



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 430**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03780521 .5**

96 Fecha de presentación : **22.12.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1576014**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.09.2005**

54 Título: **Anticuerpos contra PD-1 y sus usos.**

30 Prioridad: **23.12.2002 US 435354 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.11.2011

73 Titular/es: **WYETH L.L.C.**
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940, US
MEDIMMUNE LIMITED

72 Inventor/es: **Collins, Mary;**
Wood, Clive;
Carreno, Beatriz;
Valge-Archer, Viia;
Luxenberg, Deborah;
Jussif, Jason;
Russell, Caroline;
Carter, Laura, K.;
Bennett, Frances y
Andrews, John

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 367 430 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra PD-1 y sus usos

5 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIONCampo de la invención

[0001] El campo técnico se refiere a la modulación de las respuestas inmunitarias reguladas por el receptor de la muerte programada 1 (PD-1).

10

Antecedentes de la intención

[0002] Una respuesta inmunitaria adaptativa supone la activación, selección, y proliferación clonal de dos clases principales de linfocitos denominados células T y células B. Después de encontrarse con un antígeno, las células T proliferan y se diferencian en células efectoras específicas de antígeno, mientras que las células B proliferan y se diferencian en células que segregan anticuerpos.

15

[0003] La activación de las células T es un proceso multietapa que requiere varios eventos de señalización entre la célula T y una célula presentadora de antígenos (APC). Para que se produzca la activación de la célula T, se deben proporcionar dos tipos de señales a una célula T en reposo. El primer tipo está mediado por el receptor de células T específicas de antígeno (TcR), y confiere especificidad a la respuesta inmunitaria. El segundo tipo, de estimulación simultánea, regula la magnitud de la respuesta y se proporciona mediante receptores accesorios sobre las células T.

20

[0004] Se proporciona una señal de estimulación simultánea primaria mediante la activación del receptor CD28 tras el acoplamiento de sus ligandos B7-1 o B7-2. En contraste, el acoplamiento del receptor inhibidor CTLA-4 con los mismos ligandos B7-1 o B7-2 da como resultado la atenuación de la respuesta de las células T. Así, las señales de CTLA-4 antagonizan la estimulación simultánea mediada por CD28. A concentraciones de antígeno elevadas, la estimulación simultánea de CD28 anula el efecto inhibitorio de CTLA-4. La regulación temporal de la expresión de CD28 y CTLA-4 mantiene un equilibrio entre las señales de activación y de inhibición y asegura el desarrollo de una respuesta inmunitaria eficaz, mientras que al mismo tiempo protege contra el desarrollo de la autoinmunidad.

25

30

[0005] Recientemente se han identificado los homólogos moleculares de CD28 y CTLA-4 y sus ligandos similares a B-7. ICOS es un receptor de estimulación simultánea similar a CD28. El receptor PD-1 (muerte programada 1) es un receptor inhibitorio y equivalente a CTLA-4. Esta descripción se refiere a la modulación de respuestas inmunitarias mediadas por el receptor PD-1.

35

[0006] PD-1 es un receptor transmembrana de tipo I de 50-55 kDa que fue identificado originalmente en una línea de células T que experimentan la apoptosis inducida por activación. PD-1 se expresa en células T, células B, y macrófagos. Los ligandos para PD-1 son los miembros de la familia B7, PD-L1 (B7-H1) y PD-L2 (B7-DC).

40

[0007] PD-1 es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) que contiene un solo dominio Ig de tipo V en su región extracelular. El dominio citoplasmático de PD-1 contiene dos tirosinas, con la tirosina más próxima a la membrana (VAYEEL en PD-1 de ratón) localizada en un ITIM (motivo inhibitorio de un inmuno-receptor basado en tirosina). La presencia de un ITIM en PD-1 indica que esta molécula funciona para atenuar la señalización del receptor de antígenos por reclutamiento de fosfatasa citoplasmáticas. Las proteínas PD-1 humanas y murinas comparten una identidad en aminoácidos del 60% aproximadamente con la conservación de sitios de N-glicosilación potenciales, y restos que definen el dominio Ig-V. El ITIM que se encuentra en la región citoplasmática y el motivo similar a ITIM que rodea la tirosina carboxi-terminal (TEYATI en seres humanos y en ratón) también están conservados entre los ortólogos humanos y murinos.

45

50

[0008] PD-1 se expresa en células T, células B, y monocitos activados. Los datos experimentales relacionan las interacciones de PD-1 con sus ligandos en la regulación por defecto de las respuestas inmunitarias centrales y periféricas. En particular, la proliferación en células T de tipo silvestre se inhibe en presencia de PD-L1, pero no en células T deficientes en PD-1. Además, ratones deficientes en PD-1 presentan un fenotipo autoinmunitario. La deficiencia de PD-1 en ratones C57BL/6 da como resultado una glomerulonefritis y una artritis similar al lupus crónico progresivo. En ratones Balb/c, la deficiencia en PD-1 da lugar a cardiomiopatías severas debido a la presencia de anticuerpos auto-reactivos específicos del tejido cardíaco. Agata y col. (1996) describe un anticuerpo que se une al PD-1 de ratón. El documento WO 02/078731 describe la secuencia del PD-1 humano y anticuerpos que inhiben la interacción entre PD-L1 y PD-1.

55

60

[0009] En general, existe la necesidad de proporcionar procedimientos terapéuticos seguros y efectivos para trastornos inmunitarios tales como, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias, trastornos inflamatorios, alergias, rechazo de trasplantes, cáncer, deficiencias inmunitarias, y otros trastornos relacionados con el sistema inmunitario. La modulación de las respuestas inmunitarias involucradas en estos trastornos se puede conseguir con la
5 manipulación de la vía del PD-1.

SUMARIO DE LA INVENCION

[0010] La presente descripción proporciona anticuerpos que pueden actuar como agonistas y/o antagonistas
10 de PD-1, modulando así las respuestas inmunitarias reguladas por PD-1. La descripción además proporciona anticuerpos contra PD-1 que comprenden nuevos fragmentos de unión a antígenos. Los anticuerpos contra PD-1 de la invención son capaces de (a) unirse específicamente a PD-1, incluyendo el PD-1 humano; (b) bloquear las interacciones de PD-1 con su(s) ligando(s) natural(es); o (c) desempeñar ambas funciones. Además, los anticuerpos pueden tener propiedades inmunomoduladoras, es decir, pueden ser eficaces en la modulación de la regulación por
15 defecto asociada a PD-1 de respuestas inmunitarias. Dependiendo del procedimiento de uso y el efecto deseado, los anticuerpos se pueden usar para potenciar o inhibir respuestas inmunitarias.

[0011] Las formas de realización ilustrativas de los anticuerpos se denominan PD1-17, PD1-28, PD1-33, PD1-35, y PD1-F2. Otras formas de realización comprenden un dominio V_H y/o V_L del fragmento Fv de PD1-17, PD1-28,
20 PD1-33, PD1-35, o PD1-F2. Formas de realización adicionales comprenden una o más regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de cualquiera de estos dominios V_H y V_L . Otras formas de realización comprenden un fragmento H3 del dominio V_H de PD1-17, PD1-28, PD1-33, PD1-35, o PD1-F2.

[0012] La descripción también proporciona composiciones que comprenden anticuerpos PD-1, y su uso en
25 procedimientos de modulación de la respuesta inmunitaria, incluyendo procedimientos para el tratamiento de seres humanos o animales. En formas de realización particulares, los anticuerpos contra PD-1 se usan para tratar o prevenir trastornos inmunitarios incrementando o reduciendo la respuesta de las células T mediada por TcR/CD28. Los trastornos susceptibles al tratamiento con las composiciones de la invención incluyen, pero no están limitados a, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, lupus
30 eritematoso sistémico, diabetes de tipo I, rechazo de trasplantes, enfermedad de injerto contra hospedador, trastornos inmunitarios hiperproliferativos, cáncer, y enfermedades infecciosas.

[0013] Además, los anticuerpos contra PD-1 se pueden usar en diagnosis para detectar PD-1 o sus fragmentos en una muestra biológica. La cantidad de PD-1 detectada puede estar relacionada con el nivel de
35 expresión de PD-1, que a su vez, está relacionado con el estado de activación de las células inmunitarias (por ejemplo, células T, células B, y monocitos activados) en el sujeto.

[0014] La descripción también proporciona ácidos nucleicos aislados, que comprenden una secuencia que codifica un dominio V_H o V_L procedente del fragmento Fv de PD1-17, PD1-28, PD1-33, PD1-35, o PD1-F2. También
40 se proporcionan ácidos nucleicos aislados, que comprenden una secuencia que codifica una o más CDRs procedente de cualquiera de los dominios V_H y V_L descritos en el presente documento. La descripción también proporciona vectores y células hospedadoras que comprenden dichos ácidos nucleicos.

[0015] La descripción adicionalmente proporciona un procedimiento de producción de nuevos dominios V_H y
45 V_L y/o anticuerpos funcionales que comprenden todos o una parte de dichos dominios derivados de los dominios V_H o V_L de PD1-17, PD1-28, PD1-33, PD1-35, o PD1-F2.

[0016] Aspectos adicionales de la exposición se desarrollarán en parte en la siguiente descripción, y en parte serán obvios a partir de la descripción, o se pueden conocer poniendo en práctica la invención. La invención se
50 desarrolla y se concreta particularmente en las reivindicaciones anexas, y la presente exposición no se debe interpretar en ningún modo como una limitación del alcance de las reivindicaciones. La presente descripción detallada incluye representaciones ejemplares de diversas formas de realización de la invención, que no suponen una restricción de la misma, como se ha indicado. Las Figuras acompañantes constituyen una parte de esta memoria descriptiva y, junto con la descripción, sirven para ilustrar diversas formas de realización de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0017] Las Figuras 1A y 1B muestra la reactividad de anticuerpos scFv con el PD-1 humano determinado mediante ELISA de fagos.

[0018] Las Figuras 2A-2C muestran la reactividad de anticuerpos convertidos por IgG con el PD-1 humano o
60 de ratón determinado mediante ELISA.

[0019] La Figura 3 presenta los resultados de un ELISA que demuestra que anticuerpos PD-1 seleccionados inhiben la unión de PD-L1 a PD-1.

[0020] La Figura 4 presenta los resultados de un ELISA que demuestra que anticuerpos PD-1 inmunomoduladores se unen a diferentes sitios sobre PD-1 según se determina mediante ensayos de ELISA de bloqueo cruzado.

[0021] La Figura 5 presenta los resultados de ensayos de proliferación de células T que demuestran que el acoplamiento simultáneo de TcR y el anticuerpo contra PD-1, PD1-17 o PD-L1.Fc reduce la proliferación. El acoplamiento simultáneo de TcR y el anticuerpo contra PD-1 J110 no tiene ningún efecto sobre la proliferación.

[0022] La Figura 6 demuestra una proliferación aumentada de células T primarias mediante PD1-17 en una forma soluble.

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

[0023] El término "anticuerpo", como se usa en esta descripción, se refiere a una inmunoglobulina o uno de sus fragmentos o derivados, y engloba cualquier polipéptido que comprenda un sitio de unión a antígenos, independientemente de si se ha producido *in vitro* o *in vivo*. El término incluye, pero no está limitado a, anticuerpos policlonales, monoclonales, monoespecíficos, poliespecíficos, no específicos, humanizados, de cadena sencilla, quiméricos, sintéticos, recombinantes, híbridos, mutados, e injertados. A menos que estén modificados de otra forma por el término "intacto", como en "anticuerpos intactos", para los propósitos de esta descripción, el término "anticuerpo" también incluye fragmentos de anticuerpos tales como Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, dAb, y otros fragmentos de anticuerpos que retengan la función de unión a antígenos, es decir, la capacidad para unirse específicamente a PD-1. Normalmente dichos fragmentos comprenderán un dominio de unión a antígenos.

[0024] Las expresiones "dominio de unión a antígenos", "fragmento de unión a antígenos", y "fragmento de unión" se refieren a una parte de una molécula de anticuerpo que comprende aminoácidos responsables de la unión específica entre el anticuerpo y el antígeno. En los casos en los que un antígeno sea grande, es posible que el dominio de unión a antígenos sólo se una a una parte del antígeno. La fracción de la molécula antigénica que es responsable de interacciones específicas con el dominio de unión a antígenos se denomina "epitopo" o "determinante antigénico".

[0025] Un dominio de unión a antígenos normalmente comprende la región variable de la cadena ligera (V_L) de un anticuerpo y la región variable de la cadena pesada (V_H) de un anticuerpo, no obstante, no tiene por qué contener necesariamente ambas. Por ejemplo, el fragmento de anticuerpo denominado Fd consta solamente de un dominio V_H, pero aun así retiene parte de la función de unión al antígeno del anticuerpo intacto.

[0026] El término "repertorio" se refiere a una colección de nucleótidos genéticamente variada derivada completa o parcialmente de secuencias que codifican inmunoglobulinas expresadas. Las secuencias se generan mediante el reordenamiento *in vivo* de, por ejemplo, los segmentos V, D, y J de las cadenas H y, por ejemplo, los segmentos V y J de las cadenas L. Alternativamente, las secuencias se pueden generar a partir de una línea celular mediante estimulación *in vitro*, en respuesta a la cual se produce el reordenamiento. Alternativamente, parte o todas las secuencias se pueden obtener combinando, por ejemplo, segmentos V no reordenados con segmentos D y J, mediante síntesis de nucleótidos, mutagénesis aleatoria, y otros procedimientos, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. N° 5.565.332.

[0027] Las expresiones "interacción específica" y "unión específica" se refieren a dos moléculas que forman un complejo que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. La unión específica se caracteriza por una afinidad elevada y una capacidad de baja a moderada, a diferencia de la unión no específica que normalmente tiene una baja afinidad con una capacidad de moderada a alta. Normalmente, la unión se considera específica cuando la constante de afinidad K_A es superior a 10⁶ M⁻¹, o más preferentemente superior a 10⁸ M⁻¹. Si fuera necesario, la unión no específica se puede reducir sin afectar sustancialmente a la unión específica variando las condiciones de unión. El facultativo experto puede optimizar las condiciones de unión apropiadas tales como la concentración de anticuerpos, la fuerza iónica de la disolución, la temperatura, el tiempo que se deja para la unión, la concentración de agente de bloqueo (por ejemplo, seroalbúmina, caseína de la leche), etc., usando técnicas rutinarias. Condiciones ilustrativas se detallan en los Ejemplos 1, 2, 4, 6, y 7.

[0028] La frase "sustancialmente como se establece" significa que los dominios CDR, V_H o V_L pertinentes de la invención serán idénticos o presentan únicamente diferencias irrelevantes en las regiones especificadas (por

ejemplo, una CDR), a la secuencia a partir de la cual se establecen. Diferencias irrelevantes incluyen cambios mínimos en los aminoácidos, tales como sustituciones de 1 ó 2 entre 5 aminoácidos cualesquiera en la secuencia de una región específica.

5 **[0029]** El término "actividad de PD-1" se refiere a una o más actividades inmunorreguladoras asociadas a PD-1. Por ejemplo, PD-1 es un regulador negativo de la respuesta inmunitaria mediada por TcR/CD28. En los Ejemplos 8, 9, y 10 se describen procedimientos para valorar la actividad *in vivo* e *in vitro* de PD-1.

10 **[0030]** Los términos "modular", "inmunomodulador" y sus cognados se refieren a una reducción o un incremento en la actividad de PD-1 asociada a la regulación por defecto de la respuesta de células T debido a su interacción con un anticuerpo contra PD-1, donde la reducción o el incremento es relativo a la actividad de PD-1 en ausencia del mismo anticuerpo. Una reducción o un incremento de la actividad es de, preferentemente, al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o superior aproximadamente. Cuando se reduce la actividad de PD-1, los términos "modulador" y "modular" se pueden intercambiar con los términos "inhibitorio" e "inhibir". Cuando se incrementa la actividad de PD-1, los términos "modulador" y "modular" se pueden intercambiar con los términos "activante" y "activar". La actividad de PD-1 se puede determinar cuantitativamente usando ensayos de proliferación de células T como se describe en los Ejemplos 8 y 9.

20 **[0031]** Las expresiones "tratamiento" y "procedimiento terapéutico" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas/preventivas. Los sujetos que necesitan tratamiento pueden incluir individuos que ya presentan un trastorno médico particular así como aquellos que en última instancia pueden contraer la enfermedad (es decir, aquellos que necesitan medidas preventivas).

25 **[0032]** La expresión "cantidad eficaz" se refiere a una dosificación o cantidad que es suficiente para reducir la actividad de PD-1 hasta que se produzca una mejora de los síntomas en un paciente o se consiga un resultado biológico deseado como por ejemplo, el incremento de la actividad citolítica de las células T, la inducción de tolerancia inmunitaria, la reducción o el incremento de la actividad de PD-1 asociada a la regulación negativa de la respuesta inmunitaria mediada por células T, etc.

