estándares y los sobrenadantes y luego reste la OD promedio del blanco para obtener la delta OD (B) Cree la curva estándar por delta OD y genere un ajuste de curva logística de cuatro parámetros (4-PL). La concentración de IL-2 de todos los sobrenadantes leídos de la curva estándar debe multiplicarse por el factor de dilución. (C) Criterios de aceptación a. Si la delta OD del sobrenadante está por debajo del estándar más bajo (LLOQ3), el valor de IL-2 se representará con el símbolo "< LLOQ" y se excluirá del cálculo posterior. Si el RPD 4 calculado a partir de los valores de IL-2 de dos diluciones indicadas es superior al 20%, se informará la concentración de la dilución más baja. Por el contrario, se informará el promedio de la concentración de ambas diluciones.

La farmacodinamia resultante se resume en la Tabla 8 a continuación:

Tabla 8

IL-2 inducida por SEB en sangre humana completa

Artículo de prueba: Sistema de prueba	Método de administración	Dosis (µg/mL)
P1801		
Sangre humana entera	Ex vivo	0,04, 0,2, 1, 5 y

		25
--	--	----

Control negativo

(NC) (IgG4 humana) P1801 Nivolumab

Dosis (µg/mL)	Media (µg/ml)	SD	Media (µg/ml)	SD	Valor P respect o NC	Valor P respecto de comparado der	MEDIA SD (µg/ml)	Valor P respect o de NC
0	397,6	293.7	-	-	-	-	-	-
0,04	440.4	247,8	445,5	248,8	0,392	0,057	490.3	248,8
0,2	411.9	237,8	517.0	278,5	0,019	0,047	588.6	286.6
1	402.9	234.2	596.3	313.7	0,001	0,306	610.6	302.7
5	411.7	276.1	614.7	320.8	0,001	0,408	621.6	333,8
25	480.3	253.6	633.2	373,8	0,015	0,074	590.3	344,9

Los resultados muestran que P1801 indujo diferencias significativas en la producción de IL-2 a 0,2, 1, 5 y 25 µg/mL en sangre completa humana en comparación con el control de isotipo IgG4. 2. La producción de IL-2 inducida por P1801 no fue significativamente diferente de la inducida por nivolumab a 0,04, 1, 5 y 25 µg/mL (valores $P > 0,05$).

N=8 para cada nivel de dosis.

No se detectó IL-2 en sangre completa sin estimulación con SEB. En concentraciones de 0,2, 1, 5 y 25 µg/mL, hubo diferencias estadísticamente significativas en la producción de IL-2 entre P1801 e IgG4 humana (valores p de 0,019, 0,001, 0,001 y 0,015, respectivamente). En concentraciones de 0,04, 1, 5 y 25 µg/mL, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la producción de IL-2 entre P1801 y nivolumab (valores $p > 0,05$). El cambio específico sobre IgG4 fue de hasta 1,49 en el grupo tratado con P1801 y fue comparable al de nivolumab. La producción de IL-2 en sangre completa estimulada con SEB puede ser mejorada por P1801 de manera dependiente de la dosis.

Ejemplo 7

Este ejemplo evalúa la farmacocinética, los anticuerpos antidrogas (ADA), la ocupación del receptor (RO) y la liberación de IL-2 en monos cynomolgus después de una única infusión intravenosa de P1801 en tres niveles de dosis. Todos los monos cynomolgus asignados al estudio fueron identificados como animales sanos mediante análisis de sangre regulares antes de la dosificación. Se midieron los pesos corporales reales y los detalles de la dosificación después de inyecciones intravenosas únicas a monos cynomolgus. Se midieron los registros semanales de pesos corporales. Se observaron ligeros cambios en el peso corporal debido a la recolección de sangre y no se observó ninguna anomalía durante el período de dosificación a la recolección de muestras. Se recolectó sangre para el análisis de la liberación de IL-2 de todos los animales sobrevivientes antes de la dosis (día -7, día -1) y 24 horas después de la dosis, y 168 (día 7), 672 (día 28) y 1334 (día 56) horas después de la dosis. Se evaluó la liberación de IL-2 de los glóbulos blancos de mono (predosis, -7 días) en monos sin tratamiento previo tratados ex vivo con 0,04, 0,2, 1, 5 o 25 µg/ml de P1801, Nivolumab o isotipo (IgG4). En el estudio de estimulación con SEB, el tratamiento con P1801 y Nivolumab promovió la liberación de IL-2 de manera dependiente de la dosis, mientras que el tratamiento con IgG4 solo provocó una ligera inducción de la liberación de IL-2 que no aumentó con el aumento de la dosis.

Se midió la liberación de IL-2 de los glóbulos blancos de monos en monos tratados con P1801 a los que se les infundió por vía intravenosa una dosis única de 1, 5 o 20 mg/kg de P1801. Se recogió sangre completa de mono en cinco puntos temporales (D-1, D1, D7, D28 y D56) del estudio farmacocinético. Se observó una liberación de IL-2 dependiente del tiempo y la dosis en los grupos de 5 y 20 mg/kg, mientras que no se observó una liberación significativa de IL-2 dependiente de la dosis de P1801. Se proporciona un resumen en las Tablas 9 y 10 a continuación.

Tabla 9

Sistema de prueba	Método de administración		Dosis (µg/mL)							
Mono, Cynomolgus PBMC	Ex vivo		0,04, 0,2, 1, 5 y 25							
IL-2 inducida por SEB en PBMC de monos Naive Control negativo P1801 Nivolumab (NC) (IgG4 humana)										
Dosis (µg/mL)	Media (mU/ml)	SD	Valor P solo respect o de SEB	Media (mU/ml)	SD	Valor P respect o de NC	Valor de p frente a Nivolumab	Media (mU/ml)	SD	Valor P respect o de NC
Sin SEB	46.7	17.2	-	-	-	-	-	-	-	-
0 (sólo SEB)	98.2	31.9	-	-	-	-	-	-	-	-
0,04	67.6	34.6	0,024	95,7	40.5	0,159	0,072	124	69,9	<0,01
0,2	93.0	44.2	0,386	129	51.8	0,140	0,002	189	85,5	<0,01
1	85.8	43.0	0,291	148	60.4	0,046	0,002	216	102	<0,01
5	96.2	57.8	0,514	168	59.6	0,042	0,002	236	102	<0,01
25	93.5	46.2	0,603	177	68.4	0,012	0,001	258	119	<0,01

En suma, la Tabla 9 anterior muestra que P1801 promovió una producción significativa de IL-2 en PBMC de mono de una manera dependiente de la dosis, mientras que el control del isotipo IgG4 condujo a ligeros aumentos de IL-2 que no aumentaron con el aumento de la dosis. N = 12 para cada nivel de dosis.

