

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 327**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2008 E 08768485 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2013 EP 2170959**

54 Título: **Anticuerpos para el receptor PD-1 humano de muerte programada**

30 Prioridad:

**18.06.2007 US 944583 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**10.01.2014**

73 Titular/es:

**MERCK SHARP & DOHME B.V. (100.0%)  
Waarderweg 39  
2031 BN Haarlem, NL**

72 Inventor/es:

**CARVEN, GREGORY JOHN;  
VAN EENENNAAM, HANS y  
DULOS, GRADUS JOHANNES**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 437 327 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 para el receptor PD-1 humano de muerte programada

5 **Antecedentes de la invención**

El receptor 1 de muerte programada (PD-1) es un receptor inmunoinhibidor que se expresa principalmente sobre células T y B activadas. Se ha comprobado que la interacción con sus ligandos atenúa las respuestas de células T tanto *in vivo* como *in vitro*. Se ha comprobado que el bloqueo de la interacción entre PD-1 y uno de sus ligandos, PD-L1, mejora la inmunidad de las células-CD8<sup>+</sup> T específicas de tumores y puede, por tanto, ser útil en la eliminación de células tumorales por medio del sistema inmunológico.

PD-1 (codificado por el gen *Pdcd1*) es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas relacionado con CD28, y CTLA-4. Se ha comprobado que PD-1 regula negativamente la señalización del receptor de antígeno tras el engranaje de sus ligandos (PD-L1 y/o PD-L2). Se ha resuelto la estructura de PD-1 murino así como también la estructura de co-cristal de PD-1 de ratón con PD-L1 humano (Zhang, X. y col., *Immunity* 20:337-347 (2004); Lin y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105:3011-6 (2008)). PD-1 los miembros de familia similares son glucoproteínas de transmembrana de tipo I que contienen un dominio de tipo Ig variable (tipo V) responsable de la unión de ligandos y una cola citoplasmática que es responsable de la unión de moléculas de señalización. La cola citoplasmática de PD-1 contiene dos motivos de señalización basados en tirosina, un ITIM (motivo de inhibición basado en tirosina de inmunoreceptor) y un ITSM (motivo de cambio basado en tirosina de inmunoreceptor).

Tras la estimulación de células T, PD-1 engancha la tirosina fosfatasa SHP-2 al motivo ITSM dentro de su cola citoplasmática, conduciendo a la desfosforilación de las moléculas efectoras tales como CD3 zeta, PKC teta y ZAP70, que se ven implicadas en la cascada de señalización de células CD3 T. El mecanismo por medio del cual PD-1 modula a la baja las respuestas de las células T es similar, pero distinto del correspondiente a CTLA-4, ya que ambas moléculas regulan un conjunto de solapamiento de proteínas de señalización (Parry et col., *Mol. Cell Biol.* 25: 9543-9553). Bennett y colaboradores han mostrado que la inhibición mediada por PD-1 de la señalización de células T únicamente es eficaz cuando las señales tanto de activación como de inhibición se producen sobre la misma superficie, lo que indica que el mecanismo de señalización de PD-1 se determina según un patrón de espacio-tiempo (Bennett F. y col., *J Immunol.* 170:711-8 (2003)).

Se ha mostrado que PD-1 se expresa sobre linfocitos activados (células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> periféricas, células B y monocitos) y también se ha mostrado la expresión durante el desarrollo tímico sobre células T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (doble negativo) así como también en células NK-T.

Los ligandos para PD-1 (PD-L1 y PD-L2) se expresan de forma constitutiva o se pueden inducir en una variedad de tipos celulares, incluyendo los tejidos no hematopoyéticos así como también varios tipos de tumores. PD-L1 se expresa sobre células B, T, mieloides y dendríticas (DCs), pero también sobre células periféricas, tales como células endoteliales microvasculares y órganos no linfoides tales como corazón, pulmón, etc. Por el contrario, PD-L2 únicamente se encuentra en macrófagos y DCs. El patrón de expresión de los ligandos PD-1 sugiere un papel de PD-1 en el mantenimiento de la tolerancia periférica y puede servir para regular las respuestas auto-reactivas de células T y B en la periferia. Ambos ligandos son receptores de transmembrana de tipo I que contienen por un lado dominios de tipo IgV y por otro, dominios de tipo IgC en la región extracelular. Ambos ligandos contienen regiones citoplasmáticas sin motivos de señalización conocidos.