30 **[0033]** El término "aislado" se refiere a una molécula que se encuentra sustancialmente exenta de su entorno natural. Por ejemplo, una proteína aislada está sustancialmente exenta de material celular u otras proteínas procedentes de la célula o la fuente tisular de la cual procede. El término "aislado" también se refiere a preparaciones en las que la proteína aislada está suficientemente pura para que se pueda administrar en forma de composición farmacéutica, o al menos un 70 -80% (p/p) pura, más preferentemente al menos un 80-90% (p/p) pura, incluso más preferentemente, un 90-95% pura; y lo más preferentemente, al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% (p/p) pura.

Anticuerpos contra PD-1

40 **[0034]** La descripción proporciona anticuerpos contra PD-1 que comprenden nuevos fragmentos de unión a antígenos.

45 **[0035]** En general, los anticuerpos se pueden preparar, por ejemplo, usando técnicas de hibridoma tradicionales (Kohler y Milstein (1975) *Nature*, 256: 495-499), procedimientos de ADN recombinante (patente de EE.UU. Nº 4.816.567), o presentación de fagos llevada a cabo con librerías de anticuerpos (Clackson y col. (1991) *Nature*, 352: 624-628; Marks y col. (1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597). Para otras técnicas de producción de anticuerpos, véase también *Antibodies: A Laboratory Manual*, eds. Harlow y col., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. La invención no está limitada a ninguna fuente, especie de origen, o procedimiento de producción particular.

50 **[0036]** Los anticuerpos intactos, también conocidos como inmunoglobulinas, normalmente son proteínas glicosiladas tetraméricas compuestas de dos cadenas ligeras (L) de 25 kDa aproximadamente y dos cadenas pesadas (H) de 50 kDa aproximadamente cada una. En los anticuerpos se encuentran dos tipos de cadena ligera, denominadas cadena λ y cadena κ . Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de las cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a cinco clases principales: A, D, E, G, y M, y algunas de éstas se pueden dividir a su vez en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, e IgA₂.

60 **[0037]** Las estructuras subunitarias y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas en la materia. Para una revisión de la estructura de los anticuerpos, véase Harlow y col., *supra*. En resumen, cada cadena ligera está compuesta de un dominio variable N-terminal (V_L) y un dominio constante (C_L). Cada cadena pesada está compuesta de un dominio variable N-terminal (V_H), tres o cuatro dominios constantes (C_H), y una región bisagra. El dominio C_H más próximo a V_H se denomina C_H1. Los dominios V_H y V_L constan de cuatro regiones con una secuencia relativamente conservada denominadas regiones marco (FR1,

FR2, FR3, y FR4), que forman el andamio para tres regiones de secuencia hipervariable denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDRs). Las CDRs contienen la mayoría de restos responsables de las interacciones específicas con el antígeno. Las tres CDRs se denominan CDR1, CDR2, y CDR3. Los constituyentes de las CDR de la cadena pesada se denominan H1, H2, y H3, mientras que los constituyentes de las CDR de la cadena ligera se denominan, por tanto, L1, L2, y L3. CDR3 y, particularmente H3, son la fuente principal de diversidad molecular dentro del dominio de unión al antígeno. Por ejemplo, H3 puede constar de sólo dos restos aminoácidos o contener más de 26.

[0038] El fragmento Fab (fragmento de unión al antígeno) consta de los dominios V_H-C_{H1} y V_L-C_L unidos covalentemente por un enlace disulfuro entre las regiones constantes. Para vencer la tendencia de los dominios V_H y V_L no unidos covalentemente en la Fv a disociarse cuando se expresan simultáneamente en una célula hospedadora, se puede construir el denominado fragmento Fv de cadena sencilla (sc), fragmento scFv. En un scFv, un polipéptido flexible y convenientemente largo que une el C-término de la V_H al N-término de la V_L o el C-término de la V_L al N-término de la V_H . Más habitualmente, se usa un péptido $(Gly_4Ser)_3$ de 15 restos como enlazador, pero en la materia también se conocen otros enlazadores.

[0039] La diversidad de los anticuerpos es el resultado del ensamblaje combinatorio de múltiples genes de la línea germinal que codifican regiones variables y una variedad de eventos somáticos. Los eventos somáticos incluyen la recombinación de segmentos génicos variables con segmentos génicos de diversidad (D) y de unión (J) para producir una región V_H completa y la recombinación de segmentos génicos variables y de unión para producir una región V_L completa. El proceso de recombinación es impreciso en sí mismo, dando como resultado la pérdida o adición de aminoácidos en las uniones V(D)J. Estos mecanismos de diversidad se producen en las células B en desarrollo antes de la exposición a antígenos. Después de la estimulación antigénica, los genes de los anticuerpos expresados en las células B experimentan una mutación somática.

[0040] Basándose en el número estimado de segmentos génicos de la línea germinal, con la recombinación aleatoria de estos segmentos, y el apareamiento aleatorio de V_H-V_L , se pueden producir hasta $1,6 \times 10^7$ anticuerpos diferentes (Fundamental Immunology, 3rd ed., ed. Paul, Raven Press, Nueva York, NY, 1993). Cuando se tienen en cuenta otros procesos que contribuyen a la diversidad de los anticuerpos (tal como la mutación somática), se piensa que potencialmente se pueden generar por encima de 1×10^{10} anticuerpos diferentes (Immunoglobulin Genes, 2nd ed., eds. Jonio y col., Academic Press, San Diego, CA, 1995). Debido a los numerosos procesos involucrados en la diversidad de los anticuerpos, es altamente improbable que anticuerpos generados de manera independiente tengan una secuencia de aminoácidos idéntica o incluso sustancialmente similar en las CDRs.

[0041] La descripción proporciona nuevas CDRs procedentes de librerías génicas de inmunoglobulinas humanas. La estructura que lleva una CDR generalmente será una cadena pesada o ligera de un anticuerpo o una parte de las mismas, en la que la CDR está localizada en el sitio correspondiente a la CDR de las V_H y V_L de origen natural. Las estructuras y localizaciones de los dominios variables de las inmunoglobulinas se pueden determinar, por ejemplo, como se describe en Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, No. 91-3242, National Institutes of Health Publications, Bethesda, MD, 1991.

[0042] El ADN y las secuencias de aminoácidos de anticuerpos contra PD-1, su fragmento scFv, los dominios V_H y V_L , y las CDRs se exponen en el Listado de secuencias y se enumeran en forma de lista en la Tabla 1. Formas de realización ilustrativas no limitantes particulares de los anticuerpos se denominan PD1-17, PD1-28, PD1-33, PD1-35, y PD1-F2. Las posiciones de cada CDR dentro de los dominios V_H y V_L de las formas de realización ilustrativas se listan en las Tablas 2 y 3.

Tabla 1: ADN y secuencias de aminoácidos (AA) de los dominios V_H y V_L y las CDRs

Secuencia	PD1-17	PD1-28	PD1-33	PD1-35	PD1-F2
V_H ADN	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 46
V_H AA	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 47
V_L ADN	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 48
V_L AA	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 16	SEQ 10 NO:49
H1 AA	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 35	SEQ 10 NO:50
H2 AA	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 36	SEQ 10 NO:51
H3 AA	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 37	SEQ 10 NO:52
L1AA	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 53
L2 AA	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 54
L3 AA	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 55

Tabla 2: Posiciones de las CDRs en las cadenas pesadas

CDR	PD1-17 SEQ ID NO: 2	PD1-28 SEQ ID NO: 6	PD1-33 SEQ ID NO: 10	PD1-35 SEQ ID NO: 14	PD1-F2 SEQ ID NO: 47
H1	31-42	31-35	31-35	31-37	34-42
H2	57-72	50-66	50-66	52-67	57-73
H3	105-117	99-108	99-108	100-116	106-114

Tabla 3: Posiciones de las CDRs en las cadenas ligeras

CDR	PD1-17 SEQ ID NO: 4	PD1-28 SEQ ID NO: 8	PD1-33 SEQ ID NO: 12	PD1-35 SEQ ID NO: 16	PD1-F2 SEQ ID NO: 49
L1	23-35	23-33	23-36	23-35	28-35
L2	51-57	49-55	52-58	51-57	54-61
L3	92-100	88-98	91-102	90-100	94-101

5

[0043] Los anticuerpos contra PD-1 opcionalmente pueden comprender regiones constantes del anticuerpo o partes de las mismas. Por ejemplo, un dominio V_L puede tener unido, en su C-término, dominios constantes de la cadena ligera del anticuerpo, incluyendo las cadenas C_k o C_λ . De manera similar, un dominio de unión al antígeno específico basado en un dominio V_H puede tener unido toda o parte de una cadena pesada de la inmunoglobulina derivada de cualquier isótopo de un anticuerpo, por ejemplo, IgG, IgA, IgE, y IgM y cualquiera de las subclases isotípicas, que incluyen pero no están limitadas a, IgG₁ e IgG₄. En las formas de realización de ejemplo, PD1-17, PD1-28, PD1-33, y PD1-35, los anticuerpos comprenden fragmentos C-terminales de las cadenas ligera y pesada de la IgG_{1k} humana, mientras que PD1-F2 comprende fragmentos C-terminales de las cadenas ligera y pesada de la IgG_{1k} humana. El ADN y las secuencias de aminoácidos para el fragmento C-terminal son muy conocidos en la materia (véase, por ejemplo, Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, No. 91-3242, National Institutes of Health Publications, Bethesda, MD, 1991). Secuencias de ejemplo no limitantes se exponen en la Tabla 4.

Tabla 4

Región C-terminal	ADN	Aminoácido
Cadena pesada de IgG1	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 45
Cadena ligera λ	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 43
Cadena ligera κ	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 58

[0044] Ciertas formas de realización comprenden un dominio V_H y/o V_L de un fragmento Fv procedente de PD1-17, PD1-28, PD1-33, PD1-35, y PD1-F2. Formas de realización adicionales comprenden al menos una CDR de cualquiera de estos dominios V_H y V_L . Los anticuerpos, que comprenden al menos una de las secuencias de las CDR expuestas en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NOs: 16-40, SEQ ID NO: 47, o SEQ ID NO: 49 están comprendidos dentro del alcance de esta invención. Una forma de realización, por ejemplo, comprende un fragmento H3 del dominio V_H de anticuerpos seccionados a partir de al menos uno de PD1-17, PD1-28, PD1-33, PD1-35, y PD1-F2.

[0045] En ciertas formas de realización, los dominios V_H y/o V_L se pueden convertir a la línea germinal, es decir, las regiones marco (FRs) de estos dominios se mutan usando técnicas de biología molecular convencionales para emular a los producidos por las células de la línea germinal. En otras formas de realización, las secuencias marco permanecen divergentes de las secuencias de la línea germinal consenso.

[0046] En ciertas formas de realización, los anticuerpos se unen específicamente a un epítipo dentro del dominio extracelular del PD-1 humano. El dominio extracelular predicho consta de una secuencia de entre 21 aminoácidos aproximadamente y 170 aminoácidos aproximadamente de la SEQ ID NO: 41 (N° de acceso de Swissport Q15116). En ciertas formas de realización, los anticuerpos se unen específicamente a un epítipo dentro del dominio extracelular del PD-1 de ratón, con una afinidad superior a $10^7 M^{-1}$, y preferentemente superior a $10^8 M^{-1}$. La secuencia de aminoácidos del PD-1 de ratón se expone en la SEQ ID NO: 56 (N° de acceso NM_008798) y es en su conjunto idéntica en un 60% aproximadamente a su homólogo humano. En formas de realización adicionales, los anticuerpos de la invención se unen al dominio de unión PD-L de PD-1.

[0047] También está contemplado que los anticuerpos de la invención se puedan unir a otras proteínas, incluyendo, por ejemplo, proteínas recombinantes que comprenden todo o una porción del dominio extracelular de PD-1.

45

[0048] La persona con conocimientos ordinarios en la materia reconocerá que los anticuerpos de esta invención se pueden usar para detectar, medir, e inhibir proteínas que difieran algo de PD-1. Se espera que los

anticuerpos retengan la especificidad de unión siempre que la proteína diana comprenda una secuencia que sea al menos un 60%, 70%, 80%, 90%, 95% idéntica aproximadamente, o superior, a cualquier secuencia de al menos 100, 80, 60, 40, ó 20 aminoácidos contiguos en la secuencia expuesta SEQ ID NO: 41. El porcentaje de identidad se determina mediante algoritmos de alineamiento habituales tales como, por ejemplo, Basic Local Alignment Tool (BLAST) descrito en Altshul y col. (1990) *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410, el algoritmo de Needleman y col. (1970) *J. Mol. Biol.*, 48: 444-453, o el algoritmo de Meyers y col. (1988) *Comput. Appl. Biosci.*, 4: 11-17.

[0049] Además de los análisis de homología de secuencia, se puede llevar a cabo el mapeo de epítomos (véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols*, ed. Morris, Humana Press, 1996) y análisis de la estructura secundaria y terciaria para identificar estructuras tridimensionales específicas asumidas por los anticuerpos descritos y sus complejos con antígenos. Dichos procedimientos incluyen, pero no están limitados a, cristalografía con rayos X (Engstrom (1974) *Biochem. Exp. Biol.*, 11:7-13) y modelización por ordenador de representaciones virtuales de los anticuerpos descritos en el presente documento (Fletterick y col. (1986) *Computer Graphics and Molecular Modeling*, en *Current Communications in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Derivados

[0050] Esta descripción también proporciona un procedimiento para la obtención de un anticuerpo específico para PD-1. Las CDRs en dichos anticuerpos no están limitadas a las secuencias específicas de V_H y V_L identificadas en la Tabla 1 y pueden incluir variantes de estas secuencias que retengan la capacidad para unirse específicamente a PD-1. Dichas variantes se pueden obtener a partir de las secuencias listadas en la Tabla 1 por el facultativo experto usando técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones, eliminaciones, o adiciones de aminoácidos en las FRs y/o en las CDRs. A pesar de que normalmente los cambios en las FRs están diseñados para mejorar la estabilidad e inmunogenicidad del anticuerpo, los cambios en las CDRs normalmente están diseñados para incrementar la afinidad del anticuerpo por su diana. Las variantes de las FRs también incluyen alotipos de inmunoglobulinas de origen natural. Dichos cambios que incrementan la afinidad se pueden determinar empíricamente mediante técnicas rutinarias que suponen la alteración de la CDR y la comprobación de la afinidad del anticuerpo por su diana. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones conservativas de aminoácidos dentro de cualquiera de las CDRs descritas. Se pueden introducir diversas alteraciones según los procedimientos descritos en *Antibody Engineering*, 2nd ed., Oxford University Press, ed. Borrebaeck, 1995. Éstas incluyen, pero no están limitados a, secuencias de nucleótidos que están alteradas por la sustitución de diferentes codones que codifican un resto aminoácido funcionalmente equivalente dentro de la secuencia, produciendo así un cambio "silencioso". Por ejemplo, los aminoácidos no polares incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano, y metionina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina, e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Los sustitutos para un aminoácido dentro de la secuencia se pueden seleccionar entre otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido (véase Tabla 5). Además, cualquier resto nativo en el polipéptido también se puede sustituir con alanina (véase, por ejemplo, MacLennan y col. (1998) *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 643:55-67; Sasaki y col. (1998) *Adv. Biophys.* 35:1-24).

[0051] Los derivados y análogos de anticuerpos de la invención se pueden producir mediante diversas técnicas muy conocidas en la materia, incluyendo procedimientos sintéticos y recombinantes (Maniatis (1990) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, y Bodansky y col. (1995) *The Practice of Peptide Synthesis*, 2nd ed., Springer Verlag, Berlín, Alemania).

Tabla 5

Restos originales	Substituciones de ejemplos	Substituciones típicas
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Ácido 1,4-diamino-butírico, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Gly
Ser (S)	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

[0052] En una forma de realización, un procedimiento para la preparación de un dominio V_H que es una variante de una secuencia de aminoácidos de un dominio V_H de la invención comprende una etapa de adición, eliminación, sustitución, o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del dominio V_H descrito en el presente documento, opcionalmente la combinación del dominio V_H así producido con uno o más dominios V_L , y someter a prueba el dominio V_H o la combinación o combinaciones V_H/V_L para una unión específica a PD-1 y/o, opcionalmente, someter a prueba la capacidad de dicho dominio de unión al antígeno para modular la actividad de PD-1. El dominio V_L puede tener una secuencia de aminoácidos que sea idéntica o sustancialmente como la expuesta en la Tabla 1.

[0053] Se puede emplear un procedimiento análogo en el que una o más variantes de secuencia de un dominio V_L descrito en el presente documento se combinan con uno o más dominios V_H .

[0054] Un aspecto adicional de la descripción proporciona un procedimiento de preparación de un fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a PD-1. El procedimiento comprende:

(a) el suministro de un repertorio de ácidos nucleicos de partida que codifican un dominio V_H que incluye una CDR3 a reemplazar o carece de una región que codifica CDR3;

(b) la combinación del repertorio con un ácido nucleico donador que codifica una secuencia de aminoácidos sustancialmente como la expuesta en el presente documento para una CDR3 de V_H (es decir, H3) de manera que el ácido nucleico donador se inserte dentro de la región CDR3 en el repertorio, para así proporcionar un repertorio producto de ácidos nucleicos que codifican un dominio V_H ;

(c) la expresión de los ácidos nucleicos del repertorio producto;

(d) la selección de un fragmento de unión específico para PD-1; y

(e) la recuperación del fragmento de unión específico o del ácido nucleico que lo codifica.