Tabla 10

Sistema de prueba	Método de administración	Dosis (mg/kg)
Mono, Cynomolgus, sangre entera	Infusión intravenosa	1, 5, 20
Sistema de ensayo: IL-2 inducida por SEB en sangre completa de monos tratados con P1801 1 mg/kg de P1801 5 mg/kg de P1801 20 mg/kg de P1801		

Punto de tiempo	Media (mU/mL)	SD	Valor p1	Media (mU/mL)	SD	Valor p1	Media (mU/mL)	SD	Valor p1
Día -1	93.9	24.8	-	49.6	9.5	-	63.4	29.0	-
Día 1	152,4	51.3	0,104	198.1	4.6	<0,001	182.3	11.2	0,002
Día 7	105.2	25.5	0,551	120.3	9.9	<0,001	133.2	39.2	0,032
Día 28	83.8	13.4	0,507	74,5	16.5	0,050	87,5	20.1	0,228
Día 56	92.4	13.3	0,916	77,7	12.2	0,012	74.4	8.5	0,510

Este ejemplo demostró que P1801 promovía una producción significativa de IL-2 en sangre completa de mono de una manera dependiente del tiempo. No se observó dependencia de la dosis cuando P1801 se administró a 1, 5 o 20 mg/kg. N=4 (2 machos y 2 hembras) para cada nivel de dosis; 1 valor P respecto de el día -1 (prueba de suma de rangos de Kruskal-Wallis y Wilcoxon/ANOVA sobre las medias de los grupos después de la prueba de Bartlett).

Ejemplo 8

Ocupación del receptor (RO) PD-1 *in vitro*

Las PBMC humanas recién aisladas se estimularon con Dynabeads recubiertos con anti-CD3/CD28 durante 2 días para inducir la expresión de PD-1 y luego se incubaron con P1801 a la concentración indicada. Las células T PD-1+ unidas a P1801 se detectaron utilizando un anticuerpo secundario conjugado con fluoróforo (anticuerpo anti-IgG4 Fc humana) y se analizaron en un citómetro de flujo. Las PBMC humanas se aislaron de sangre heparinizada de donantes sanos. Se utilizaron anticuerpo anti-IgG4 Fc humana de ratón con fluoróforo R-ficoeritrina (PE) y anticuerpo anti-CD3 humano de ratón con fluoróforo alofocianina (APC). Control negativo Anticuerpo recombinante de control de isotipo IgG4 humana purificada Ultra-LEAFTM. Se utilizaron Dynabeads T Cell Activator (marca registrada) Human T-Activator CD3/CD28. Las PBMC humanas se aislaron utilizando Ficoll-Paque (marca registrada) PLUS de sangre completa heparinizada de donantes sanos no más de 6 horas después de su recolección. Las PBMC humanas se estimularon para expresar PD-1 mediante Dynabeads (marca registrada) Human T-Activator CD3/CD28 a 37 °C, incubadora con 5 % de CO₂ durante 2 días. Después de dos días de activación, suspenda las PBMC y retire las Dynabeads mediante una rejilla magnética (DynaMag) (marca registrada). Incube 2×10^5 PBMC en ausencia (sin tratar) o presencia de P1801 (0,01, 0,1 y 1 µg/mL), comparador (0,01, 0,1 y 1 µg/mL) y control negativo (1 µg/mL) en 100 µL de tampón de tinción durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Lavar las PBMC dos veces con el tampón de tinción antes de la tinción. Diluir los anticuerpos anti-hCD3 y anti-hIgG4 Fc en el tampón de tinción y agregar 100 µL de anticuerpos diluidos a los tubos que contienen las PBMC. Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

Las PBMC se lavaron dos veces con 1 mL de tampón de tinción para eliminar los

anticuerpos no unidos. Resuspender el pellet celular en 350 μ L de tampón de tinción y analizar por citometría de flujo lo antes posible. Los datos se analizaron utilizando el software FCS Express de la siguiente manera: (A) Selección de la región CD3 positiva del diagrama de puntos FSC/CD3 para un análisis adicional de la expresión de PD-1, incluido el porcentaje de células PD-1+ (PD-1+ %) y la intensidad de fluorescencia media geométrica (Geo MFI) de PD-1 en todas las células T CD3+. (B) El PD-1+ % se define como el porcentaje de células T CD3+ unidas con anticuerpo anti-PD-1 y se calcula para restar no tratadas de tratadas por el método de Overton. (C) La Geo MFI se define como la intensidad de fluorescencia media geométrica del canal PE y representa el nivel de unión del anticuerpo anti-PD-1 a PD-1 en la superficie de todas las células T CD3+. Los datos de la tabla resumen se expresaron como medias $\pm$ EE3 de diez donantes en ocho experimentos independientes y se analizaron mediante ANOVA4 de una vía para P1801 y el comparador. Los resultados se resumen en la siguiente Tabla 11.

Tabla 11

Ocupación del receptor P1801 en PBMC humanos

Sistema de prueba	Método de administración	Dosis (μ g/mL)
PBMC humanos	<i>Ex vivo</i>	0,01, 0,1, 1

Porcentaje medido de células T unidas a P1801 de donantes humanos sanos mediante citometría de flujo (N = 10) Porcentaje de células T CD3+ unidas a P1801

Grupos (μ g/mL) Intensidad de fluorescencia

%		ES	Valor p frente a nivolumab	IFM de Geo Media	ES	Valor p frente a nivolumab
Sin tratamiento	-	-	-	54.2	7.1	-
1 hlgG4 (Control negativo)	2.5	1.7	-	54.8	5.7	-
0,01 P1801	52	10.1	0,003	200.4	63.2	0,001
0,1 P1801	81.9	8.1	0,349	389,9	146,9	0,038
1 P1801	87,9	6.4	0,812	1050.7	449.2	0,782
0,01 Nivolumab	67,7	10	-	1705.9	808.2	-
0,1 Nivolumab	85.3	7.7	-	2238.8	1056.9	-
1 Nivolumab	87.2	7	-	2109.7	1003	-

Los resultados muestran que el porcentaje de unión de P1801 a PBMC humanos dependía

de la dosis. El porcentaje de células T CD3+ positivas para PD-1 de P1801 no fue significativamente diferente del de nivolumab a 0,1 y 1 µg/mL. Además, la actividad de unión de PD-1 de P1801 mostró dependencia de la dosis. A concentraciones moderadas y altas de 0,1 y 1 µg/mL, respectivamente, no hubo diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de PD-1+ entre P1801 y nivolumab ($p > 0,05$). A una concentración alta de 1 µg/mL, no hubo diferencias estadísticamente significativas en Geo MFI entre P1801 y nivolumab ($p > 0,05$).

Ejemplo 9

Eficacia *in vivo* en el tratamiento del cáncer de riñón singénico subcutáneo de Renca en ratones BALB/c hembra

Para evaluar la eficacia antitumoral del anticuerpo anti-PD1 en combinación con P1101 en un modelo de ratón, se utilizó la versión murina de ambas moléculas, es decir, mP1101, donde se utilizó interferón de ratón en lugar de la versión humana, y RMP 1-14, un mAb anti-PD1 de ratón conocido, se utilizó como mAb anti-PD1. El diseño del estudio incluye: aleatorización en grupos de estudio; dosificación diaria, 7 días a la semana durante 3 semanas; período de observación posterior al tratamiento basado en el sitio de implantación; administraciones subcutáneas u ortotópicas. Durante la dosificación y el período de observación, los animales fueron examinados diariamente, 5 días a la semana; se midió el peso corporal x2 por semana y el volumen del tumor x2 por semana, si la implantación era subcutánea.