Hasta la fecha, numerosos estudios han mostrado que la interacción de PD-1 con sus ligandos conduce a la inhibición de la proliferación de linfocitos *in vitro* e *in vivo*. Se ha visto que la alteración de la interacción PD-1/PD-L1 aumenta la proliferación de células T y la producción de citoquinas y la progresión de bloques del ciclo celular. El análisis inicial de ratones *Pdcd1*<sup>-/-</sup> no identifica ningún fenotipo inmunológico drástico. No obstante, los ratones de edad avanzada desarrollaron enfermedades autoinmunitarias espontáneas que difirieron de acuerdo con la cepa sobre la cual se produjo el retro-cruzamiento de la deficiencia de *Pdcd1*. Estos incluyen artritis proliferativa de tipo lupus (C57BL/6) (Nishimura H. y col., *Int. Immunol.* 10: 1563-1572 (1998)), cardiomiopatía mortal (BALB/c) (Nishimura H. y col., *Science* 291: 319-322 (2001)) y diabetes de tipo I (NOD) (Wang J. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 11823-11828 (2005)). En general, el análisis de animales knockout ha conducido a la comprensión de que PD-1 funciona principalmente para inducir y regular la tolerancia periférica. De este modo, el bloqueo terapéutico del mecanismo PD-1 puede resultar útil para solucionar la tolerancia inmunológica. Dicho bloqueo selectivo puede ser de utilidad en el tratamiento de cáncer o infección así como en el refuerzo inmunitario durante la vacunación (bien profiláctico o terapéutico).

El papel de PD-1 en el cáncer se establece en la bibliografía. Se sabe que el microentorno tumoral puede proteger células tumorales frente a la destrucción inmunológica eficaz. Recientemente, se ha visto que PD-L1 se expresa en un número de tumores humanos y de ratón (y se puede inducir por medio de IFN gamma sobre la mayoría de estirpes celulares tumorales PD-L1 negativas) y se postula que interviene como mediador en la evasión inmunológica (Iwai Y. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 12293-12297 (2002); Strome S.E. y col., *Cancer Res.*, 63: 6501-6505 (2003)).

En seres humanos, se ha encontrado la expresión de PD-1 (en tumores que se infiltran en linfocitos) y/o PD-L1 (en células tumorales) en un número de biopsias primarias evaluadas por medio de inmunohistoquímica. Dichos tejidos incluyen cánceres de pulmón, hígado, ovario, cuello uterino, piel, colon, glioma, vejiga, mama, riñón, esófago, estómago, células escamosas orales, células uroteliales, y páncreas así como también tumores en el cerebro y cuello (Brown J.A. y col., *J. Immunol.* 170: 1257-1266 (2003); Dong H. y col., *Nat. Med.* 8: 793-800 (2002); Wintterle y col., *Cancer Res.* 63: 7462-7467 (2003); Strome S.E. y col., *Cancer Res.*, 63: 6501-6505 (2003); Thompson R.H. y col., *Cancer Res.* 66: 3381-5 (2006); Thompson y col., *Clin. Cancer Res.*, 13: 1757-61 (2007); Nomi T. y col., *Clin. Cancer Res.* 13: 2151-7 (2007)). De manera más marcada, se ha correlacionado la expresión de PD-ligando sobre células tumorales con una prognosis pobre de pacientes con cáncer a lo largo de múltiples tipos de tumores (revisado en Okazaki y Honjo, *Int. Immunol.* 19: 813-824 (2007)).