[0055] De nuevo, se puede emplear un procedimiento análogo en el que una CDR3 de V_L (es decir, L3) de la invención se combina con un repertorio de ácidos nucleicos que codifican un dominio V_L , que incluye una CDR3 a reemplazar o carece de una región que codifica CDR3. El ácido nucleico donador se puede seleccionar entre ácidos nucleicos que codifican una secuencia de aminoácidos sustancialmente como la expuesta en la SEQ ID NO: 17-40 o SEQ ID NO: 50-55.

[0056] Se puede introducir una secuencia que codifica una CDR de la invención (por ejemplo, CDR3) en un repertorio de dominios variables que carecen de las respectivas CDR (por ejemplo, CDR3), usando tecnología de ADN recombinante, por ejemplo, usando la metodología descrita por Marks y col. (Bio/Technology (1992) 10: 779-

783). En particular, se pueden usar cebadores consenso dirigidos a o adyacentes al extremo 5' del área del dominio variable junto con cebadores consenso para la tercera región marco de los genes V_H humanos para proporcionar un repertorio de dominios variables de V_H que carecen de una CDR3. El repertorio se puede combinar con una CDR3 de un anticuerpo particular. Usando técnicas análogas, las secuencias derivadas de CDR3 se pueden combinar aleatoriamente con repertorios de dominios V_H o V_L que carecen de una CDR3, y los dominios V_H o V_L combinados aleatoriamente completos se pueden combinar con un dominio V_H o V_L cognado para preparar los anticuerpos específicos de PD-1 de la invención. A continuación el repertorio se puede presentar en un sistema hospedador adecuado tal como el sistema de presentación de fagos como se describe en el documento WO 92/01047 de manera que se puedan seleccionar fragmentos de unión al antígeno adecuados.

10

[0057] También han sido descritas técnicas combinatorias o de combinación aleatoria análogas por Stemmer (Nature (1994) 370: 389-391), quien describe la técnica en relación con un gen β -lactamasa, pero hace la observación de que esta aproximación se puede usar para la generación de anticuerpos.

15 **[0058]** En formas de realización adicionales, se pueden generar nuevas regiones V_H o V_L que portan una o más secuencias derivadas de las secuencias descritas en el presente documento usando mutagénesis aleatoria de uno o más genes V_H y/o V_L seleccionados. Una de esas técnicas, la PCR propensa a errores, ha sido descrita por Gram y col. (Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. (1992) 89: 3576-3580).

20 **[0059]** Otro procedimiento que se puede usar sirve para dirigir la mutagénesis a CDRs de genes V_H o V_L . Dichas técnicas han sido descritas por Barbas y col. (Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. (1994) 91: 3809-3813) y Schier y col. (J. Mol. Biol. (1996) 263: 551-567).

[0060] De manera similar, una o más, o las tres CDRs se pueden injertar en un repertorio de dominios V_H o V_L , que a continuación se someten a selección para un fragmento de unión al antígeno específico para PD-1.

[0061] Una fracción de un dominio variable de la inmunoglobulina comprenderá al menos una de las CDRs sustancialmente como se expone en el presente documento y, opcionalmente, regiones marco interpuestas procedentes de los fragmentos scFV como se expone en el presente documento. La porción puede incluir al menos el 50% aproximadamente de cualquiera o de ambas FR1 y FR4, siendo el 50% en el 50% C-terminal de FR1 y el 50% N-terminal de FR4. Restos adicionales en los extremos N-terminal o C-terminal de la parte sustancial del dominio variable pueden ser aquellos normalmente no asociados a las regiones del dominio variable de origen natural. Por ejemplo, la construcción de anticuerpos mediante técnicas de ADN recombinante puede dar como resultado la introducción de restos N- o C-terminales codificados por enlazadores introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Estas otras etapas de manipulación incluyen la introducción de enlazadores para unir dominios variables a secuencias proteicas adicionales que incluyen las regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulinas, otros dominios variables (por ejemplo, en la producción de diacuerpos), o marcadores proteináceos como se describe con mayor detalle a continuación.

40 **[0062]** Aunque las formas de realización ilustradas en los ejemplos comprenden un par de "acoplamiento" de los dominios V_H y V_L , la persona experta reconocerá que formas de realización alternativas pueden comprender fragmentos de unión a antígenos que contengan solamente una única CDR de cualquiera de los dominios V_L o V_H . Se puede usar uno cualquiera de los dominios de unión específicos de cadena sencilla para seleccionar dominios complementarios capaces de formar un fragmento de unión a antígenos específico de dos dominios capaz de, por ejemplo, unirse a PD-1. La selección se puede conseguir mediante procedimientos de selección con presentación de fagos usando la denominada aproximación jerárquica combinatoria dual descrita en el documento WO 92/01047, en la que una colonia individual que contiene un clon de cualquiera de las cadenas H o L se usa para infectar una librería completa de clones que codifican la otra cadena (L o H) y el dominio de unión específico de dos cadenas resultante se selecciona de acuerdo con las técnicas de presentación de fagos según se ha descrito.

50

[0063] Los anticuerpos contra PD1 descritos en el presente documento se pueden unir a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (albúmina, otro anticuerpo, etc.), toxina, radioisótopo, agentes citotóxicos o citostáticos. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden unir por reticulamiento químico o procedimientos recombinantes. Los anticuerpos también se pueden unir a un polímero de una variedad de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, o polioxialquilenos, de la forma expuesta en las patentes de EE.UU. N° 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192; o 4.179.337. Los anticuerpos se pueden modificar químicamente por conjugación covalente a un polímero, por ejemplo, para incrementar su semi-vida en circulación. Polímeros y procedimientos de ejemplos para unirlos también se muestran en las patentes de EE.UU. N° 4.766.106; 4.179.337; 4.495.285; y 4.609.546.

60

[0064] Los anticuerpos descritos también se pueden alterar para que presenten un patrón de glicosilación que difiera del patrón nativo. Por ejemplo, se puede eliminar uno o más restos carbohidrato y/o se puede añadir uno o

más sitios de glicosilación al anticuerpo original. La adición de los sitios de glicosilación a los anticuerpos descritos en el presente documento se puede conseguir alterando la secuencia de aminoácidos para que contengan secuencias consenso del sitio de glicosilación conocidas en la materia. Otros medios para incrementar el número de restos carbohidrato sobre los anticuerpos es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos a los restos de aminoácidos del anticuerpo. Dichos procedimientos se describen en el documento WO 87/05330 y en Aplin y col. (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., 22: 259-306. La eliminación de cualquier resto carbohidrato de los anticuerpos se puede conseguir química o enzimáticamente, por ejemplo, como ha sido descrito por Hakimuddin y col. (1987) Arch. Biochem. Biophys., 259: 52; y Edge y col. (1981) Anal. Biochem., 118: 131 y por Thotakura y col. (1987) Meth. Enzymol., 138: 350. Los anticuerpos también se pueden marcar con un marcador detectable, o funcional. Los marcadores detectables incluyen radiomarcadores tales como ^{131}I o ^{99}Tc , que también se pueden unir a los anticuerpos usando la química convencional. Los marcadores detectables también incluyen marcadores enzimáticos tales como peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina. Los marcadores detectables además incluyen restos químicos tales como biotina, que se puede detectar mediante la unión a un resto cognado específico detectable, por ejemplo, avidina marcada.

Los anticuerpos en los que las secuencias de las CDR difieren sólo de manera irrelevante de las expuestas en las SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NOS: 16-40, SEQ ID NO: 47, o SEQ ID NO: 49 están englobados dentro del alcance de esta invención. Normalmente, un aminoácido es sustituido por un aminoácido relacionado que tenga una carga, una hidrofobicidad, o unas características estereoquímicas similares. Dichas sustituciones están dentro de las competencias de la persona con conocimientos ordinarios en la materia. A diferencia de las CDRs, en las FRs se pueden introducir cambios más sustanciales sin que afecten de manera adversa a las propiedades de unión de un anticuerpo. Los cambios en las FRs incluyen, pero no están limitados a, la humanización de residuos derivados no humanos o la manipulación genética de ciertos residuos marco que son importantes para el contacto con el antígeno o para la estabilización del sitio de unión, por ejemplo, cambiando la clase o subclase de la región constante, cambiando restos de aminoácidos específicos que podrían alterar la función efectora como la unión del receptor Fc, por ejemplo, como se describe en las patentes de EE.UU. N° 5.624.821 y 5.648.260 y Lund y col. (1991) J. Immun. 147: 2657-2662 y Morgan y col. (1995) Immunology 86: 319-324, o cambiando las especies de la que procede la región constante.

30 Ácidos nucleicos, clonación y sistemas de expresión

[0066] La presente descripción proporciona adicionalmente ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos descritos. Los ácidos nucleicos pueden comprender ADN o ARN y pueden ser completa o parcialmente sintéticos o recombinantes. La referencia a una secuencia de nucleótidos como se expone en el presente documento comprende una molécula de ADN con la secuencia especificada, y comprende una molécula de ARN con la secuencia especificada en la que el U es sustituido por T, a menos que el contexto requiera otra cosa.

[0067] Los ácidos nucleicos proporcionados en el presente documento comprenden una secuencia codificante para una CDR, un dominio V_H , y/o un dominio V_L descrito en el presente documento.

[0068] La presente descripción también proporciona construcciones en forma de plásmidos, vectores, fagémidos, casetes de transcripción o de expresión que comprenden al menos un ácido nucleico que codifica una CDR, un dominio V_H , y/o un dominio V_L descrito en el presente documento.

[0069] La descripción proporciona adicionalmente una célula hospedadora que comprende una o más construcciones como anteriormente.

[0070] Además se proporcionan ácidos nucleicos que codifican cualquier CDR (H1, H2, H3, L1, L2, o L3), un dominio V_H o V_L , así como procedimientos de preparación de los productos codificados. El procedimiento comprende la expresión del producto codificado a partir del ácido nucleico codificante. La expresión se puede conseguir mediante el cultivo de células hospedadoras recombinantes que contienen el ácido nucleico en condiciones adecuadas. Después de la producción mediante la expresión de un dominio V_H o V_L , o de un miembro de unión específico, se pueden aislar y/o purificar usando cualquier técnica adecuada, y a continuación se pueden utilizar según sea apropiado.

[0071] Los fragmentos de unión al antígeno, los dominios V_H y/o V_L , y las moléculas de ácidos nucleicos codificantes y vectores se pueden aislar y/o purificar de su entorno natural, en forma sustancialmente pura u homogénea, o en el caso de ácidos nucleicos, exentos o sustancialmente exentos de ácidos nucleicos o genes de origen distinto al de la secuencia que codifica un polipéptido con la función requerida.

[0072] Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de células hospedadoras

diferentes son muy conocidos en la materia. Para células adecuadas para la producción de anticuerpos, véase Gene Expression Systems, Academic Press, eds. Fernandez y col., 1999. En resumen, las células hospedadoras adecuadas incluyen bacterias, células vegetales, células de mamífero, y sistemas de levaduras y baculovirus. Las líneas celulares de mamíferos disponibles en la materia para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen

5 células de ovario de hámster chino, células HeLa, células de riñón de cría de hámster, células de mieloma de ratón NS0, y muchas otras. Un hospedador bacteriano habitual es *E. coli*. Se puede usar cualquier sistema de expresión de proteínas compatible con la invención para producir los anticuerpos descritos. Los sistemas de expresión adecuados incluyen animales transgénicos descritos en Gene Expression Systems, Academic Press, eds. Fernandez y col., 1999.

10

[0073] Se pueden seleccionar o construir vectores adecuados, de manera que contengan secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea necesario. Los vectores pueden ser plásmidos o víricos, por ejemplo, fagos, o fagémidos, según sea adecuado. Para detalles adicionales véase, por ejemplo, Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácidos nucleicos, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen en detalle en Current Protocols in Molecular Biology, 2nd Edition, eds. Ausubel y col., John Wiley & Sons, 1992.

20

[0074] Un aspecto adicional de la descripción proporciona una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico como se describe en el presente documento. Otro aspecto más proporciona un procedimiento que comprende la introducción de dicho ácido nucleico en una célula hospedadora. Para la introducción se puede emplear cualquier técnica disponible. Para células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir la transfección con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción usando retrovirus u otros virus, por ejemplo, el virus de la vacuna o, para células de insecto, baculovirus. Para células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir la transformación con cloruro de calcio, la electroporación y la transfección usando bacteriófagos. La introducción del ácido nucleico en las células se puede seguir provocando o permitiendo la expresión del ácido nucleico, por ejemplo, cultivando células hospedadoras en condiciones para la

30

Procedimientos de uso

[0075] Los anticuerpos contra PD-1 descritos son capaces de modular la regulación por defecto de las respuestas inmunitarias asociadas a PD-1. En formas de realización particulares, la respuesta inmunitaria está mediada por TcR/CD28. Los anticuerpos descritos pueden actuar como agonistas o antagonistas de PD-1, dependiendo de su procedimiento de uso. Los anticuerpos se pueden usar para prevenir, diagnosticar, o tratar trastornos médicos en mamíferos, especialmente en seres humanos. Los anticuerpos de la invención también se pueden usar para aislar PD-1 o células que expresan PD-1. Además, los anticuerpos se pueden usar para tratar a un sujeto en riesgo de contraer o susceptible a un trastorno o con un trastorno asociado a la expresión o función aberrante de PD-1.

40

[0076] Los anticuerpos de la invención se pueden usar en procedimientos para la inducción de tolerancia a un antígeno específico (por ejemplo, una proteína terapéutica). En una forma de realización, se induce tolerancia contra un antígeno específico mediante la administración simultánea del antígeno y un anticuerpo contra PD-1 de la invención. Por ejemplo, pacientes que han recibido el Factor VIII frecuentemente generan anticuerpos contra esta proteína; la administración simultánea de un anticuerpo contra PD-1 de la invención en combinación con Factor VIII recombinante se espera que dé como resultado la regulación por defecto de las respuestas inmunitarias a este factor de coagulación.

50

[0077] Los anticuerpos de la invención se pueden usar en circunstancias en las que pueda ser deseable una reducción en el nivel de respuesta inmunitaria, por ejemplo, en ciertos tipos de alergia o reacciones alérgicas (por ejemplo, mediante la inhibición de la producción de IgE), enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo, artritis reumatoide, diabetes mellitus tipo I, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico), rechazo al trasplante de tejidos, piel y órganos, y enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD).

55

[0078] Cuando se desea una respuesta inmunitaria disminuida, los anticuerpos contra PD-1 de la invención se pueden usar como agonistas de PD-1 con el fin de potenciar la atenuación de la respuesta inmunitaria asociada a PD-1. En estas formas de realización, son necesarias la presentación simultánea y proximidad física entre señales positivas (es decir, mediadas por un receptor antigénico, por ejemplo, TcR o BcR) y negativas (es decir, PD-1). La distancia preferida es inferior o comparable al tamaño de una célula presentadora de antígenos de origen natural, es

60

decir, inferior a 100 μm aproximadamente; más preferentemente inferior a 50 μm aproximadamente; y lo más preferentemente inferior a 20 μm aproximadamente.

[0079] En algunas formas de realización, las señales positivas (activadoras) y negativas (inhibidoras) son proporcionadas por un ligando o anticuerpos inmovilizados sobre una matriz de soporte sólido, o un portador. En diversas formas de realización, la matriz de soporte sólido puede estar compuesta de un polímero como agarosa activada, dextrano, celulosa, fluoruro de polivinilideno (PVDF). Alternativamente, la matriz de soporte sólido puede estar basada en sílice o polímeros de plástico, por ejemplo, nailon, dacrón, poliestireno, poliacrilatos, polivinilos, teflones, etc.

[0080] La matriz se puede implantar en el bazo del paciente. Alternativamente, la matriz se puede usar para la incubación *ex vivo* de células T obtenidas de un paciente, que a continuación se separan y se implantan de nuevo en el paciente. La matriz también puede estar compuesta de un material biodegradable tal como ácido poliglicólico, polihidroxialcanoato, colágeno, o gelatina de manera que se pueda inyectar en la cavidad peritoneal del paciente, y disolverse después de algún tiempo tras la inyección. El vehículo se puede moldear para mimetizar una célula (por ejemplo, una cuenta o microesfera).

[0081] En algunas formas de realización, la señal positiva se proporciona por medio de un anticuerpo contra CD3 que activa las células T, que se une a TcR. La activación de anticuerpos contra CD3 es muy conocida en la materia (véanse, por ejemplo, patentes de EE.UU. N° 6.405.696 y 5.316.763). La relación entre la señal TcR de activación y la señal PD-1 negativa se determina experimentalmente usando procedimientos convencionales conocidos en la materia o como se describe en los Ejemplos 8, 9 y 10.

[0082] En ciertas circunstancias, puede ser deseable desencadenar o potenciar la respuesta inmunitaria de un paciente con el fin de tratar un trastorno inmunitario o cáncer. Los trastornos a tratar o prevenir con los procedimientos descritos incluyen, pero no están limitados a, infecciones por microbios (por ejemplo, bacterias), virus (por ejemplo, infecciones víricas sistémicas tales como gripe, enfermedades víricas cutáneas tales como herpes o culebrilla), o parásitos; y cáncer (por ejemplo, melanoma y cánceres de próstata).