La Tabla 12 muestra un resumen del diseño similar a la Figura 4(a) a 4(c) que muestra la administración de la combinación con la frecuencia de cada molécula. En la Tabla 12 a continuación, Q3D significa una administración cada 3 días. *6 significa 6 veces. SC significa administración subcutánea. IP significa inyección intraperitoneal. ROA significa vía de administración.

Tabla 12

Grupo	Número de ratones	Tratamiento	Nivel de dosis (mg/kg)	Solución dosificadora (mg/ml)	Volumen de dosificación (µL/g)	ROA	Frecuencia y duración de la dosificación
1	8	Vehículo	-	-	10	IP	3D × 6
2	8	Anti-PD1	12	1.2	10	IP	3D × 6
3	8	mP1101	0,1	0,01	10	Carolina del Sur	3D × 6
4 (combinado)	8	mP1101	0,1	0,01	10	Carolina del Sur	Q3D × 3 (en días diferentes)

		Anti-PD1	12	1.2	10	IP	Q3D × 6 (en días diferentes)
5 (combinado)	8	mP1101	0,1	0,01	10	Carolina del Sur	Q3D × 6 (en días diferentes)
		Anti-PD1	12	1.2	10	IP	Q3D × 6 (en días diferentes)
6 (Secuencial)	8	mP1101	0,1	0,01	10	Carolina del Sur	mP1011 Q3D × 3 seguido de anti-PD1 Q3D × 6
		Anti-PD1	12	1.2	10	IP	
7 (Secuencial)	8	mP1101	0,1	0,01	10	Carolina del Sur	mP1011 Q3D × 6 seguido de anti-PD1 Q3D × 5
		Anti-PD1	12	1.2	10	IP	

Métodos

Las células Renca (CL-00796) se mantuvieron in vitro con medio DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en el aire. Las células en fase de crecimiento exponencial se recolectaron y cuantificaron mediante un contador celular antes de la inoculación del tumor. Para la inoculación del tumor, cada ratón fue inoculado por vía subcutánea en la región del flanco inferior derecho con células tumorales Renca (1×10^6) en 0,1 ml de PBS para el desarrollo del tumor. La aleatorización comenzó cuando el tamaño medio del tumor alcanzó aproximadamente 70 mm³. Se inscribieron 56 ratones en el estudio. Todos los animales fueron asignados aleatoriamente a 7 grupos de estudio, 8 ratones en cada grupo. La aleatorización se realizó según el método de “distribución emparejada”/método “estratificado” (software StudyDirector (marca registrada), versión 3.1.399.19). La fecha de aleatorización se denominó día 0. El tratamiento se inició el mismo día de la aleatorización (día 1) según el diseño del estudio.

Observación y recopilación de datos

Después de la inoculación de células tumorales, los animales fueron controlados diariamente para detectar morbilidad y mortalidad. Durante el monitoreo de rutina, los animales fueron controlados para detectar cualquier efecto del crecimiento del tumor y los tratamientos en el

comportamiento, como movilidad, consumo de agua y comida, aumento/pérdida de peso corporal (los pesos corporales se midieron dos veces por semana después de la aleatorización), enmarañamiento de ojos/pelo y cualquier otra anomalía. La mortalidad y los signos clínicos observados se registraron en detalle para cada animal. Los volúmenes tumorales se midieron dos veces por semana después de la aleatorización en dos dimensiones usando un calibrador, y el volumen se expresó en mm³ usando la fórmula: $V = (L \times W \times W)/2$, donde V era el volumen del tumor, L era la longitud del tumor (la dimensión más larga del tumor) y W era el ancho del tumor (la dimensión más larga del tumor perpendicular a L). La dosificación, así como las mediciones del peso corporal y del tumor, se llevaron a cabo en una cabina de flujo laminar. Los pesos corporales y los volúmenes tumorales también se midieron usando el software StudyDirector.

Los tratamientos se realizaron durante 33 semanas. El estudio finalizó el día 33. No se recogieron tumores de los ratones sacrificados antes de la finalización del estudio. No se tomaron muestras de los ratones que se encontraron muertos.

Análisis estadístico

El método de análisis estadístico se realizó mediante la primera prueba de homogeneidad de varianza mediante la prueba de Bartlett. En segundo lugar, si el valor p de la prueba de Bartlett es mayor que 0,05, indica que no hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula de homogeneidad de varianza, que es uno de los supuestos de ANOVA. Por lo tanto, se realizó ANOVA para probar si existe algún par de grupos con diferentes medias de grupo y se ejecutó la prueba post hoc de Tukey HSD para todas las comparaciones por pares o la prueba t de Dunnett para cada tratamiento respecto de un control. Si el valor p de la prueba de Bartlett es menor o igual a 0,05, indica que hay alguna evidencia de que las varianzas pueden no ser iguales o que los datos no siguen una distribución normal. Luego, realizamos la prueba de Kruskal-Wallis para comprobar si existe algún par de grupos con diferentes medianas de grupo, y realizamos la prueba de comparación no paramétrica de todos los pares de Conover post hoc para todas las comparaciones por pares, o la prueba de comparación no paramétrica de muchos a uno de Conover para cada tratamiento respecto de un control. Ambas pruebas utilizan un ajuste de valor p de un solo paso. Además, las comparaciones por pares se realizaron sin corrección de comparación múltiple e informan los valores p nominales/sin corregir directamente de la prueba t de Welch o la prueba U de Mann-Whitney. El criterio para elegir la prueba t de Welch o la prueba U de Mann-Whitney es el mismo que el de la comparación de dos grupos.

Todos los análisis estadísticos se realizaron en lenguaje y entorno R para computación estadística y gráficos (versión 3.6.0). Todas las pruebas fueron bilaterales a menos que se especifique lo contrario, y los valores $p < 0,05$ se consideran estadísticamente significativos. Para el análisis de supervivencia se aplicó el modelo de Kaplan-Meier con el método Log-rank.

Resultados

Primero se midieron las curvas de crecimiento del peso corporal. Los resultados de los pesos corporales y los cambios de peso corporal en diferentes puntos temporales se muestran en la

Figura 10. Las curvas de crecimiento tumoral (volumen tumoral medio a lo largo del tiempo) de los diferentes grupos se muestran a continuación en la Tabla 13.