[0083] La estimulación de la activación de las células T con anticuerpos contra PD-1 potencia las respuestas de las células T-T. En tales casos, los anticuerpos actúan como antagonistas de PD-1. Así, en algunas formas de realización, los anticuerpos se pueden usar para inhibir o reducir la actividad reguladora por defecto asociada a PD-1, es decir, la actividad asociada a la regulación por defecto de la respuesta inmunitaria mediada por TcR/CD28. En estas formas de realización, los anticuerpos no están acoplados a una señal positiva como la estimulación mediada por TcR, por ejemplo, los anticuerpos se encuentran en su forma soluble no unida a un soporte. Como se demuestra en los Ejemplos, el bloqueo de la interacción PD-1/PDL con anticuerpos contra PD-1 antagonistas da lugar a respuestas proliferativas potenciadas de células T, consistentes con un papel regulador por defecto para la vía del PD-1 en interacciones T-T. En diversas formas de realización, los anticuerpos inhiben la unión de PD-L a PD-1 con una CI_{50} inferior a 10 nM y más preferentemente inferior a 5 nM, y lo más preferentemente inferior a 1 nM. La inhibición de la unión de PD-L se puede medir como se describe en el Ejemplo 6 o usando técnicas conocidas en la materia.

[0084] Los anticuerpos o composiciones de anticuerpos de la presente invención se administran en cantidades terapéuticamente eficaces. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar con la edad, condición, y sexo del paciente, así como la gravedad de la dolencia médica del sujeto. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo varía entre 0,001 aproximadamente y 30 mg/kg de peso corporal aproximadamente, preferentemente entre 0,01 aproximadamente y 25 mg/kg de peso corporal aproximadamente, entre 0,1 aproximadamente y 20 mg/kg de peso corporal aproximadamente, o entre 1 aproximadamente y 10 mg/kg de peso corporal aproximadamente. La dosificación se puede ajustar según sea necesario, para adaptarse a los efectos del tratamiento observados. La dosis apropiada la selecciona el facultativo que atiende basándose en indicaciones clínicas.

[0085] Los anticuerpos se pueden administrar como una dosis en bolo, para maximizar los niveles de anticuerpos en circulación durante el mayor tiempo posible después de la dosis. También se puede usar la infusión continua después de la dosis en bolo.

[0086] Las células inmunitarias (por ejemplo, células T, células B o monocitos activados) también se pueden aislar de un paciente y se pueden incubar *ex vivo* con anticuerpos de la invención. En algunas formas de realización, las respuestas inmunitarias se pueden inhibir retirando las células inmunitarias del sujeto, poniendo en contacto las células inmunitarias *in vitro* con un anticuerpo contra PD-1 de la invención simultáneamente con la activación de las células inmunitarias (por ejemplo, mediante anticuerpos para el receptor antigénico TcR y/o BcR). En dichas formas de realización, el anticuerpo contra PD-1 se debe usar de forma multivalente de manera que las moléculas de PD-1

sobre la superficie de una célula inmunitaria se "reticulan" tras la unión a dichos anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos contra PD-1 pueden estar unidos a un soporte sólido, tal como cuentas, o se pueden reticular a través de un anticuerpo secundario. A continuación las células inmunitarias se pueden aislar usando procedimientos conocidos en la materia y se pueden reimplantar en el paciente.

5

[0087] En otro aspecto, los anticuerpos de la invención se pueden usar como agentes diana para la administración de otro agente terapéutico o de un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) en una célula que expresa PD-1. El procedimiento incluye la administración de un anticuerpo contra PD-1 acoplado a un agente terapéutico o citotóxico o en condiciones que permitan la unión del anticuerpo a PD-1.

10

[0088] Los anticuerpos de la invención también se pueden usar para detectar la presencia de PD-1 en muestras biológicas. La cantidad de PD-1 detectado se puede relacionar con el nivel de expresión de PD-1, que a su vez, está relacionado con el estado de activación de las células inmunitarias (por ejemplo, células T, células B, y monocitos activados) del sujeto.

15

[0089] Los procedimientos de detección que emplean anticuerpos son muy conocidos en la materia e incluyen, por ejemplo, ELISA, radioinmunoensayo, inmunotransferencia, transferencia de Western, inmunofluorescencia, inmunoprecipitación. Los anticuerpos se pueden suministrar en un kit diagnóstico que incorpore una o más de estas técnicas para detectar PD-1. Dicho kit puede contener otros componentes, envases, instrucciones, u otros materiales que ayuden en la detección de la proteína.

20

[0090] Cuando los anticuerpos están destinados a fines diagnósticos, puede ser deseable modificarlos, por ejemplo, con un grupo ligando (como biotina) o un grupo marcador detectable (como un grupo fluorescente, un radioisótopo o una enzima). Si se desea, los anticuerpos de la invención se pueden marcar usando técnicas convencionales. Los marcadores detectables adecuados incluyen, por ejemplo, fluoróforos, cromóforos, átomos radiactivos, reactivos con densidad electrónica, enzimas, y ligandos con pares de unión específicos. Las enzimas normalmente se detectan por su actividad. Por ejemplo, la peroxidasa de rábano se puede detectar por su capacidad para convertir la tetrametilbencidina (TMB) en un pigmento azul, cuantificable con un espectrofotómetro. Para su detección, los pares de unión adecuados incluyen, pero no están limitados a, biotina y avidina o estreptavidina, IgG y proteína A, y los numerosos pares receptor-ligando conocidos en la materia. Otras permutaciones y posibilidades serán muy evidentes para aquellos con conocimientos ordinarios en la materia, y se consideran equivalentes dentro del alcance de la presente invención.

25

30

[0091] Los anticuerpos de la invención se pueden usar en procedimientos de selección para identificar inhibidores de la vía del PD-1 eficaces como agentes terapéuticos. En dicho ensayo de selección, se forma una primera mezcla de unión combinando PD-1 y un anticuerpo de la invención; y se mide la cantidad de unión en la primera mezcla de unión (M_0). También se forma una segunda mezcla de unión combinando PD-1, el anticuerpo, y el compuesto o agente a seleccionar, y se mide la cantidad de unión en la segunda mezcla de unión (M_1). El compuesto a ensayo puede ser otro anticuerpo contra PD-1, como se ilustra en los Ejemplos. A continuación se comparan las cantidades de unión en la primera y segunda mezcla de unión, por ejemplo, calculando la relación de M_1/M_0 . Se considera que el compuesto o agente es capaz de modular una regulación por defecto asociada a PD-1 de las respuestas inmunitarias si se observa una disminución en la unión en la segunda mezcla de unión comparada con la primera mezcla de unión. La formulación y optimización de las mezclas de unión están dentro de los niveles de competencia en la materia, dichas mezclas de unión también pueden contener tampones y sales necesarias para potenciar u optimizar la unión, y se pueden incluir ensayos de control adicionales en el ensayo de selección de la invención. Así se pueden identificar compuestos que reducen la unión de la anticuerpo PD-1 en al menos un 10% aproximadamente (es decir, $M_1/M_0 < 0,9$), preferentemente superior al 30% aproximadamente y a continuación, si se desea, en segundo lugar se pueden seleccionar por la capacidad de mejorar un trastorno en otros ensayos o modelos animales como se describe a continuación. La fuerza de unión entre PD-1 y el anticuerpo se puede medir usando, por ejemplo, un ensayo de inmunoadsorción unido a una enzima (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), tecnología basada en resonancia de un plasmón de superficie (por ejemplo, Biacore), todas ellas técnicas muy conocidas en la materia.

35

40

45

50

[0092] A continuación el compuesto se puede probar *in vitro* como se describe en los Ejemplos o en un modelo animal (véase, en general, *Immunologic Defects in Laboratory Animals*, eds. Gershwin y col., Plenum Press, 1981), por ejemplo, como el siguiente: el modelo de ratón transgénico SWR X NZB (SNF1) (Uner y col. (1998) *J. Autoimmune*. 11 (3): 233-240), el modelo de ratón transgénico KRN (K/BxN) (Ji y col. (1999) *Immunol. Rev.* 169: 139); los ratones NZB X NZW (B/W), un modelo para SLE (Riemekasten y col. (2001) *Arthritis Rheum.*, 44(10): 2435-2445); encefalitis autoinmunitaria experimental (EAE) en ratón, un modelo para la esclerosis múltiple (Tuohy y col. (1988) *J. Immunol.* 141: 1126-1130, Sobel y col. (1984) *J. Immunol.* 132: 2393-2401, y Traugott, *Cell Immunol.* (1989) 119: 114-129); el modelo de diabetes en ratón NOD (Baxter y col. (1991) *Autoimmunity*, 9(1): 61-67), etc.).

60

[0093] Las dosis preliminares, por ejemplo, como se determina según las pruebas animales, y el aumento de escala de las dosificaciones para la administración a seres humanos se lleva a cabo según las prácticas aceptadas en la materia. La toxicidad y la eficacia terapéutica se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos habituales en cultivos celulares o animales experimentales. Los datos obtenidos a partir de ensayos con cultivos
 5 celulares o estudios en animales se pueden usar en la formulación de un espectro de dosificaciones para uso en seres humanos. Las dosificaciones terapéuticamente eficaces conseguidas en un modelo animal se pueden convertir para su uso en otro animal, incluyendo seres humanos, usando factores de conversión conocidos en la materia (véase, por ejemplo, Freireich y col. (1966) Cancer Chemother. Reports, 50(4): 219-244).

10 Composiciones farmacéuticas y procedimientos de administración

[0094] La descripción proporciona composiciones que comprenden anticuerpos contra PD-1. Dichas composiciones pueden ser adecuadas para uso farmacéutico y administración a pacientes. Las composiciones normalmente comprenden uno o más anticuerpos de la presente invención y un excipiente farmacéuticamente
 15 aceptable. La frase "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y agentes antifúngicos, agentes isotónicos, y agentes retardantes de la absorción, y similares, que sean compatibles con la administración farmacéutica. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es muy conocido en la materia. Las composiciones también pueden contener otros compuestos activos que proporcionen funciones terapéuticas suplementarias,
 20 adicionales, o mejoradas. Las composiciones farmacéuticas también pueden estar incluidas en un contenedor, envase, o dispensador junto con instrucciones para su administración.

[0095] Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con su vía de administración prevista. Los procedimientos para conseguir esta administración son conocidos por aquellos con
 25 conocimientos ordinarios en la materia. La administración puede ser, por ejemplo, por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intracavitaria, subcutánea o transdérmica. También es posible obtener composiciones que se puedan administrar tópicamente u oralmente, o que se puedan transmitir a través de las membranas de la mucosa.

[0096] Las disoluciones o suspensiones usadas para la aplicación intradérmica o subcutánea normalmente
 30 incluyen uno o más de los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, disolución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol, u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes como ácido etilendiamintetracético; tampones como acetatos, citratos o fosfatos; y agentes para el ajuste de la tonicidad como cloruro sódico o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, como ácido clorhídrico o
 35 hidróxido sódico. Dichas preparaciones se pueden introducir en ampollas, jeringas desechables o viales multidosis fabricados de vidrio o plástico.

[0097] Las composiciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables
 40 estériles. Para la administración por vía intravenosa, los vehículos adecuados incluyen disolución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL (BASF, Parsippany, NJ) o tampón fosfato salino (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debería ser fluida hasta un grado en el que sea fácil su introducción en una jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe preservar contra la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos. La prevención de la acción de los microorganismos se
 45 puede conseguir mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes como manitol, sorbitol, y cloruro sódico en la composición. El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y sus mezclas adecuadas. La fluidez adecuada se puede
 50 mantener, por ejemplo, con el uso de un recubrimiento como lecitina, con el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y/o con el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables se puede conseguir incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio, y gelatina.

[0098] Las composiciones orales en general incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Se pueden encerrar en cápsulas de gelatina o compactar en comprimidos. Para la administración por vía oral, los anticuerpos se pueden combinar con excipientes y se pueden usar en forma de comprimidos, trociscos, o cápsulas. Como parte de la composición se pueden incluir agentes de unión y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos, y similares pueden contener cualquiera de los siguientes principios, o un
 60 compuesto de naturaleza similar; un aglutinante como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente como fécula o lactosa, un agente desagregante como ácido alginico, Primogel, o fécula de maíz; un lubricante como estearato de magnesio o Sterotes; un glidante como dióxido de silicio coloidal; un agente

edulcorante como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante como pipermin, salicilato de metilo, o esencia de naranja.

[0099] La administración sistémica también puede ser por medios transmucosas o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, en la formulación se usan penetrantes adecuados para la barrera a 5 permear. Dichos penetrantes son conocidos de forma general en la materia, e incluyen, por ejemplo, detergentes, sales biliares, y derivados del ácido fusídico. La administración por vía transmucosa se puede conseguir, por ejemplo, con el uso de losanges, pulverizadores nasales, e inhaladores, o supositorios. Por ejemplo, en el caso de anticuerpos que comprenden la fracción Fc, las composiciones pueden ser capaces de atravesar las membranas 10 mucosas del intestino, boca, o pulmones (por ejemplo, a través de la vía mediada por el receptor FcRn como se describe en la patente de EE.UU. N° 6.030.613). Para la administración por vía transdérmica, los compuestos activos se pueden formular en ungüentos, bálsamos, geles, o cremas como es sabido de forma general en la materia. Para la administración por inhalación, los anticuerpos se pueden suministrar en forma de pulverizador en aerosol procedente de un contenedor o dispensador presurizado, que contiene un propelente adecuado, por 15 ejemplo, un gas como dióxido de carbono, o un nebulizador.

[0100] En ciertas formas de realización, los anticuerpos descritos en el presente documento se preparan con vehículos que protegerán al compuesto de la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros 20 biodegradables y biocompatibles, como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los procedimientos para la preparación de dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en la materia. También se pueden usar como vehículos farmacéuticamente aceptables suspensiones liposomales que contengan los anticuerpos descritos en el presente documento. Éstas se pueden preparar según los procedimientos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, como se describe en la 25 patente de EE.UU. N° 4.522.811.

[0101] Para comodidad en la administración y uniformidad de la dosificación puede ser ventajoso formular las composiciones orales o parenterales en formas de dosificación unitarias. La expresión "forma de dosificación unitaria" como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adaptadas como 30 dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar; cada unidad que contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado junto con el vehículo farmacéuticamente adecuado.

[0102] La toxicidad y eficacia terapéutica de la composición de la invención se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos habituales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para 35 determinar la DL₅₀ (dosis letal para el 50% de la población) y la DE₅₀ (dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de la dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación DL₅₀/DE₅₀. Se prefieren composiciones que presentan índices terapéuticos grandes.

[0103] Para cualquier composición usada en la presente invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede 40 estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. Ejemplos de bioensayos adecuados incluyen ensayos de replicación del ADN, ensayos de liberación de citoquinas, ensayos basados en la transcripción, ensayos de unión PD-1/PD-L1, ensayos de la creatina quinasa, ensayos basados en la diferenciación de los pre-adipocitos, ensayos basados en la captación de glucosa en los adipocitos, ensayos inmunológicos distintos de, por ejemplo, los ensayos descritos en los Ejemplos. Los datos obtenidos de los ensayos de cultivos celulares y estudios animales se pueden 45 usar en la formulación de un espectro de dosificaciones para su uso en seres humanos. Se puede formular una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentraciones en plasma circulante que incluya la CI₅₀ (es decir, la concentración del anticuerpo que consigue una inhibición semi-máxima de los síntomas). Los niveles circulantes en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento. Los efectos de cualquier dosificación particular se pueden controlar con un bioensayo adecuado. La dosificación 50 preferentemente está dentro de un intervalo de concentraciones circulantes con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada.

EJEMPLOS

55 **Ejemplo 1: Selección de ScFv de unión a PD-1**

[0104] Se usó una librería de fagémidos scFv, que es una versión expandida de la librería 1,38 x 10¹⁰ descrita por Vaughan y col. (Nature Biotech. (1996) 14: 309-314) para seleccionar anticuerpos específicos para el PD-1 humano. La proteína de fusión soluble PD-1 (a 20 µg/ml en tampón fosfato salino (PBS)) o la proteína de fusión 60 control (a 50 µg/ml en PBS) se recubrió en pocillos de una placa de microtitulación durante toda la noche a 4°C. Los pocillos se lavaron en PBS y se bloquearon durante 1 hora a 37°C en MPBS (leche en polvo al 3% en PBS). El fago purificado (10¹² unidades de transducción (tu)) se bloqueó durante 1 hora en un volumen final de 100 µl de MPBS al

- 3%. El fago bloqueado se añadió a los pocillos de la proteína de fusión control y se incubó durante 1 hora. Los fagos bloqueados y deseleccionados a continuación se transfirieron a los pocillos bloqueados recubiertos con la proteína de fusión PD-1 y se incubaron durante una hora más. Los pocillos se lavaron 5 veces con PBST (PBS que contienen Tween 20 al 0,1% v/v), y a continuación 5 veces con PBS. Las partículas de fago unidas se eluyeron y se usaron para infectar 10 ml de *E. coli* TG1 en fase de crecimiento exponencial. Las células infectadas se crecieron en caldo 2TY durante 1 hora a 37°C, a continuación se extendieron sobre placas 2TYAG y se incubaron durante toda la noche a 30°C. Las colonias se transfirieron de las placas con un rascador en 10 ml de caldo 2TY y se añadió glicerol al 15% para el almacenamiento a -70°C.
- 10 **[0105]** Los cultivos de la disolución madre de glicerol procedentes de la primera ronda de selección por inmunoadsorción se sobreinfectaron con un fago ayudante y se rescataron para dar partículas de fago que expresan el anticuerpo scFv para la segunda ronda de inmunoadsorción. De esta forma se llevaron a cabo un total de dos rondas de inmunoadsorción para el aislamiento de PD1-17, excepto que para la desección en la segunda ronda de inmunoadsorción se usaron 20 µg/ml de proteína control. Después de las tres rondas de selección se seleccionaron los clones PD1-28, PD1-33, y PD1-35. La desección en la segunda y tercera ronda se llevó a cabo usando 10 µg/ml de proteína de fusión control.

- [0106]** Se seleccionaron anticuerpos para PD-1 murino por selección soluble usando la proteína de fusión PD-1 murina biotinilada a una concentración final de 100 nM. Se usó una librería de fagémidos scFv, como se ha descrito anteriormente. Los fagos scFv purificados (10^{12} tu) en 1 ml de MPBS al 3% se bloquearon durante 30 minutos, a continuación se añadió antígeno biotinilado y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió fago/antígeno a 250 µl de cuentas magnéticas de estreptavidina Dynal M280 Streptavidin que habían sido bloqueadas durante 1 hora a 37°C en 1 ml de MPBS al 3% y se incubó durante 15 minutos más a temperatura ambiente. Las cuentas se capturaron usando una rejilla magnética y se lavaron 4 veces en 1 ml de MPBS al 3%/Tween 20 al 0,1% (v/v) seguido de 3 lavados en PBS. Después del último lavado en PBS, las cuentas se resuspendieron en 100 µl de PBS y se usaron para infectar 5 ml de células *E. coli* TG-1 en fase de crecimiento exponencial. Las células infectadas se incubaron durante 1 hora a 37°C (30 minutos en reposo, 30 minutos con agitación a 250 rpm), y a continuación se extendieron sobre placas 2TYAG y se incubaron durante toda la noche a 30°C. Las colonias resultantes se extrajeron de las placas con un rascador y los fagos se rescataron como se ha descrito anteriormente. Se llevó a cabo una segunda ronda de selección soluble como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 2: Especificidad de los anticuerpos para PD-1 mediante un ELISA de fagos

- [0107]** Para determinar la especificidad de los anticuerpos por PD-1, se llevó a cabo un ELISA de fagos contra la proteína de fusión PD-1 y proteínas control. Colonias individuales de *E. coli* procedentes de los resultados de la selección se pusieron en placas de 96 pocillos que contienen 100 µl de medio 2TYAG por pocillo. Se añadió el fago ayudante M13K07 para una multiplicidad de infección (moi) de 10 para el cultivo que crece en fase exponencial y las placas se incubaron durante 1 hora más a 37°C. Las placas se centrifugaron en una centrífuga de sobremesa a 2000 rpm durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y los sedimentos celulares se resuspendieron en 100 µl de 2TYAK y se incubaron a 30°C durante toda la noche con agitación. Al día siguiente, las placas se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante que contiene los fagos procedentes de cada pocillo se transfirió a una placa nueva de 96 pocillos. Las muestras con los fagos se bloquearon a una concentración final de MPBS al 3% antes del ELISA.
- 45 **[0108]** La proteína de fusión PD-1 humana y de ratón y proteínas de fusión y no fusión control se recubrieron durante toda la noche a 4°C en placas de microtitulación de 96 pocillos a 0,5-2,5 µg/ml en PBS. Después del recubrimiento, las disoluciones se extrajeron de los pocillos, y las placas se bloquearon durante 1 hora en MPBS al 3%. Las placas se enjuagaron con PBS y a continuación se añadieron 50 µl de fago pre-bloqueado a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 1 hora y a continuación se lavaron 3 veces con PBST seguido de 3 lavados con PBS. Se añadieron 50 µl de una dilución 1:5000 de conjugado anti-M13-HRP (Farmacia, Peapack, NJ) a cada pocillo, y las placas se incubaron durante 40-60 minutos. Cada placa se lavó tres veces con PBST, y a continuación 3 veces con PBS. Se añadieron 50 µl de sustrato TMB a cada pocillo, y las muestras se incubaron hasta que apareció color. La reacción se detuvo con la adición de 25 µl de H₂SO₄ 0,5 M. La señal generada se midió leyendo la absorbancia a 450 nm usando un lector de placas de microtitulación. Así se identificaron y se confirmaron los clones que presentan una unión específica a la proteína de fusión PD-1, pero no a las proteínas de fusión control.

[0109] Los datos de especificidad para scFv PD1-17 se muestran en la Figura 1A. La reactividad de scFv PD1-28, PD1-33, y PD1-35 con el PD-1 humano se muestra en la Figura 1B (un control IgG₁ no se unió a PD-1).

60 **Ejemplo 3: Identificación de clones de anticuerpos**

[0110] Clones de *E. coli* scFv que se unen a PD-1 se sembraron en placas 2TYAG y se incubaron durante

5 toda la noche a 30°C. Las colonias procedentes de estas placas se secuenciaron usando la secuencia de oligonucleótidos del vector pCANTAB6 para amplificar las regiones V_H y V_L del clon scFv. Se sometieron a ensayo clones de unión a PD-1 únicos para la neutralización de la unión de PD-L1 a PD-1 como se ha descrito en el Ejemplo 4. Las diferencias en la secuencia entre los formatos scFv e IgG son debidas a cambios introducidos por los

Ejemplo 4: Ensayo de inhibición de unión bioquímica y selección

10 **[0111]** Se indujo la producción de ScFv mediante la adición de IPTG 1 mM a cultivos en fase de crecimiento exponencial e incubación durante toda la noche a 30°C. Se obtuvieron extractos periplasmáticos que contienen scFv en bruto sometiendo a los sedimentos bacterianos procedentes de la inducción durante toda la noche a choque osmótico. Los sedimentos se resuspendieron en sacarosa al 20% (p/v), Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM y se enfriaron el hielo durante 30 minutos. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación, y la scFv se purificó por cromatografía e intercambio iónico con tampón en PBS. Las scFv purificadas (PD1-17, PD1-28, PD1-33, y PD1-35) se sometieron a ensayo para la capacidad de inhibir la unión de la proteína de fusión PD-L1 humana biotinilada a la proteína de fusión PD-1 humana inmovilizada en un ensayo en placa de microtitulación de 96 pocillos. La unión de la proteína de fusión PD-L1 biotinilada se detectó con AMDEX-fosfatasa alcalina, y la señal generada se midió leyendo la absorbancia a 405 nm usando un lector de placas de microtitulación. Los datos se expresan como porcentaje de la unión total y se sometió a ensayo una titulación de concentraciones de scFv para establecer la potencia de los clones calculada en valores de CI₅₀. Los datos de la potencia de los clones para los anticuerpos scFv e Ig se muestran en la Tabla 5.

25 **[0112]** Se produjo y se purificó scFv PD1-F2 como se ha descrito anteriormente. Se añadieron células que expresan PD-1 murino a 10⁵ células/pocillo en un volumen final de 100 µl a una placa de microtitulación de 96 pocillos recubierta con poli-D-lisina. Las células se centrifugaron y se lavaron dos veces en PBS, y a continuación se bloquearon con 300 µl de BSA al 1% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células bloqueadas se lavaron tres veces en PBST, antes de la adición de 25 µl/pocillo de tampón de ensayo (BSA al 0,05%, Tween 20 al 0,05% en PBS de Dulbecco) o de la muestra, seguido de 25 µl de proteína de fusión PD-L1 murina biotinilada a 300 ng/ml. La unión de la proteína de fusión PD-L1 biotinilada se detectó con Amdex-fosfatasa alcalina y las señales se leyeron como se ha descrito anteriormente. La potencia de las scFv PD1-F2 e IgG se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Potencia de anticuerpos scFv e IgG contra PD-1

Clon	CI ₅₀ de ScFv (nM)	CI ₅₀ de IgG (nM)
PD1-17	726	2,5
PD1-28	560	1,4
PD1-33	74	1,8
PD1-35	85	2,3
PD1-F2	28	1,0

Ejemplo 5: Conversión de ScFv en IgG

35 **[0113]** Se amplificaron por PCR las regiones V de la cadena pesada y ligera de clones scFv usando cebadores específicos para los clones. Los productos de la PCR se digirieron con las enzimas de restricción apropiadas y se subclonaron en vectores que contienen el dominio constante de la cadena pesada de la IgG₁ humana (Takahashi y col. (1982) Cell 29, 671) o vectores que contienen los dominios constantes de la cadena ligera lambda o kappa humana (Hieter y col. (1982) Nature 294, 536). Basándose en las líneas germinales de los segmentos V_H y V_L, se determinó si para la conversión se habían usado los dominios constantes de la cadena ligera kappa o lambda (Tabla 7).

Tabla 7: Líneas germinales de las regiones V_H y V_L de los clones de anticuerpos PD-1

Clon	Línea germinal de V _H	Línea germinal de V _L
PD1-17	DP-70	DPL-8
PD1-28	DP-14	DPL-23
PD1-33	DP-7	DPL-11
PD1-35	DP-65	DPL-2
PD1-F2	DP-47	L12 (k)

45 **[0114]** La inserción de los dominios de la región V en plásmidos se verificó con la secuenciación del ADN plasmídico procedente de colonias individuales de *E. coli*. Los plásmidos se prepararon a partir de cultivos de *E. coli* mediante técnicas habituales y las construcciones de la cadena pesada y ligera se transfirieron simultáneamente a células eucariotas usando técnicas habituales. La IgG segregada se purificó usando Protein A Sepharose

(Pharmacia) e intercambio de tampón en PBS.

5 **[0115]** La afinidad de unión del anticuerpo contra PD1 de ratón y PD1-F2 se determinó usando un sistema de resonancia de un plasmón de superficie (SPR) (BIAcore 3000) (Biacore, Piscataway, NJ) con una proteína de fusión PD-1 murina inmovilizada sobre un chip sensor CM5. La concentración de PD1-F2 en la celda de flujo varía entre 7,81 y 125 nM, mientras que la concentración del anticuerpo J43 contra PD1 de ratón (eBioscience, San Diego, CA) varía entre 25 nM y 500 nM. La constante de equilibrio K_D para PD1-F2 es $6,7 \times 10^{-9}$ M ($K_A = 1,5 \times 10^8$ M⁻¹), mientras que la K_D para J43 es $3,8 \times 10^{-7}$ M ($K_A = 2,6 \times 10^6$ M⁻¹).

10 **[0116]** La capacidad de la IgG contra PD-1 para unirse a PD-1 humano o murino se determinó de la manera siguiente. Se incubaron placas de ELISA con 2,5 µg/ml de quimera PD-1/IgG humana durante toda la noche. Las placas se lavaron con PBS/BSA al 1% y se incubaron con diluciones seriadas de un anticuerpo de prueba durante 2 horas a temperatura ambiente (RT). Después del lavado, se añadieron concentraciones saturantes de anticuerpo de cabra contra humano conjugado a HRP o anticuerpo de conejo contra ratón conjugado a HRP, y las muestras se
15 incubaron durante 1 hora a RT. Los anticuerpos de cabra y conejo no unidos se lavaron usando PBS/BSA al 1%. El ensayo se reveló usando TBM. Los resultados se expresaron como valores de absorbancia a una DO de 405 nm y se presentan en las Figuras 2A-2C. El anticuerpo murino J110 contra PD-1 humano está disponible comercialmente (eBioscience, San Diego, CA) y se incluyó con fines comparativos.

20 **Ejemplo 6: Anticuerpos PD-1 seleccionados inhiben la unión de PD-L1 a PD-1**

[0117] Se llevaron a cabo ensayos de inhibición para valorar la capacidad de los anticuerpos para bloquear la unión de PD-L1 a PD-1. Se llevó a cabo un ELISA como se ha descrito en el Ejemplo 2 con modificaciones. Después de la incubación con un anticuerpo primario contra PD-1 durante 2 horas a RT, se añadió una concentración fija
25 (1 µg/ml) de PD-L1-Ig conjugado con biotina, y las muestras se incubaron adicionalmente durante 1 hora a RT. Después de lavar, se añadieron concentraciones saturantes de avidina-HRP, y se incubó durante 1 hora a RT. La avidina-HRP sin unir se lavó usando PBS/BSA al 1%. El ensayo se reveló usando TMB.

[0118] Los resultados se compararon con los obtenidos con J110 como se muestra en la Figura 3. Los anticuerpos J110 y PD1-30 contra PD-1 humano no inhibieron la unión de PD-L1 a PD-1. Los anticuerpos PD1-17, PD1-28, PD1-33, y PD1-35 contra seres humanos y el anticuerpo PD1-F2 contra ratón bloquean la interacción PD-1/PD-L1.

35 **Ejemplo 7: Los anticuerpos PD-1 reconocen sitios distintos sobre PD-1**

[0119] Se llevaron a cabo ensayos de inhibición para mapear sitios reconocidos por los diversos anticuerpos contra PD-1 humano. Se llevó a cabo un ELISA como se ha descrito en el Ejemplo 6 con pequeñas modificaciones. Después de la incubación con anticuerpo primario durante 2 horas a RT, se añadió una concentración fija
40 (0,25 µg/ml) de anticuerpo J110 contra PD-1 conjugado con biotina, y las muestras se incubaron adicionalmente durante 1 hora a RT. Después de lavar, se añadieron concentraciones saturantes de avidina-HRP, y se incubó durante 1 hora a RT. La avidina-HRP no unida se lavó usando PBS/BSA al 1%. El ensayo se reveló usando TMB.

[0120] Como se muestra en la Figura 4, la unión de anticuerpos contra PD-1 humano (J110, J116, PD1-17, PD1-28, PD1-33, y PD1-35) define al menos dos sitios diferentes sobre PD-1. Los resultados del bloqueo cruzado
45 muestran que J110 y J116 se unen a sitios idénticos o que se solapan mientras que PD1-17, 28, 33, y 35 se unen a otro sitio diferente. La unión de J116 o J110 a PD-1 bloquea la unión de J110. En contraste, la unión de PD1-17, PD1-28, PD1-33, y PD1-35 no bloquea la unión de J110. Esto sugiere que los anticuerpos contra PD-1 probados se unen a, al menos, dos epítomos diferentes: uno reconocido por J110 y J116, y el otro reconocido por PD1-17, PD1-28, PD1-33, y PD1-35.

50 **Ejemplo 8: El acoplamiento de PD-1 da como resultado una reducción en las respuestas de las células T**

[0121] Se estimularon células T CD4⁺ (5×10^4 células/pocillo) con cuentas de tosilo (Dyna, Great Neck, NY) recubiertas con anticuerpo anti-hCD3 +/- PD-L1-Fc o anti-PD-1 (PD1-17 o J110). La concentración de las proteínas de fusión o los títulos de anticuerpo fueron como se indica en el eje de abscisas en la Figura 5. Después de 72
55 horas, se determinó la proliferación mediante la incorporación de ³H-timidina. La radiactividad incorporada se determinó usando un lector de placas LKB 1205.