Tabla 13

Grupo	Tamaño del tumor (mm ³) en el día 1		Tamaño del tumor (mm ³) el día 22		TGIb (%)	Términos y condiciones	Valor p ^c
1	70,73 3,02(8)	+/-	3486,36 193,39(5)	+/-	-	-	-
2	70,74 2,88(8)	+/-	3431,09 133,33(7)	+/-	1,59	0,98	1,00 ns
3	70,71 2,89(8)	+/-	1021,35 182,55(7)	+/-	70,70	0,29	5.30e-11 ***
4	70,71 2,86(8)	+/-	1237,43 119,99(7)	+/-	64,51	0,35	4.30e-10 ***
5	70,76 2,88(8)	+/-	711,74 43,56(3)	+/-	79,59	0,20	2.83e-10 ***
6	70,72 2,94(8)	+/-	1266,68 194,51(8)	+/-	63,67	0,36	2.53e-10 ***
7	70,76 2,99(8)	+/-	822,66 233,62(7)	+/-	76,40	0,24	2.11e-11 ***

En este ejemplo, el volumen tumoral medio del Grupo 1 alcanzó 3486,36 mm³ el día 22 después del inicio del tratamiento. Grupo 2 tratado con Anti-PD1 12 mg/kg con valor TGI de 1,59 % el día 22. Grupo 3 tratado con mP1101 0,1 mg/kg con valor TGI de 70,70 % el día 22. Grupo 4 tratado con mP1101 0,1 mg/kg Q3D x 3 y Anti-PD1 12 mg/kg Q3D x 6 con valor TGI de 64,51 % el día 22. Grupo 5 tratado con mP1101 0,1 mg/kg Q3D x 6 y Anti-PD1 12 mg/kg Q3D x 6 con valor TGI de 79,59 % el día 22. Grupo 6 tratado con mP1101 0,1 mg/kg Q3D x 3 seguido de Anti-PD1 12 mg/kg Q3D x 6 con valor TGI de 63,67 % el día 22. Grupo 7 tratado con mP1101 0,1 mg/kg Q3D x 6 seguido de Anti-PD1 12 mg/kg Q3D x 6 con valor TGI de 76,40 % el día 22.

También se investigó el tiempo de supervivencia medio (MST) de cada grupo. Los ratones cuya condición alcanzó los puntos finales humanitarios fueron sacrificados. MST del control del vehículo, Anti-PD1 12 mg/kg, mP1101 0,1 mg/kg, mP1101 0,1 mg/kg Q3D x 3 y Anti-PD1 12 mg/kg Q3D x 6, mP1101 0,1 mg/kg Q3D x 6 y Anti-PD1 12 mg/kg Q3D x 6, mP1101 0,1 mg/kg Q3D x 3 seguido de Anti-PD1 12 mg/kg Q3D x 6, mP1101 0,1 mg/kg Q3D x 6 seguido de Anti-PD1 12 mg/kg Q3D x 6 fue respectivamente 23,00 días, 23,00 días (P>0,05 frente al grupo de control del vehículo), 31,50 días (P<0,01 frente al grupo de control del vehículo), 29,00 días (P<0,01 vs.

grupo control con vehículo), 16,50 días ($P > 0,05$ vs. grupo control con vehículo), 30,00 días ($P < 0,001$ vs. grupo control con vehículo) y 33,00 días ($P < 0,01$ vs. grupo control con vehículo).

En resumen, en este ejemplo, se evaluó la eficacia terapéutica del agente de prueba mP1101 en el modelo murino Renca en ratones BALB/c hembra. En comparación con el grupo del vehículo, el agente único mP1101 0,1 mg/kg (Grupo 3) y la combinación con Anti-PD1 12 mg/kg (Grupos 04, 05, 06 y 07) mostraron una eficacia antitumoral significativa ($P < 0,001$). Además, el agente único mP1101 0,1 mg/kg (Grupo 3) y la combinación con Anti-PD1 12 mg/kg (Grupos 04, 06 y 07) prolongaron la supervivencia de los ratones.

Ejemplo 10

Eficacia terapéutica

Para evaluar la eficacia antitumoral del mAb anti-PD1 P1801, los sujetos mamíferos pueden ser tratados con P1801 en una cantidad efectiva para reducir, suprimir y/o tratar el CCR, el CCR y/o el melanoma.

Cada sujeto con RCC o melanoma recibe tratamiento. Los tratamientos con P1801 dan como resultado una disminución del volumen tumoral medio en comparación con el grupo de control del vehículo. Se inscriben 30 sujetos en el estudio. Todos los sujetos se asignan aleatoriamente a 3 grupos de estudio diferentes. El tamaño tumoral medio en la aleatorización inicial es de aproximadamente 65 mm³. La fecha de aleatorización del tumor se indica como el día 0. Todos los sujetos son controlados diariamente. En el momento del control de rutina, se controla a los sujetos para detectar cualquier efecto del crecimiento tumoral y los tratamientos en el comportamiento, como la movilidad, el consumo de alimentos y agua, el aumento/pérdida de peso corporal y cualquier otra anomalía. Se registran la mortalidad y los signos clínicos observados para cada individuo. El volumen tumoral se mide dos veces por semana y el volumen se expresa en mm³ utilizando la fórmula: $V = (L \times W \times W)/2$, donde V es el volumen tumoral, L es la longitud del tumor (la dimensión tumoral más larga) y W es el ancho del tumor (la dimensión tumoral más larga perpendicular a L). El peso del tumor se midió al final del estudio.

El régimen de administración se puede ver en la Figura 12. Los sujetos muestran un tamaño reducido en melanoma o RCC, según corresponda.

Ejemplo 11

Para evaluar la eficacia antitumoral del mAb anti-PD1 P1801 que funciona en sujetos mamíferos junto con P1101 con la versión humana de interferón y/o la combinación de mAb anti-PD1 P1801 + P1101, se utiliza la versión humana de ambas moléculas, es decir, P1101 con interferón humano y P1801 versión humanizada. El diseño del estudio incluye: aleatorización en grupos de estudio; dosificación diaria, 7 días a la semana durante 3 semanas; período de observación posterior al tratamiento según el sitio de implantación; administraciones subcutáneas u ortotópicas. Durante el período de dosificación y observación, los sujetos humanos son examinados diariamente, 5 días a la semana; se mide el peso corporal x2 por semana y el volumen del tumor x2 por semana, si la implantación es subcutánea.

La Tabla 13 muestra el resumen del diseño experimental y las Figuras 4(a) a 4(c) muestran la administración de la combinación con la frecuencia de cada molécula. En la Tabla 14 a continuación, Q3D significa una administración cada 3 días. *6 significa 6 veces. SC significa administración subcutánea. IP significa inyección intraperitoneal.

Tabla 14

Artículo de prueba	Régimen de dosificación	Ruta	Periodo de estudio	Índice	Número de ratón
P1801 solo	300 mcg/sujeto (12 mg/kg), Q3D *6	Propiedad intelectual	6-8 semanas	Inhibición del crecimiento tumoral. Análisis de IHC (Ki67) evaluación	8
P1101 solo	2,5 mcg/sujeto (0,1 mg/kg), 3 dimensiones*6	CAROLINA DEL SUR			
P1101 +P1801 (secuencial)	P1101 2,5 mcg, Q3D*3 siguiendo P1801 300 mcg, Q3D*6	SC/IP			
	P1101 2,5 mcg, Q3D*6 después de P1801 300 mcg, Q3D*6				
P1101 +P1801 (combinación)	P1101 2,5 mcg, Q3D*3 + P1801 300 mcg, 3 días*6 (en un día diferente)				
	P1101 2,5 mcg, Q3D*6 + P1801 300 mcg, 3 días*6 (en un día diferente)				
Vehículo	PBS, Q3D*6	Propiedad intelectual			

Los resultados muestran que el tamaño del tumor de RCC, CRC y/o melanoma se reduce con todos los siguientes: tratamiento con P1801 junto con P1101 y el tratamiento combinado de P1801 y P1101 en sujetos humanos para el tratamiento de RCC, CRC y/o melanoma.