[0122] Como se muestra en la Figura 5, el acoplamiento de PD-1 por el anticuerpo contra PD-1, PD1-17 o PD-L1.Fc provocó una reducción en la proliferación de células T. Así, PD1-17 puede mimetizar ligandos de PD-1 y proporcionar una señal inhibitoria. Como se describe a continuación (Ejemplo 9), esta señal inhibitoria da como resultado una reducción en la proliferación de células T y en la producción de IL-2. Los anticuerpos PD1-28, PD1-33,

- y PD1-35 tienen el mismo efecto que PD1-17. El efecto depende de la dosis, puesto que la activación de las células en presencia de concentraciones crecientes de PD1-17 o PD-L1.Fc da como resultado una reducción en la proliferación de células T. Los anticuerpos control contra PD-1, J110 (Figura 5) o J116 (datos no mostrados), no inhiben las respuestas de las células T y el incremento de la concentración de J110 tiene un efecto mínimo sobre la proliferación de células T. Para fines comparativos, los valores están representados como porcentaje de la respuesta contra CD3. "100%" representa las CPMs obtenidas cuando las células se activan con microesferas recubiertas de IgG murina contra CD3. En conjunto estos resultados indican que algunos, pero no todos los anticuerpos, que reconocen PD-1, pueden actuar como agonistas de la vía del PD-1.
- 5
- 10 **[0123]** Se llevaron a cabo experimentos adicionales para abordar si la regulación por defecto de PD-1 de las respuestas de las células T requería un acoplamiento coordinado de TcR/PD-1 sobre una superficie celular única (CIS) o separada (TRANS). Se prepararon dos grupos de microesferas: un grupo contenía anti-CD3 y PD-L1.Fc (CIS), y el otro contenía anti-CD3 o PD-L1.Fc (TRANS). La inhibición a través de PD-1 sólo se observó en condiciones en las que tanto PD-1 como TcR se acoplaron con ligandos sobre la misma superficie (CIS). A todas las relaciones de cuentas:célula probadas, no se observó inhibición en condiciones en las que las señales de TCR y PD-1 se proporcionan sobre superficies separadas (TRANS).
- 15
- [0124]** Para descartar impedimentos estéricos en los experimentos TRANS, se prepararon ensayos similares usando anticuerpo contra CD3 y B7.2.Fc. En estos ensayos, se observó la estimulación simultánea con B7 de respuestas de células T tanto en condiciones CIS como TRANS. En conjunto, estos hallazgos demuestran que la proximidad de PD-1 a TCR es necesaria para la función moduladora del receptor sobre la activación de las células T. Por tanto, para modular una respuesta de las células T, ambas señales activantes e inhibitoras debe proceder de la misma superficie ya sea ésta la superficie de una célula o de una cuenta.
- 20
- 25 **Ejemplo 9:** El bloqueo del acoplamiento de PD-1 por los anticuerpos da como resultado una proliferación aumentada
- [0125]** Para valorar el efecto del anticuerpo contra PD-1 soluble sobre la proliferación, se pre-activaron células T CD4+ durante 48 horas con cuentas recubiertas de anticuerpo anti-CD3/anti-CD28, se recogieron, y se volvieron a estimular con la concentración indicada de PHA más 10 ng/ml de IL-2 en presencia de PD1-17, J110, o IgG control. Se añadió cada uno de los anticuerpos a diferentes concentraciones al inicio del cultivo. La proliferación se midió a las 72 horas.
- 30
- [0126]** Los resultados demuestran que PD1-17 (Figura 6) y PD1-35 (datos no mostrados) potenciaron la proliferación de células T primarias. El anticuerpo control J110 no potenció las respuestas de las células T *in vitro*. Anticuerpos contra PD1 seleccionados, como los ejemplificados por PD1-17 y PD-35, inhiben la interacción de PD-1 con sus ligandos naturales y de esta forma bloquean la transmisión de una señal negativa. El bloqueo de la señal negativa también da como resultado una proliferación y una producción de IL-2 mejoradas.
- 35
- 40 **Ejemplo 10:** Tratamiento de trastornos
- [0127]** La modulación de la respuesta inmunitaria modulada por PD-1 es útil en casos en los que se desea un efecto inmunosupresor o un aumento de la respuesta inmunitaria. Este ejemplo describe el uso de anticuerpos PD-1 como agonistas o antagonistas de PD-1 para tratar a un sujeto al comienzo de la enfermedad o que tiene un trastorno inmunitario o un cáncer establecido, respectivamente.
- 45
- [0128]** Los sujetos con riesgo de padecer o afectados con un cáncer que pueden necesitar un aumento de la respuesta inmunitaria se beneficiarían del tratamiento con un antagonista de PD-1, tal como un anticuerpo contra PD-1 de la presente invención en una forma soluble. Más habitualmente, los anticuerpos se administran a pacientes ambulatorios mediante administración semanal a una dosis de 0,1-10 mg/kg aproximadamente por infusión intravenosa (IV) lenta. La dosis terapéuticamente eficaz apropiada de un antagonista es seleccionada por el facultativo que atiende y estará aproximadamente en el intervalo de 1 µg/kg a 20 mg/kg, de 1 µg/kg a 10 mg/kg, de 1 µg/kg a 1 mg/kg, de 10 µg/kg a 1 mg/kg, de 10 µg/kg a 100 µg/kg, de 100 µg a 1 mg/kg, y de 500 µg/kg a 5 mg/kg.
- 50
- 55 **[0129]** Los anticuerpos también se usaron para prevenir y/o reducir la gravedad y/o los síntomas de dolencias o enfermedades que implican una respuesta inmunitaria aberrante o no deseable, tales como en los trastornos autoinmunitarios ejemplificados a continuación.
- [0130]** La esclerosis múltiple (MS) es una enfermedad del sistema nervioso central que se caracteriza por la inflamación y pérdida de las vainas de mielina. En el modelo de ratón de encefalitis autoinmunitaria experimental (EAE) para la esclerosis múltiple (Tuohy y col. (J. Immunol. (1988) 141: 1126-1130), Sobel y col. (J. Immunol. (1984) 132: 2393-2401), y Traugott (Cell Immunol. (1989) 119: 114-129), se espera que el tratamiento de ratones con un
- 60

agonista de PD-1 antes de (y de manera continua a) la EAE prevenga o retrase el comienzo de la MS.

[0131] La artritis es una enfermedad caracterizada por la inflamación de las articulaciones. En el modelo de ratón de artritis inducida por colágeno (CIA) para artritis reumatoide (Courtenay y col. (Nature (1980) 283: 666-628) y Williams y col. (Immunol. (1995) 84: 433-439)), se espera que el tratamiento con un agonista de PD-1 evite o trate la artritis reumatoide (RA) u otros trastornos artríticos.

[0132] El lupus eritematoso sistémico (SLE) es una enfermedad autoinmunitaria caracterizada por la presencia de autoanticuerpos. Los anticuerpos y composiciones de esta invención se pueden usar como agonistas de PD-1 para inhibir las actividades de células T y células B autorreactivas, y prevenir o tratar el SLE o enfermedades relacionadas en ratones NZB X NZW (un modelo de ratón para el SLE) (Immunologic Defects in Laboratory Animals, Gershwin y col. eds., Plenum Press, 1981) o en seres humanos.

[0133] Se ha anticipado que los anticuerpos PD-1 de la invención se administrarán como agonistas de PD-1 en terapia *ex vivo* con una frecuencia de uno al mes o inferior. La duración del tratamiento puede abarcar entre un mes y varios años.

[0134] Para probar la eficacia clínica de anticuerpos en seres humanos, se identifican individuos con melanoma, cáncer de próstata, RA, SLE, MS, diabetes tipo I, y se seleccionan de manera aleatoria para un grupo de tratamiento. Los grupos de tratamiento incluyen un grupo placebo y de uno a tres grupos tratados con un agonista de PD-1 (dosis diferentes). Los individuos se someten a seguimiento prospectivamente de uno a tres años. Se ha anticipado que los individuos que reciben el tratamiento presentarán una mejoría.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 25 **[0135]**
- <110> Collins, Mary y col.
- <120> ANTICUERPOS CONTRA PD-1 Y SUS USOS
- <130> 08702.6098-00000
- <160> 58
- 30 <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 384
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- 35 <400> 1

```

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga gtggtgaagc ctteggggac cctgtccctc 60
acctgcgcta tttctggtgg ctccatcggc tctggtggct ccatcagaag tactaggtgg 120
tggagttggg tccgccagtc cccagggaa gggctggagt ggataggcga aatctatcat 180
agtgggagca ccaactacaa cccgtccctc aagagtcgcg tcaccatata actagacaag 240
tctaggaate acttctccct gaggctgaac tctgtgaccg ccgcggacac ggccgtttat 300
tactgtgcga gacaggacta cgggtgactcc ggcgactggt acttcgatct gtggggcaag 360
gggacaatgg tcaccgtctc ctca 384

```

- <210> 2
- <211> 128
- <212> PRT
- 40 <213> Homo sapiens
- <400> 2

ES 2 367 430 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Val Val Lys Pro Ser Gly
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Gly Ser Ile Gly Ser Gly
 20 25 30

Gly Ser Ile Arg Ser Thr Arg Trp Trp Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro
 35 40 45

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr
 50 55 60

Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Lys
 65 70 75 80

Ser Arg Asn His Phe Ser Leu Arg Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp
 85 90 95

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Asp Tyr Gly Asp Ser Gly Asp
 100 105 110

Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Lys Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 3
 <211> 330
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 3

aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tgggagtctc cggggaagac ggtaaccatc 60
 tcttgcaccc gcagcagtg ggcagcattgcc agcaactctg tgcagtggtg ccagcagcgc 120
 cggggcagtt cccccaccac tgtgatctat gaggataacc aaagaccctc tggggtcctc 180
 gatcggttct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac cgtctctgga 240
 ctgaagactg aggacgaggc tgactactac tgcagctctt ctgatagcag cgctgtggta 300
 ttgggcagtg ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 4
 <211> 110
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 4

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

ES 2 367 430 T3

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly
 65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ser Asp Ser
 85 90 95

Ser Ala Val Val Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 5
 <211> 357
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 5

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaagtc 60
 tctgcaagg cttctggtta cagatttacc agctacggca tcagctgggt ggcacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacaaactac 180
 gcacagaagc tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccaagaa cacagcctac 240
 atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagacgcg 300
 gattatagta gtgggtctgg gtactggggc cagggaaacc tggtcacctg ctctca 357

<210> 6
 <211> 119
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

ES 2 367 430 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Ala Asp Tyr Ser Ser Gly Ser Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 324
<212> ADN

5 <213> Homo sapiens
<400> 7

tcctatgagc tgactcagcc accctcgggtg tcagtggtccc caggacagac ggccaggatc 60

acctgttctg gagatgcatt gccaaagcaa tatgcttatt ggtaccagca gaagccaggc 120

caggccccctg tgatgggttat atataaagac actgagaggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccagctcagg gacaaaagtc acgttgacca tcagtggagt ccaggcagaa 240
 gacgaggctg actattattg tcaatcagca gacaacagta ttacttatag ggtgttcggc 300
 ggagggacca aggtcacctg ccta 324

<210> 8
 <211> 108
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 8

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Met Val Ile Tyr
 35 40 45

Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Ser Ser Gly Thr Lys Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Asn Ser Ile Thr Tyr
 85 90 95

Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 9
 10 <211> 357

<212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaaac ctggggcctc agtgagggtt 60
 tctgcaagg catctggata caccctcacc agttactata ttcactgggt ggcacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaata atcaacccta gaggtgccac cataagctac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaca cgtccacgag tacagtctac 240
 atggaactga gaaacttgaa atctgaggac acggccctgt attactgtgc tactgcaggc 300
 atctatgggtt ttgactttga ctactggggc agaggaacctc tggtcaccgt ctctca 357

5 <210> 10
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30

10

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Arg Gly Ala Thr Ile Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Asn Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Thr Ala Gly Ile Tyr Gly Phe Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

- <210> 11
- <211> 333
- <212> ADN
- 5 <213> Homo sapiens
- <400> 11

cagtctgccc tgactcagcc tgccctccgtg tctgggtctc ctgggcagtc gatcaccatc 60
 tcttgcaactg gaaccagtaa tgacgttggg ggttataatt atgtctcctg gtaccaacat 120
 caccaggca aagcccccaa actcatcatt tatgatgtca ctaaccggcc ctcagggggt 180
 tctgatcgct tctctggctc caagtctggc aacacggcct ccctgacat ctctgggctc 240
 ctggctgagg acgaggggtga ttattactgc agctcataca caattgttac caatttcgag 300
 gttcttttcg gctggagggac caagctgacc gtc 333

ES 2 367 430 T3

<210> 12
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 12

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asn Asp Val Gly Gly Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln His His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Ile Ile Tyr Asp Val Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Leu Ala Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ile Val
 85 90 95

Thr Asn Phe Glu Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
 100 105 110

<210> 13
 <211> 381
 <212> ADN
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 13

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctgggtg ctccatcagc agtgggtgctt attactggag ctggatccgc 120
 cagcaccag ggaagggcct ggagtggatt ggttacatct attacaatgg gaacacgtac 180
 tacaaccctg cctcaggag tctagttacc atatcagtag acgcgtctaa gaaccagttc 240
 tcctgaagc tgagctctgt gactgcccgc gacacggccg tctattactg tgcgagagcg 300
 tctgattacg tttggggggg ttatcgttat atggatgctt ttgatatctg gggccggggga 360
 acctggtca ccgtctctc a 381

<210> 14
 <211> 127
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 14

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

ES 2 367 430 T3

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Asn Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Arg Ser Leu Val Thr Ile Ser Val Asp Ala Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Ala Ser Asp Tyr Val Trp Gly Gly Tyr Arg Tyr Met Asp
 100 105 110

Ala Phe Asp Ile Trp Gly Arg Gly Thr Leu Ile Thr Val Ser Ser
 115 120 125

- <210> 15
- <211> 336
- <212> ADN
- 5 <213> Homo sapiens
- <400> 15

cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60
 tcttgttctg gaagcaactc caacatcgga agtaattctg taaactggta ccagcagctc 120
 ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat ggtaataatc agcggccctc aggggtccct 180
 gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240
 tctgagaatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tggtcocggta 300
 ttcggccgag ggaccaaggt caccgtccta ggtgag 336

- <210> 16
- <211> 112
- 10 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 16

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

Ser Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Ser Glu Asn Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Asn Gly Pro Val Phe Gly Arg Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Glu
 100 105 110

<210> 17
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 17

Ser Gly Gly Ser Ile Arg Ser Thr Arg Trp Trp Ser
 1 5 10

<210> 18
 <211> 16
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18

Glu Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 19
 15 <211> 13

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 19

Gln Asp Tyr Gly Asp Ser Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10

5 <210> 20
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20

Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn Ser Val Gln
 1 5 10

10 <210> 21
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 21

Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser
 1 5

<210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 22

Gln Ser Ser Asp Ser Ser Ala Val Val
 1 5

<210> 23
 <211> 5
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 23

Ser Tyr Gly Ile Ser
 1 5

<210> 24
 30 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 24

Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
 1 5 10 15

Gly

35 <210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 25

Asp Ala Asp Tyr Ser Ser Gly Ser Gly Tyr

1 5 10

<210> 26
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 26

Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala Tyr

1 5 10

<210> 27
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 27

Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser

1 5

<210> 28
 15 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 28

Gln Ser Ala Asp Asn Ser Ile Thr Tyr Arg Val

1 5 10

20 <210> 29
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29

Ser Tyr Tyr Ile His

1 5

25 <210> 30
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 30

Ile Ile Asn Pro Arg Gly Ala Thr Ile Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

<210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 31

Ala Gly Ile Tyr Gly Phe Asp Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 32
 <211> 14
 40 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 32

Thr Gly Thr Ser Asn Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 33
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 33

Asp Val Thr Asn Arg Pro Ser
 1 5

<210> 34
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 34

Ser Ser Tyr Thr Ile Val Thr Asn Phe Glu Val Leu
 1 5 10

<210> 35
 15 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 35

Ser Gly Ala Tyr Tyr Trp Ser
 1 5

20 <210> 36
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 36

Tyr Ile Tyr Tyr Asn Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser
 1 5 10 15

25 <210> 37
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 37

Ala Ser Asp Tyr Val Trp Gly Gly Tyr Arg Tyr Met Asp Ala Phe Asp
 1 5 10 15

<210> 38
 <211> 13
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 38

Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile Gly Ser Asn Ser Val Asn
 1 5 10

<210> 39
 <211> 7

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 39

Gly Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

5 <210> 40
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 40

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val
1 5 10

10 <210> 41
<211> 288
<212> PRT
<213> Homo sapiens
15 <400> 41

ES 2 367 430 T3

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
 1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
 20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Phe Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
 35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
 50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
 65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
 85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
 100 105 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
 115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
 130 135 140

ES 2 367 430 T3

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
 145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
 165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
 180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
 195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
 210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
 225 230 235 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
 245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
 260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
 275 280 285

- <210> 42
- <211> 320
- <212> ADN
- 5 <213> Homo sapiens
- <400> 42

```

gtcagcccaa ggctgcccc tcggtcaactc tgttcccgcc ctctctgag gagcttcaag 60
ccaacaagge cacactgggtg tgtctcataa gtgacttcta cccgggagcc gtgacagtgg 120
cctggaagge agatagcagc cccgtcaagg cgggagtgga gaccaccaca cctccaaac 180
aaagcaacaa caagtacgcg gccagcagct atctgagcct gacgcctgag cagtggaagt 240
cccacagaag ctacagctgc caggtcacgc atgaagggag caccgtggag aagacagtgg 300
ccctacaga atgttcatag 320

```

- <210> 43
- <211> 106
- <212> PRT
- 5 <213> Homo sapiens
- <400> 43

```

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1          5          10          15

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
          20          25          30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
          35          40          45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50          55          60

```


ES 2 367 430 T3

agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca 660
 aagccaaagg gcagcccca gaaccacagg tgtacacctt gccccatcc cgggaggaga 720
 tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggcacaagg cttctatccc agcgacatcg 780
 ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc 840
 tggactccga cggtccttc ttctctata gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc 900
 agcaggggaa cgtcttctca tgetccgtga tgcattgagc tctgcacaac cactacacgc 960

<210> 45

<211> 330

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 45

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

ES 2 367 430 T3

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

ES 2 367 430 T3

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

- <210> 46
- <211> 366
- <212> ADN
- 5 <213> Homo sapiens
- <400> 46

```

ggcgcgcaact ccgaggtgca gctggtgcag tctgggggag gcgtggttca gcttgggagg 60

tccctgagac tctcctgtgc agcgtctgga ttcaccttta gtagctattg gatgagctgg 120

gtccgccagg ctccagggaa ggggctggag tgggtctcag ctattagtgg tagtggtggt 180

agcacatact acgcagactc cgtgaagggc cggttcacca tctccagaga caattccaag 240

aacacgctgt atctgcaaat gaacagccta agagccgagg acacggccgt atattactgt 300

gcgaaagaga actgggggatc gtacttcgat ctctgggggc aagggaccac ggtcaccgtc 360

tctca 366
    
```