Ejemplo 12

Aumento de la dosis de la administración en serie en ensayos clínicos

Para comprobar el nivel de toxicidad/tolerancia de P1801 + P1101 en humanos, se llevó a cabo un ensayo de fase 1 en humanos. La dosis inicial de P1801 se determinó en función de los datos de farmacología y toxicología preclínicas. Se informó un NOAEL de 200 mg/kg en los estudios de toxicidad preclínica del mono cynomolgus, como lo ha demostrado el ejemplo anterior. Considerando un factor de conversión (mono a humano) de 3,1 y un factor de seguridad de 6 para introducir el margen de seguridad, la dosis inicial máxima recomendada de P1801 es de 10,75 mg/kg (200 mg/kg dividido por 3,1 y luego dividido por 6). Al imponer consideraciones de seguridad más estrictas, se selecciona 0,3 mg/kg como dosis inicial de este ejemplo.

Inicialmente, la evaluación se realizará en sujetos que cumplan con criterios como edad >18 años, que tengan un tumor sólido en RCC, melanoma, carcinoma hepatocelular (HCC) y/o CRC, y algunos pueden estar en fase avanzada. El sujeto también tendría una expectativa de vida mayor o igual a 3 meses, con función tiroidea normal y negativo para VHB, VHC y VIH. En esta cohorte 1-5, los sujetos con un tumor sólido avanzado que incluye especialmente carcinoma de células renales (RCC), melanoma, carcinoma hepatocelular (HCC) y cáncer colorrectal (CRC) son tratados con 6 dosis de P1101 a 450 mcg Q2W y luego seguido por el tratamiento con P1801 Q2W en el nivel de dosis predeterminado por cohorte durante cada ciclo de tratamiento de 28 días.

Para la escalada de dosis, se utilizan 5 cohortes diferentes, como se indica en la Figura 12. Una vez que se determina una dosis efectiva, se lleva a cabo una cohorte de expansión, como se indica en la Figura 13. La expresión de PD-L1 se mide para todos los sujetos, pero solo los sujetos con una expresión positiva de PD-L1 se inscriben en una cohorte adicional, como se indica en la Figura 14. Nótese que, en este ejemplo, P1101 y P1801 se administran secuencialmente, no de manera intercambiable. Los resultados muestran que una dosis efectiva indicada puede ser efectiva para tratar el cáncer colorrectal, el carcinoma hepatocelular, el carcinoma renal y el melanoma de este ejemplo.

Ejemplo 13

Determinación de paratopos

La estructura y el modelo 3D de P1801/PD-1 se determinaron utilizando una criomicroscopía electrónica de alta resolución para proporcionar estructuras de resolución a nivel atómico de P1801/PD-1 para revelar la disposición espacial de los aminoácidos en la estructura 3D y la determinación de los paratopos.

Para determinar los paratopos, se seleccionó una cuadrícula para la muestra PD1-AcroBio y se adquirió el siguiente conjunto de datos. Se recopiló un conjunto de datos para la

muestra PD1-AcroBio + PS00066 + PS00067. El conjunto de datos se procesó en cryoSPARC 4.4. Se eliminaron las micrografías con ajustes deficientes de la función de transferencia de contraste (CTF < 4 Å) y se seleccionaron 5306 micrografías para su posterior procesamiento. Se realizó una selección de partículas basada en plantillas y se extrajeron aproximadamente 4,0 millones de partículas con un tamaño de caja de 320 píxeles (~265 Å). Se realizaron dos rondas de clasificación 2D y se seleccionaron clases 2D para una limpieza inicial, lo que produjo ~1,5 millones de partículas. Los promedios de clases 2D muestran partículas discretas y bien definidas con diferentes vistas y características de estructura secundaria visibles. Las partículas seleccionadas se utilizaron en una ronda de reconstrucción *ab initio* seguida de cuatro refinamientos heterogéneos con tres señuelos y un refinamiento no uniforme. Las 128 K partículas finales generaron un mapa con la resolución más alta, y ese mapa fue seleccionado para un refinamiento adicional mediante el refinamiento global CTF seguido por el refinamiento de resolución local y la corrección de movimiento basada en referencia. La resolución estimada es 2,9 Å basada en la correlación de capas de Fourier estándar de oro de 0,143 (Figuras 16-17). Los semimapas se refinaron aún más utilizando DeepEMhancer, un paquete de Python implementado en cryoSPARC. Los modelos para PD1 (pliegue alfa) y dos FAB se acoplaron a la densidad disponible utilizando ChimeraX. Las regiones variables de los FAB se mutaron luego de acuerdo con la secuencia proporcionada por el cliente para PS00066 y PS00067. Las regiones constantes no se mostraron. El modelo resultante se sometió a rondas iterativas de reconstrucción manual (utilizando COOT) y refinamiento basado en computadora (Phenix). Los glicanos se construyeron manualmente en la posición ASN 49 y ASN 58. El modelo final se validó con los semimapas y se evaluó su calidad mediante MolProbity. La estructura obtenida proporciona la ubicación de la interfaz proteína-proteína entre PD1 y PS00066/PS00067.

Preparación de la muestra y la rejilla para crio-EM. PD1-AcroBio + PS00066 + PS00067 se preparó mezclando la muestra PD1-AcroBio, la muestra PS00066 y la muestra PS00067, en una proporción molar de 1:1:1 e incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente, lo que produjo una concentración final de proteína de 0,18 mg/ml para el complejo. La muestra PD1-AcroBio, la muestra PS00066 y la muestra PS00067, en una proporción molar de 1:1:1, se diluyeron 17,5 veces en DPBS (proporcionado por el cliente), lo que produjo una concentración final de muestra de 0,01 mg/ml antes de la preparación de la rejilla y la obtención de imágenes. Durante la congelación por inmersión tradicional, se utiliza el instrumento FEI Vitrobot o un émbolo manual. En resumen, se aplica una gota de 3 µl de suspensión de muestra a una rejilla EM que se ha limpiado con plasma utilizando un Gatan Solarus (Pleasanton, California). Después de secar la muestra con papel de filtro, las rejillas se congelan por inmersión en etano líquido. Las rejillas se almacenan bajo nitrógeno líquido hasta que se transfieren al microscopio electrónico de transmisión para obtener imágenes.

Imágenes crioeléctricas con microscopio FEI Titan Krios. La microscopía electrónica se realiza con un microscopio electrónico de transmisión FEI Titan Krios (Hillsboro, Oregón) operado

a 300 kV y equipado con un filtro de imágenes Gatan Quantum 967 LS, una placa de fase Volta y una cámara de detección directa Gatan K3. Las rejillas de hielo vítreo se colocan en cartuchos, se transfieren a un casete y luego al cargador automático Krios, todo mientras se mantienen las rejillas a temperatura criogénica (por debajo de -170°C). La recopilación de datos automatizada se lleva a cabo utilizando el software Legicon, donde se adquieren películas de gran aumento seleccionando objetivos con un aumento menor.