ES 2 367 430 T3

<210> 47
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 47

Gly Ala His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val
 1 5 10 15

Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 20 25 30

Phe Ser Ser Tyr Trp Cys Asp Arg Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro
 35 40 45

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser
 50 55 60

Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 65 70 75 80

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
 85 90 95

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Glu Asn Trp Gly Ser Tyr Phe
 100 105 110

Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 48
 <211> 332
 10 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 48

ES 2 367 430 T3

ggcgtgcaact ccgacatcgt gatgaccag tctccttcca cctgtctgc atctgtagga 60
gacagagtca ccatacacttg ccgggccagt caggggtatta gtagctggtt ggctcggtat 120
cagcagaaaac cagggagagc ccctaaggtc ttgatctata aggcattctac tttagaaagt 180
ggggtcccat caaggttcag cggcagtgga tctgggacag atttcaactct caccatcagc 240
agtctgcaac ctgaagattt tgcaacttac tactgtcaac agagttacag taccctcgtgg 300
acgttcggcc aggggaccaa gctggaaatc aa 332

<210> 49

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 49

Gly Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser
1 5 10 15

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly
20 25 30

Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro
 35 40 45

Lys Val Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr
 85 90 95

Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 50
 <211> 6
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 50

Ser Ser Tyr Trp Met Ser
 1 5

<210> 51
 <211> 17
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 51

Ala Ile Ser Gly Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 52
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 52

Glu Asn Trp Gly Ser Tyr Phe Asp Leu

1 5

<210> 53
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 53

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 54
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 54

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser

1 5

<210> 55
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 55

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp Thr

1 5

20 <210> 56
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> Murino
 <400> 56

ES 2 367 430 T3

Ile Ile Gln Leu Pro Asn Arg His Asp Phe His Met Asn Ile Leu Asp
 100 105 110

Thr Arg Arg Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
 115 120 125

His Pro Lys Ala Lys Ile Glu Glu Ser Pro Gly Ala Glu Leu Val Val
 130 135 140

Thr Glu Arg Ile Leu Glu Thr Ser Thr Arg Tyr Pro Ser Pro Ser Pro
 145 150 155 160

Lys Pro Glu Gly Arg Phe Gln Gly Met Val Ile Gly Ile Met Ser Ala
 165 170 175

Leu Val Gly Ile Pro Val Leu Leu Leu Leu Ala Trp Ala Leu Ala Val
 180 185 190

Phe Cys Ser Thr Ser Met Ser Glu Ala Arg Gly Ala Gly Ser Lys Asp
 195 200 205

Asp Thr Leu Lys Glu Glu Pro Ser Ala Ala Pro Val Pro Ser Val Ala
 210 215 220

Tyr Glu Glu Leu Asp Phe Gln Gly Arg Glu Lys Thr Pro Glu Leu Pro
 225 230 235 240

Thr Ala Cys Val His Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Thr Glu Gly
 245 250 255

ES 2 367 430 T3

Leu Gly Ala Ser Ala Met Gly Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Leu Gln
 260 265 270

Gly Pro Arg Pro Pro Arg His Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
 275 280 285

<210> 57
 <211> 321
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 57

actgtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 60
 actgcctctg ttgtgtgctt gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120
 aaggtggata acgcctctca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180
 aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa 240
 caciaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgccctg caciaagagc 300
 ttcaacaggg gagagtgtta g 321

<210> 58
 <211> 108
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 58

His Met Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 1 5 10 15

ES 2 367 430 T3

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
20 25 30

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
35 40 45

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
50 55 60

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
65 70 75 80

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
85 90 95

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado o uno de sus fragmentos de unión al antígeno que comprende:
 - 5 Un dominio V_H que comprende 3 CDRs; y un dominio V_L que comprende 3 CDRs; en el que el anticuerpo comprende CDRs que tienen las secuencias de:
 - 10 (a) SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25; y
SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28;
 - o
 - (b) SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 31; y
SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34;
 - o
 - 15 (c) SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 37 y
SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40;
 en el que el anticuerpo se une específicamente a un epítipo dentro del dominio extracelular del PD-1 humano.
 2. El anticuerpo de la reivindicación 1 (a) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; o el anticuerpo de la reivindicación 1 (b) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10; o el anticuerpo de la reivindicación 1 (c) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14.
 3. El anticuerpo de la reivindicación 1 (a), que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; o el anticuerpo de la reivindicación 1 (b), que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12;
 - 25 o el anticuerpo de la reivindicación 1 (c), que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16.
 4. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se une específicamente al dominio extracelular de PD-1 con una constante de afinidad superior a $10^7 M^{-1}$.
 - 30 5. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo inhibe la unión de PD-L a PD-1 con una CI_{50} inferior a 10 nM.
 6. El anticuerpo de la reivindicación 1, que es una Fab, $F(ab')_2$, Fv, scFv.
 - 35 7. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es humano.
 8. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es IgG₁ o IgG₄.
 9. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es IgG_{1 λ} o IgG_{1 κ} .
 - 40 10. El anticuerpo de la reivindicación 1(a), en el que el anticuerpo comprende un dominio V_H de la SEQ ID NO: 6 y un dominio V_L de la SEQ ID NO: 8; o el anticuerpo de la reivindicación 1(b) en el que el anticuerpo comprende un dominio V_H de la SEQ ID NO: 10 y un dominio V_L de la SEQ ID NO: 12; o el anticuerpo de la reivindicación 1(c) en el que el anticuerpo comprende un dominio V_H de la SEQ ID NO: 14 y un dominio V_L de la
 - 45 SEQ ID NO: 16.
 11. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la reivindicación 1.
 12. Uso de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 anteriores en la preparación de un
 - 50 medicamento.
 13. El uso de la reivindicación 12, en el que el medicamento es para el tratamiento o la prevención de un trastorno seleccionado del grupo constituido por un trastorno autoinmunitario, una respuesta inmunitaria a un injerto, una reacción alérgica, y cáncer.
 - 55 14. El uso de la reivindicación 12 ó 13, en el que el medicamento es para su administración a un ser humano.
 15. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de la reivindicación 1.
 - 60 16. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 15.

17. Una célula hospedadora que comprende el vector de la reivindicación 16.
18. La célula hospedadora de la reivindicación 17, en la que la célula hospedadora se selecciona entre: una bacteria *E. coli*, una célula de ovario de hámster chino, una célula HeLa, y una célula NS0.
- 5 19. El ácido nucleico de la reivindicación 15, en el que el ácido nucleico codifica la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8, o SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 16.
- 10 20. El ácido nucleico de la reivindicación 19, en el que el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por la SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 15.
- 15 21. Un procedimiento de preparación de un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro del dominio extracelular del PD-1 humano, en el que el procedimiento comprende:
- (a) la proporción de un repertorio de partida de ácidos nucleicos que codifican un dominio variable que incluye una CDR3 a reemplazar o que carece de una región que codifica CDR3;
- 20 (b) la combinación del repertorio con un ácido nucleico donador que codifica una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se expone en la SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 31, o SEQ ID NO: 37, de manera que el ácido nucleico donador se inserta en la región CDR3 en el repertorio, para así proporcionar un repertorio producto de ácidos nucleicos que codifican un dominio variable;
- (c) la expresión de los ácidos nucleicos del repertorio producto;
- 25 (d) la selección de un fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a PD-1; y
- (e) la recuperación del fragmento de unión al antígeno específico o al ácido nucleico que codifica el fragmento de unión.
22. Un anticuerpo producido mediante el procedimiento de la reivindicación 21.
- 30 23. Uso de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 ó 22 en la fabricación de un medicamento para la modulación de una respuesta inmunitaria adaptativa.
24. El uso de la reivindicación 23, en el que el medicamento modula una respuesta de células T, células B, o monocitos.
- 35 25. El uso de la reivindicación 23, en el que el anticuerpo es como en la reivindicación 1.
26. El uso de la reivindicación 23, en el que el anticuerpo es como en la reivindicación 22.
- 40 27. El uso de la reivindicación 23, en el que el anticuerpo está inmovilizado sobre una matriz o reticulado.
28. El uso de la reivindicación 27, en el que la matriz de soporte comprende uno o más materiales seleccionados entre agarosa, dextrano, celulosa, PVDF, sílice, nailon, dacrón, poliestireno, poliacrilatos, polivinilos, teflones, ácido poliglicólico, polihidroxialcanoato, colágeno, y gelatina.
- 45 29. El uso de la reivindicación 23, en el que el anticuerpo contra PD-1 modula una respuesta celular inmunitaria mediada por una señal de un receptor de antígenos.
30. El uso de la reivindicación 29, en el que la señal del receptor de antígenos es presentada
- 50 simultáneamente con el anticuerpo contra PD-1.
31. El uso de la reivindicación 29, en el que la señal del receptor de antígenos y el anticuerpo contra PD-1 están separadas por no más de 100 μm .
- 55 32. El uso de la reivindicación 29, en el que la señal del receptor de antígenos es proporcionada por un anticuerpo contra CD3.

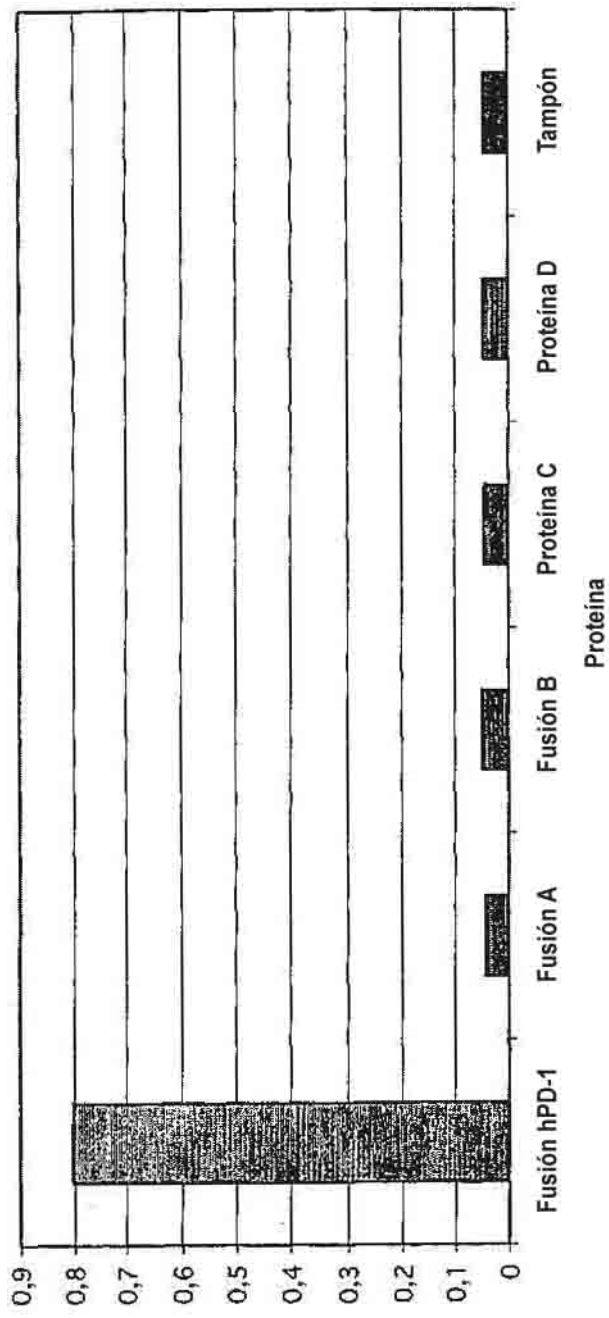


Fig. 1A

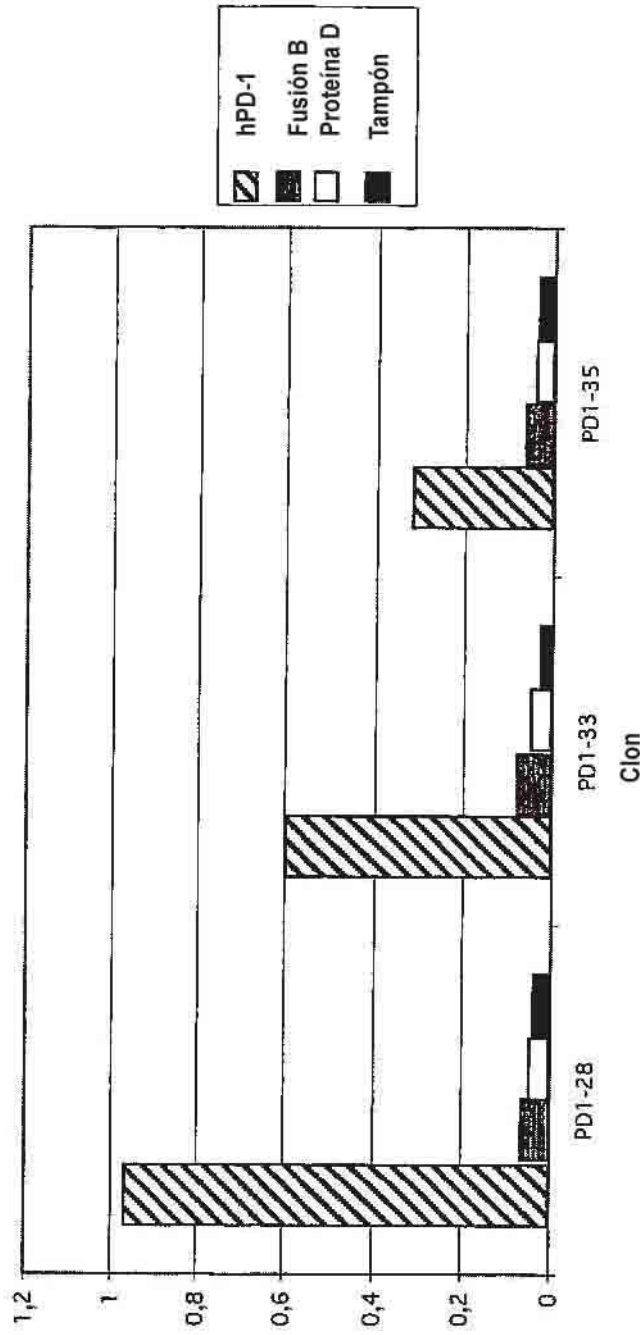


Fig. 1B

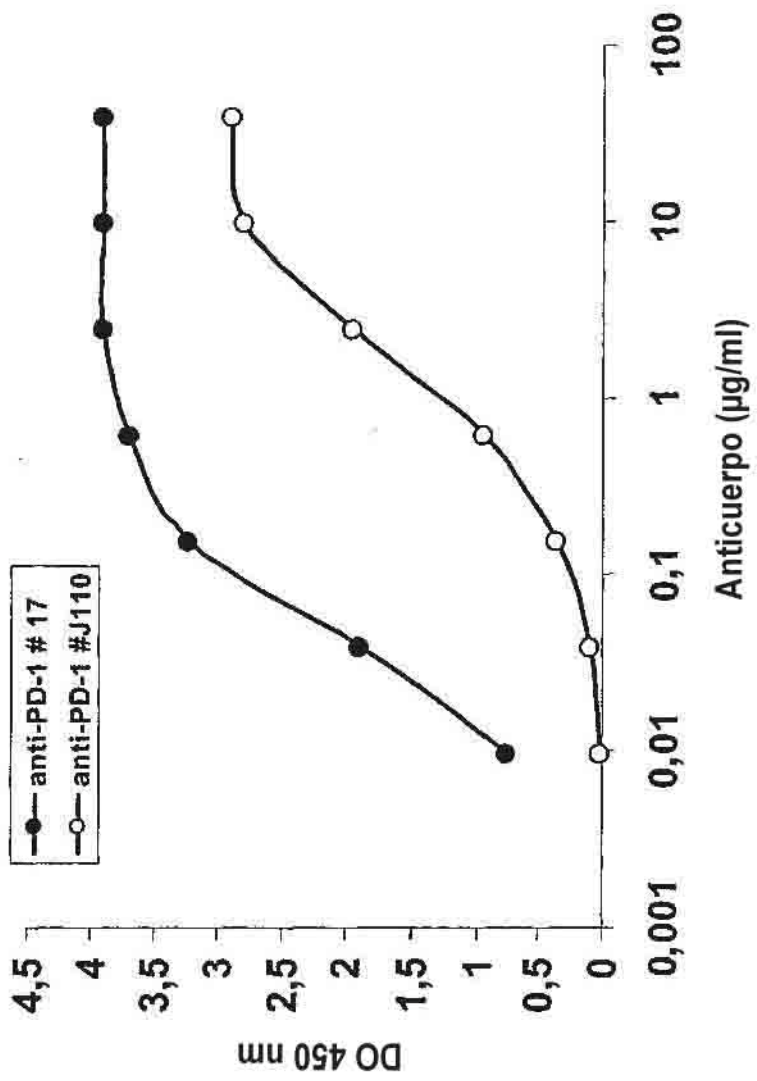


Fig. 2A

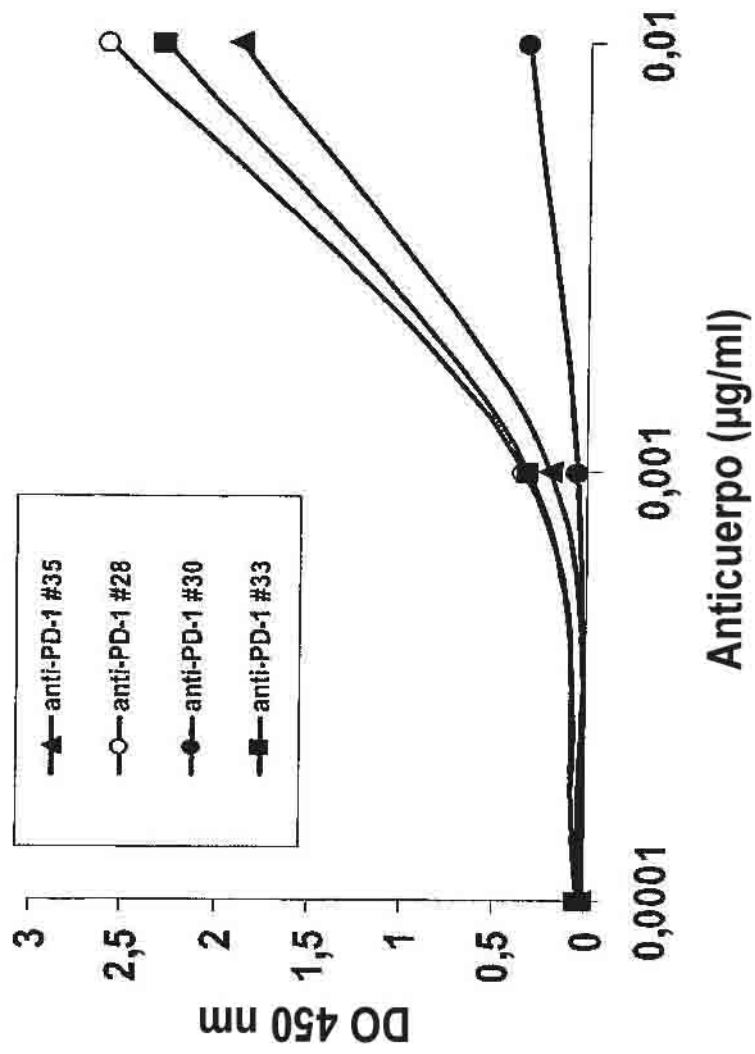


Fig. 2B

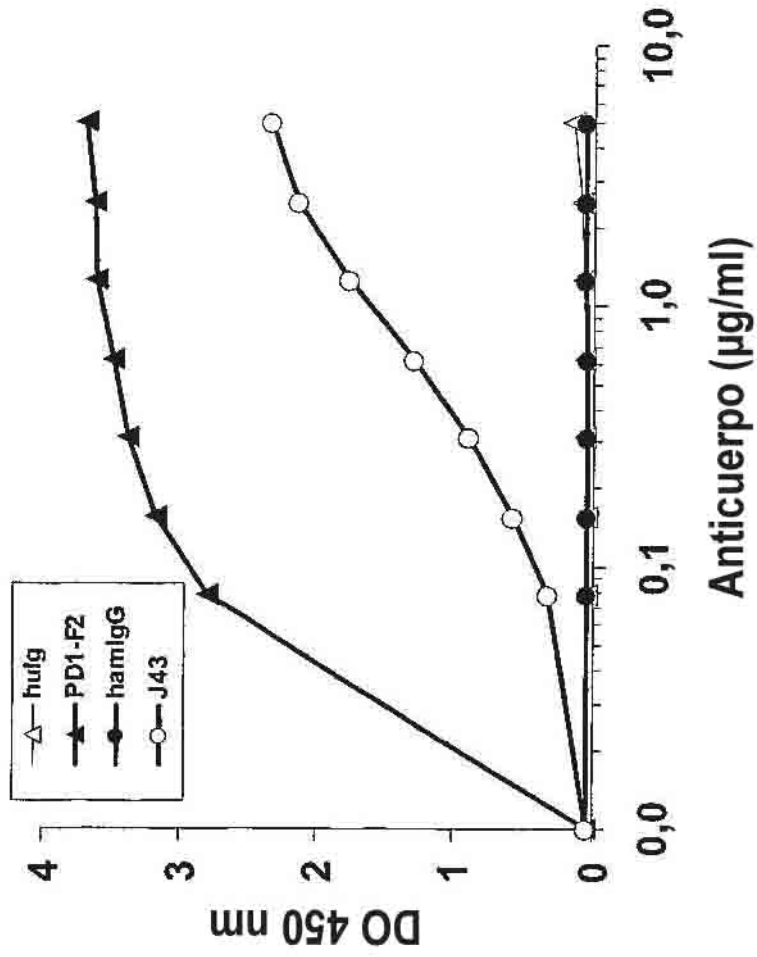


Fig. 2C

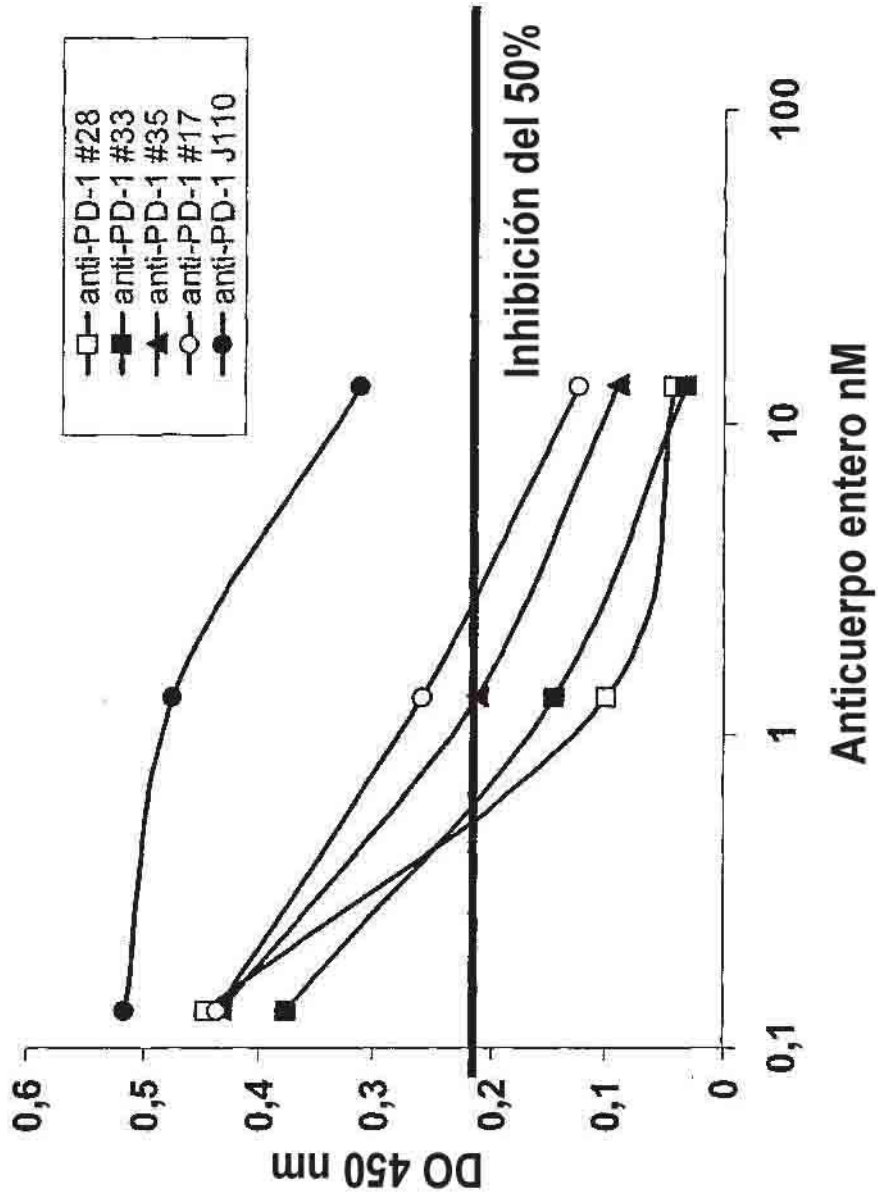


Fig. 3

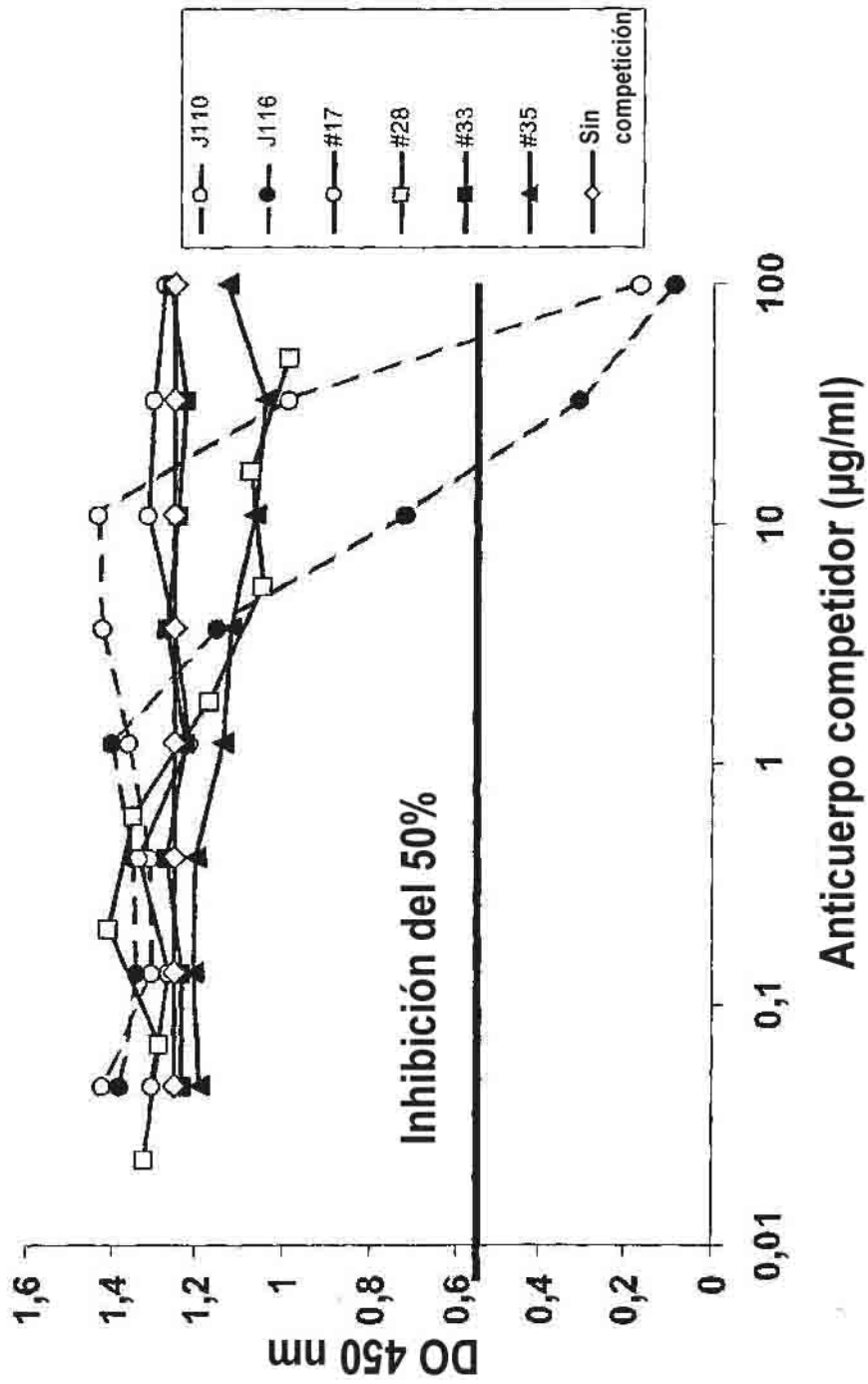


Fig. 4

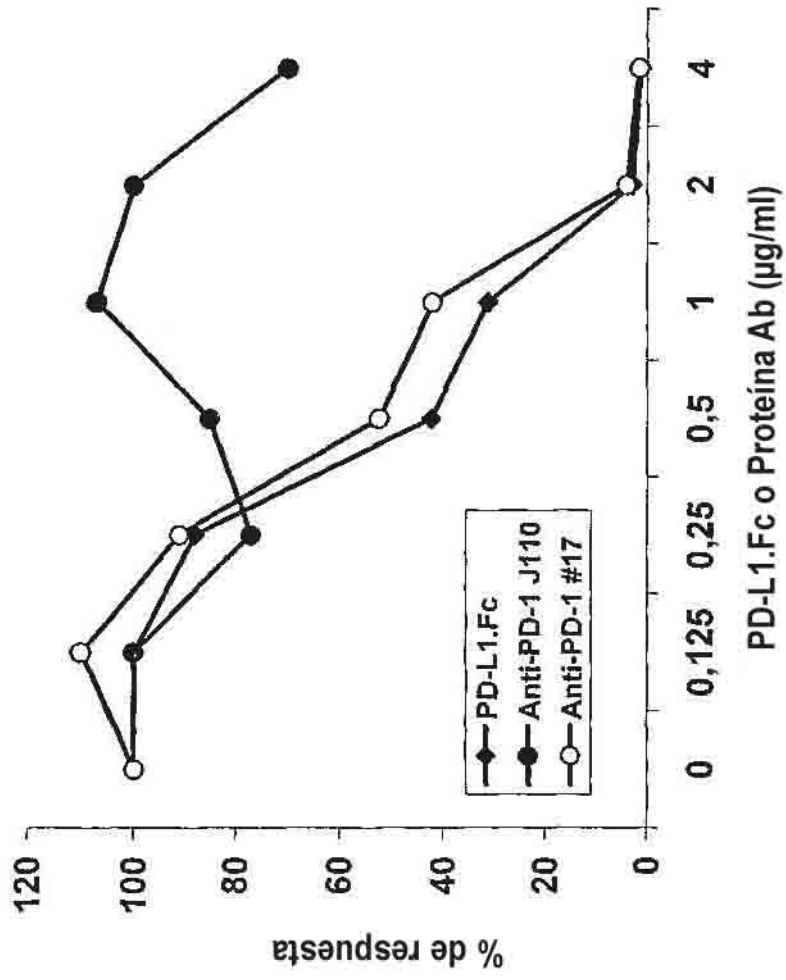


Fig. 5

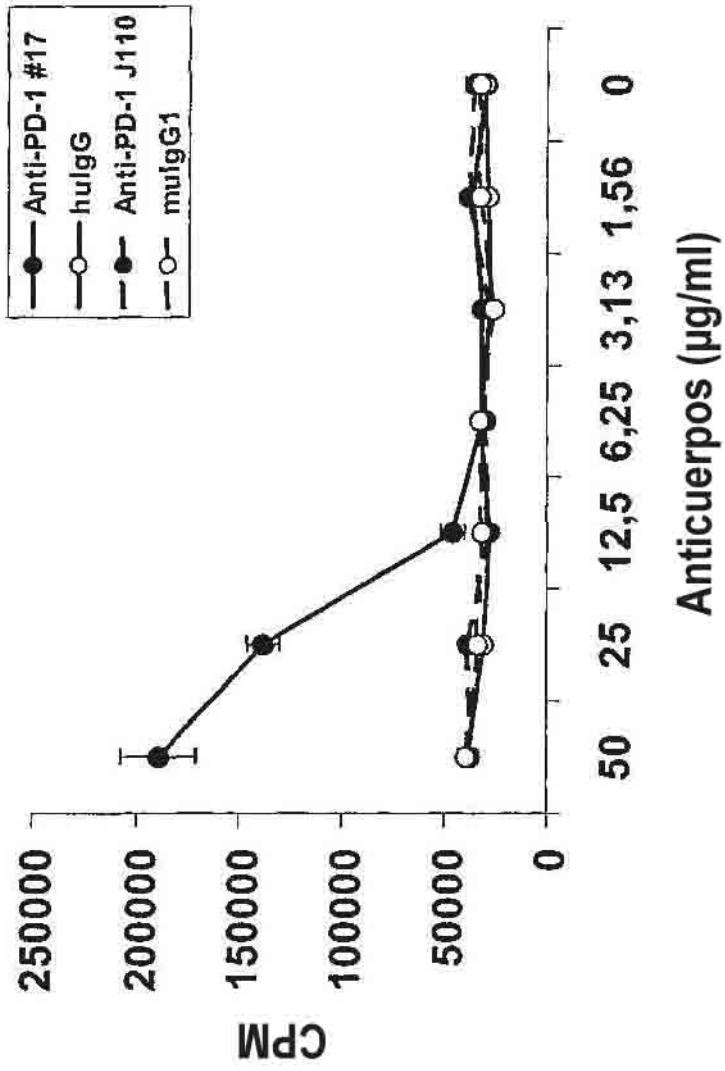


Fig. 6