Preprocesamiento y análisis de clasificación 2D (cryoSPARC, Relion). La alineación de fotogramas de películas ponderada por dosis se realiza utilizando MotionCor2 o corrección de movimiento de fotograma completo o de parche en cryoSPARC (Punjani et al, 2017) para tener en cuenta la deriva de la platina y el movimiento inducido por el haz. La función de transferencia de contraste se estima para cada micrografía utilizando CTFfind4, gCTF o Patch CTF en cryoSPARC (Rohou et al., 2015; Zhang et al., 2016). Las partículas individuales se seleccionan utilizando protocolos de selección automatizados y se extraen en pilas de partículas en Relion o cryoSPARC. Luego, las partículas se pueden enviar a alineación y clasificación 2D sin referencia en Relion o cryoSPARC.

Se utilizó CryoSPARC (Cryo-EM Single Particle Analysis Reconstruction and Classification) para optimizar el procesamiento de datos crio-EM, proporcionar capacidades como selección de partículas, clasificación 2D, reconstrucción 3D y refinamiento. Inicialmente, se filtraron las cuadrículas y se compilaron los datos. A partir de los datos generados a partir de los datos de micrografía cryoSPARC 4.4, se generó un mapa. La Figura 16 es una imagen generada con ChimeraX de la reconstrucción 3D final de PD1-AcroBio + PS 00066 + PS00067 a una resolución nominal de 2,9 Å. El mapa generado con la resolución más alta se seleccionó para un mayor refinamiento utilizando el refinamiento global CTF seguido del refinamiento de resolución local y la corrección de movimiento basada en referencia. La resolución estimada es de 2,9 Å según la correlación de capas de Fourier estándar de oro de 0,143. Los mapas se refinaron aún más utilizando DeepEMhancer, un paquete de Python implementado en cryoSPARC. Los modelos para PD1 (pliegue alfa) y dos FAB se acoplaron a la densidad disponible utilizando ChimeraX. La Figura 17 es una imagen generada con ChimeraX del mapa final 2.9 Å coloreado por los valores de resolución local calculados por cryoSPARC 4.4. Las regiones variables de los FAB se mutaron luego de acuerdo con la secuencia proporcionada por el cliente para PS00066 y PS00067. El modelo resultante se sometió a rondas iterativas de reconstrucción manual (utilizando COOT) y refinamiento basado en computadora (Phenix). El modelo final se validó respecto de los mapas y su calidad se evaluó mediante MolProbity. La estructura obtenida proporcionó la ubicación de la interfaz proteína-proteína entre PD1 y PS00066/PS00067. El modelo ilustró las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas entre PD1 y PS00067. El contacto proteína-proteína parece estar impulsado principalmente por interacciones hidrofóbicas, con un grupo de residuos alifáticos y aromáticos como Tyr 32, Pro 33, His 52, Tyr 54 (I:PS00067), Tyr 95 (M:PS00067) y Pro 39, Ala 40, Leu 41, Leu 42, Val 43, Thr 45, Thr 145 (PD1). Además, Arg 143 y Glu 141 (PD1) pueden

estar involucrados en la unión de hidrógeno con Glu 99 (I:PS00067) y Tyr 101 (M:PS00067) / His 104 (I:PS00067), respectivamente.

La Figura 18 es una imagen de la estructura del complejo P1801/PD1 resuelta mediante criomicroscopía electrónica. La Figura 19 es una imagen de la estructura del complejo P1801/PL1/PD1 resuelta mediante criomicroscopía electrónica que muestra una superposición de P1801/PD1 y PD-L1/PD1. La Figura 20 es una imagen del mapeo del epítipo del epítipo P1801 que muestra la unión a T59, S60, E61, S62, V64*, P83, E84*, D85, R86, L128* y A129 de la cadena pesada y a S87, P130*, K131* y A132* de la cadena ligera, donde * denota compartición entre epítipos. La Figura 21 es una imagen del mapeo del epítipo del epítipo PD-L1 que muestra la unión a V64*, N66, Y68, S73, N74, Q75, T76, D77, K78, E84*, G124, I126, L128*, P130*, K131*, A132*, I134 y E136, donde * denota compartición entre epítipos. La Figura 22 es un modelo de los CDR de P1801 en la interfaz de unión de PD-1.

La Figura 23 es un gráfico de la unión del epítipo a los anticuerpos anti-PD-1. La Figura 23 muestra que todos los anticuerpos pueden unirse fuertemente a PD-1 en presencia de P1801, lo que indica que su epítipo es diferente. Se seleccionó ISIS-clone19 como Fa no competitivo. El peresolimab es un anticuerpo monoclonal de inmunoglobulina G1 humanizado que estimula el PD-1 humano.

En una forma de realización, la secuencia de la cadena pesada de la región variable P1801 con CDR delineados es

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVATITGGGSYTYYP
DSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPYLNYFDYWGGTGLTVTVSS (SEQ ID No: 5).

Se muestra la secuencia VHCDR1 SSYDMS (SEQ ID No: 18); la secuencia VHCDR2 TITGGGSYTYYPDSVKG (SEQ ID No: 10); y la secuencia VHCDR3 PYLNYFDY (SEQ ID No: 11).

La secuencia de la cadena ligera de la región variable P1801 con CDR delineados es:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSSISNNLHWYQQKPGQAPRLLIYYASQSIGIPARFSGSG
SGTD FTLTISSELPEDFAVYYCQQSNSWPLTFGQGGTKLEIK (SEQ ID No: 6).

Se muestra la secuencia VLCDR1 RASQSSISNNLH (SEQ ID No: 12); la secuencia VLCDR2 YASQSSIS (SEQ ID No: 13); y la secuencia VLCDR3 QQSNSWPLT (SEQ ID No: 14).

En otra forma de realización, la secuencia de cadena pesada de la región variable P1801 con CDR delineados es

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVATITGGGSYTYYP
DSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPYLNYFDYWGGTGLTVTVSS (SEQ ID No: 5).

Se muestra la secuencia VHCDR1 GFTFSSYDMS (SEQ ID No: 19); la secuencia VHCDR2 TITGGGSYTYYPDSVKG (SEQ ID No: 10); y la secuencia VHCDR3 ASPYLNYFDY (SEQ

ID No: 20). La secuencia de la cadena ligera de la región variable P1801 con los CDR delineados es EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSSISNNLHWYQQKPGQAPRLLIYYASQSIGIPARFSGSGSGTDFLTISSELPEDFAVYYCQQSNSWPLTFGQGKLEIK (SEQ ID No: 6).

Se muestra la secuencia VLCDR1 RASQSSISNNLH (SEQ ID No: 12); la secuencia VLCDR2 YASQSSIS (SEQ ID No: 13); y la secuencia VLCDR3 QQSNSWPLT (SEQ ID No: 14).

En una forma de realización, la secuencia de la cadena pesada de la región variable P1801 con CDR delineados que ilustran los paratopos es EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVATITGGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPYLNYFDYWGGTGLTVTVSS (SEQ ID No: 5). Se muestra la secuencia VHCDR1 G E TF SSY DMS (SEQ ID No: 19) también puede ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp Met Ser y numerarse como Gly1 Phe2 Thr3 Phe4 Ser5 Ser6 Tyr7 Asp8 Met9 Ser10. Los parátomos de la secuencia VHCDR1 comparten Phe2 Ser5 Ser6 y Tyr7 sobre todos los parátomos. Como tal, Gly1 Thr3 Phe4 Asp8 Met9 y Ser10 pueden sustituirse individualmente por cualquier residuo de aminoácido. Por ejemplo, Gly1 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; Thr3 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr o Val; Phe4 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; Asp8 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; Met9 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; y Ser10 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp, Tyr o Val.

La secuencia VHCDR2 TI TGGGSY TYYPDSVKG (SEQ ID No:10) puede ser Thr Ile Thr Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly y numerarse como Thr11 Ile12 Thr13 Gly14 Gly15 Gly16 Ser17 Tyr18 Thr19 Tyr20 Tyr21 Pro22 Asp23 Ser24 Val25 Lys26 Gly27. Los parátomos de la secuencia VHCDR2 comparten Thr13 Gly14 Gly15 Gly16 Ser17 y Tyr18 entre todos los parátomos. Como tal, Thr11, Ile12, Thr19, Tyr20, Tyr21, Pro22, Asp23, Ser24, Val25, Lys26 y Gly27 pueden sustituirse individualmente por cualquier residuo de aminoácido. Por ejemplo, Thr11 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr o Val; Ile12 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; Thr19 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr o Val; Tyr20 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp o Val; Tyr21 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp o Val; Pro22

puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; Asp23 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; Ser24 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp, Tyr o Val; Val25 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; Lys26 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp o Tyr; y Gly27 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val.

La secuencia VHCDR3 A S P YLN YF DY (SEQ ID No:20) puede ser Ala Ser Pro Tyr Leu Asn Tyr Phe Asp Tyr y numerarse como Ala30 Ser31 Pro32 Tyr33 Leu34 Asn35 Tyr36 Phe37 Asp38 Tyr39. Los parátomos de la secuencia VHCDR3 comparten Ser31, Tyr33, Leu34, Asn35, Asp38 y Tyr39 entre todos los parátomos. Como tal, Ala30, Pro32, Tyr36 y Phe37 pueden sustituirse individualmente por cualquier residuo de aminoácido. Por ejemplo, Ala30 puede sustituirse independientemente por Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; Pro32 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; Tyr36 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp o Val; y Phe37 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val.

En otra forma de realización, la secuencia alternativa de la cadena pesada de la región variable P1801 con CDR delineados que ilustran los parátomos es

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYDMSWVRQAPGKGLEWVATITGGGSYTYYPD
SVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPYLNIFYDWGQGTLTVSS (SEQ ID
NO: 22)

Se muestra la secuencia alternativa VHCDR1 G F TF SY DMS (SEQ ID No: 21) también se puede escribir como Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Asp Met Ser y numerar como Gly1 Phe2 Thr3 Phe4 Ser5 Tyr6 Asp7 Met8 Ser9. Los parátomos de la secuencia VHCDR1 comparten Phe2, Ser5 y Tyr6 sobre todos los parátomos. Como tal, Gly1, Thr3, Phe4, Asp8, Met9 y Ser10 pueden sustituirse individualmente por cualquier residuo de aminoácido. Por ejemplo, Gly1 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; Thr3 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr o Val; Phe4 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; Asp7 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; Met8 puede

sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; y Ser9 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp, Tyr o Val.

La secuencia VHCDR2 TI TGGGSY TYYPDSVKG (SEQ ID No:10) puede ser Thr Ile Thr Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly y numerarse como Thr11 Ile12 Thr13 Gly14 Gly15 Gly16 Ser17 Tyr18 Thr19 Tyr20 Tyr21 Pro22 Asp23 Ser24 Val25 Lys26 Gly27. Los parátomos de la secuencia VHCDR2 comparten Thr13, Gly14, Gly15, Gly16, Ser17 y Tyr18 entre todos los parátomos. Como tal, Thr11, Ile12, Thr19, Tyr20, Tyr21, Pro22, Asp2,3 Ser24, Val25, Lys26 y Gly27 pueden sustituirse individualmente por cualquier residuo de aminoácido. Por ejemplo, Thr11 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr o Val; Ile12 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; Thr19 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr o Val; Tyr20 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp o Val; Tyr21 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp o Val; Pro22 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; Asp23 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; Ser24 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp, Tyr o Val; Val25 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; Lys26 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Tyr; y Gly27 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val.

La secuencia VHCDR3 A S P YLN YF DY (SEQ ID No:20) puede ser Ala Ser Pro Tyr Leu Asn Tyr Phe Asp Tyr y numerarse como Ala30 Ser31 Pro32 Tyr33 Leu34 Asn35 Tyr36 Phe37 Asp38 Tyr39. Los parátomos de la secuencia VHCDR3 comparten Ser31, Tyr33, Leu34, Asn35, Asp38 y Tyr39 entre todos los parátomos. Como tal, Ala30, Pro32, Tyr36 y Phe37 pueden sustituirse individualmente por cualquier residuo de aminoácido. Por ejemplo, Ala30 puede sustituirse independientemente por Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; Pro32 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; Tyr36 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp o Val; y Phe37 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met,

Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val.

La secuencia VHCDR3 P YLN YF DY (SEQ ID No:11) puede ser Pro Tyr Leu Asn Tyr Phe Asp Tyr y numerarse como Pro32 Tyr33 Leu34 Asn35 Tyr36 Phe37 Asp38 Tyr39. Los parátomos de la secuencia VHCDR3 comparten Tyr33, Leu34, Asn35, Asp38 y Tyr39 entre todos los parátomos. Como tal, Pro32, Tyr36 y Phe37 pueden sustituirse individualmente por cualquier residuo de aminoácido. Por ejemplo, Tyr36 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp o Val; y Phe37 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val.

La secuencia VHCDR3 S P YLN YF DY (SEQ ID No:23) puede ser Ser Pro Tyr Leu Asn Tyr Phe Asp Tyr y numerarse como Ser31 Pro32 Tyr33 Leu34 Asn35 Tyr36 Phe37 Asp38 Tyr39. Los parátomos de la secuencia VHCDR3 comparten Ser31, Tyr33, Leu34, Asn35, Asp38 y Tyr39 entre todos los parátomos. Como tal, Pro32, Tyr36 y Phe37 pueden sustituirse individualmente por cualquier residuo de aminoácido. Por ejemplo, Pro32 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; Tyr36 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp o Val; y Phe37 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val.

En una forma de realización, la secuencia de cadena ligera de la región variable P1801 con CDR delineados que ilustran los parátomos es

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSSISNNLHWYQQKPGQAPRLLIYYASQSSISGIPARFSG
S GSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQSNSWPLTFGQGGTKLEIK (SEQ ID No: 6).

Se muestra la secuencia VLCDR1 RASQSISN N LH (SEQ ID No:12) también se puede escribir como Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn Leu His y numerarse como Arg1 Ala2 Ser3 Gln4 Ser5 Ile6 Ser7 Asn8 Asn9 Leu10 His11. Los parátomos de la secuencia VLCDR1 comparten Asn9 sobre todos los parátomos. Como tal, Arg1, Ala2, Ser3, Gln4, Ser5, Ile6, Ser7, Asn8, Leu10 y His11 pueden sustituirse individualmente por cualquier residuo de aminoácido. Por ejemplo, Arg1 puede sustituirse independientemente por Ala, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; Ala2 puede sustituirse independientemente por Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; Ser3 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp, Tyr o Val; In4 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; Ser5 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp, Tyr o Val; Ile6 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; Ser7 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg,

Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp, Tyr o Val; Asn8 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; y Leu10 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; y His11 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val.

Secuencia VLCDR2 Y ASQSI S (SEQ ID No:13) puede ser Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser y numerarse como Tyr12 Ala13 Ser14 Gln15 Ser16 Ile17 Ser18. Los parátomos de la secuencia VLCDR2 comparten Tyr12 y Ser18 sobre todos los parátomos. Como tal, Ala13, Ser14, Gln15, Ser16 e Ile17 pueden sustituirse individualmente por cualquier residuo de aminoácido. Por ejemplo, Ala13 puede sustituirse independientemente por Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; Ser14 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp, Tyr o Val; Gln15 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; Ser16 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp, Tyr o Val; y Ile17 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val.

La secuencia VLCDR3 QQ SN S W PLT (SEQ ID No: 14) puede ser Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu Thr y numerarse como Gln20 Gln21 Ser22 Asn23 Ser24 Trp25 Pro26 Leu27 Thr28.

Los parátomos de la secuencia VLCDR3 comparten Ser22, Asn23 y Trp25 entre todos los parátomos. Como tal, Gln20, Gln21, Ser24, Pro26, Leu27 y Thr28 pueden sustituirse individualmente por cualquier residuo de aminoácido. Por ejemplo, Gln20 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; Gln21 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; Ser24 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp, Tyr o Val; Pro26 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; Leu27 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val; y Thr28 puede sustituirse independientemente por Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr o Val.

Tabla 15

Nombre	Secuencia de paratopos
VHCDR1	<u>SYDMS</u> (SEQ ID No:9)

VHCDR1	<u>SS</u> YDMS (SEQ ID No:18)
VHCDR1	G <u>F</u> T <u>FSS</u> YDMS (SEQ ID No:19)
VHCDR1	G <u>F</u> T <u>FS</u> YDMS (SEQ ID No:21)
VHCDR2	TIT <u>G</u> <u>GGS</u> YTYYPDSVKG (SEQ ID No:10)
VHCDR3	P <u>Y</u> L <u>N</u> YFDY (SEQ ID No:11)
VHCDR3	A <u>S</u> P <u>Y</u> L <u>N</u> YFDY (SEQ ID No:20)
VHCDR3	<u>S</u> P <u>Y</u> L <u>N</u> YFDY (SEQ ID No:23)
VLCDR1	<u>R</u> ASQSI <u>S</u> NNLH (SEQ ID No:12)
VLCDR2	<u>Y</u> ASQSI <u>S</u> (SEQ ID No:13)
VLCDR3	Q <u>Q</u> S <u>N</u> SWPLT (SEQ ID No:14)

En las secuencias paratrópicas enumeradas en la Tabla 15, los residuos de aminoácidos presentados en negrita y subrayados son constantes en las distintas proteínas. Los residuos de aminoácidos restantes en las secuencias pueden sustituirse individualmente por cualquier residuo de aminoácido, por ejemplo, Ala, Arg, Asn, Asp, Asx, Cys, Glu, Gln, Glx, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val. Siempre que se mantengan los residuos en negrita y subrayados en las CDR, los residuos de aminoácidos restantes pueden sustituirse individualmente manteniendo la función. Como tal, la presente divulgación prevé numerosas variaciones en la secuencia de las CDR, siempre que se mantengan los residuos en negrita y subrayados en las CDR y se sustituyan uno o más de los residuos de aminoácidos restantes. Dada esta definición funcional, los inventores actuales contemplan una plétora de diferentes secuencias de CDR caracterizadas por los residuos en negrita y subrayados en el CDR, uno o más aminoácidos sustituidos y la retención de la función de la secuencia.

Se contempla que cualquier forma de realización analizada en esta especificación se puede implementar con respecto a cualquier método, kit, reactivo o composición de la divulgación, y viceversa. Además, las composiciones de la divulgación se pueden utilizar para lograr métodos de la divulgación.

Se entenderá que las formas de realización particulares descritas en el presente documento se muestran a modo de ilustración y no como limitaciones de la divulgación. Las características principales de esta divulgación se pueden emplear en diversas formas de realización sin alejarse del alcance de la divulgación. Los expertos en la materia reconocerán, o podrán determinar utilizando únicamente la experimentación rutinaria, numerosos equivalentes a los procedimientos específicos descritos en el presente documento. Dichos equivalentes se consideran dentro del alcance de esta divulgación y están cubiertos por las reivindicaciones.

Todas las publicaciones y solicitudes de patentes mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de conocimientos de los expertos en la materia a la que se refiere esta

divulgación. Todas las publicaciones y solicitudes de patentes se incorporan aquí como referencia en la misma medida que si cada publicación o solicitud de patente individual se hubiera indicado específica e individualmente para ser incorporada como referencia.

El uso de la palabra “un” o “una” cuando se utiliza junto con el término “que comprende” en las reivindicaciones y/o la especificación significar “uno”, pero también es coherente con el significado de “uno o más”, “al menos uno” y “uno o más de uno”. El uso del término “o” en las reivindicaciones se utiliza para significar “y/o” a menos que se indique explícitamente que se refiere únicamente a alternativas o que las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la divulgación respalda una definición que se refiere únicamente a alternativas y “y/o”. A lo largo de esta solicitud, el término “aproximadamente” se utiliza para indicar que un valor incluye la variación inherente del error para el dispositivo, el método que se emplea para determinar el valor o la variación que existe entre los sujetos del estudio.

Tal como se utilizan en esta especificación y en las reivindicaciones, las palabras “que comprende” (y cualquier forma de comprender, como “comprender” y “comprende”), “que tiene” (y cualquier forma de tener, como “tener” y “tiene”), “que incluye” (y cualquier forma de incluir, como “incluye” e “incluir”) o “que contiene” (y cualquier forma de contener, como “contiene” y “contener”) son inclusivas o abiertas y no excluyen elementos o pasos de método adicionales no mencionados.

El término “o combinaciones de los mismos” tal como se utiliza en el presente documento se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los elementos enumerados que preceden al término. Por ejemplo, “A, B, C o combinaciones de los mismos” pretende incluir al menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC o ABC, y si el orden es importante en un contexto particular, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC o CAB. Siguiendo con este ejemplo, se incluyen expresamente las combinaciones que contienen repeticiones de uno o más elementos o términos, como BB, AAA, AB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB, etc. El experto en la materia entenderá que, por lo general, no existe un límite en la cantidad de elementos o términos en cualquier combinación, a menos que se desprenda lo contrario del contexto.

Todas las composiciones y/o métodos divulgados y reivindicados en el presente documento pueden elaborarse y ejecutarse sin experimentación indebida a la luz de la presente divulgación. Si bien las composiciones y los métodos de esta divulgación se han descrito en términos de formas de realización preferidas, será evidente para los expertos en la materia que se pueden aplicar variaciones a las composiciones y/o métodos y en los pasos o en la secuencia de pasos del método descrito en el presente documento sin apartarse del concepto, espíritu y alcance de la divulgación. Se considera que todos los sustitutos y modificaciones similares evidentes para los expertos en la materia están dentro del espíritu, alcance y concepto de la divulgación tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.