El bloqueo de la interacción PD-1/PD-L1 podría conducir a un inmunidad mejorada de células T específicas tumorales y por tanto podría ser útil para la eliminación de células tumorales por parte del sistema inmunológico. Para abordar esta cuestión, se han llevado a cabo numerosos estudios. En un modelo murino de cáncer de páncreas agresivo, T. Nomi y col. (*Clin. Cancer Res.* 13: 2151-2157 (2007)) demostraron la eficacia terapéutica del bloqueo PD-1/PD-L1. La administración de anticuerpo dirigido a PD-1 o PD-L1 inhibió significativamente la proliferación del tumor. El bloqueo de anticuerpo favoreció la infiltración de células CD8<sup>+</sup> T reactivas tumorales en el interior del tumor, dando como resultado la sobre-regulación de los efectores anti-tumorales incluyendo IFN gamma, grancima B y perforina. De manera adicional, los autores mostraron que el bloqueo PD-1 se puede combinar de manera eficaz con quimioterapia para lograr un efecto sinérgico. En otro estudio, por medio del uso de un modelo de carcinoma celular escamoso en ratones, el bloqueo de anticuerpos de PD-1 o PD-L1 inhibió significativamente la proliferación tumoral (Tsushima F. y col., *Oral Oncol.* 42: 268-274 (2006)).

En otros estudios, la transfección de una estirpe de mastocitoma murino con PD-L1 condujo a una menor lisis de las células tumorales cuando se sometieron a co-cultivo con un clon de CTL específico tumoral. Se restituyó la lisis cuando se añadió anti-PD-L1 mAb (Iwai Y. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 12293-12297 (2002)). *In vivo*, se ha mostrado que el bloqueo de la interacción PD1/PD-L1 aumentaba la eficacia de la terapia de transferencia de células T adoptivas en un modelo tumoral de ratón (Strome S.E. y col., *Cancer Res.* 63: 6501-6505 (2003)). Otras evidencias del papel de PD-1 en el tratamiento del cáncer proceden de experimentos llevados a cabo con ratones knockout PD-1. Las células de mieloma que expresan PD-L1 crecieron únicamente en animales de tipo salvaje (dando como resultado una proliferación tumoral y muerte animal asociada), pero no en ratones deficientes de PD-1 (Iwai Y. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 12293-12297 (2002)).

En estudios en humanos, R. M. Wong y col. (*Int. Immunol.* 19: 1223-1234 (2007)) mostraron que el bloqueo de PD-1 usando un anticuerpo anti-PD-1 completamente humano aumentó los números absolutos de células CD8<sup>+</sup> T específicas de tumor (CTLs) en ensayos de estimulación *ex vivo* usando antígenos de vacuna y células procedentes de individuos vacunados. En un estudio similar, el bloqueo de anticuerpo de PD-L1 dio como resultado una actividad citolítica mejorada de las células T citotóxicas específicas de antígeno asociadas a tumores y una mayor producción de citoquinas por parte de las células T<sub>H</sub> específicas de tumor (Blank C. y col., *Int. J. Cancer* 119: 317-327 (2006)). Los mismos autores mostraron que el bloqueo de PD-L1 aumenta las respuestas de las células T específicas de tumor *in vitro* en combinación con el bloqueo de anti-CTLA-4.

En general, el mecanismo de PD-1/PD-L1 es una diana bien validada para el desarrollo de sustancias terapéuticas para el tratamiento de cáncer. Los anticuerpos PD-1 también pueden ser útiles en la infección vírica crónica. Las células CD8<sup>+</sup> T de memoria generadas tras una infección vírica aguda son altamente funcionales y constituyen un componente importante de la inmunidad protectora. Por el contrario, con frecuencia, las infecciones crónicas se caracterizan por grados variables de impedimento funcional (agotamiento) de las respuestas de células T específicas de virus, y este efecto es el motivo principal de la incapacidad del hospedador para eliminar el patógeno que persiste. Aunque inicialmente se generan las células T efectoras funcionales durante las etapas tempranas de la infección, gradualmente pierden su función durante el transcurso de la infección crónica. Barber y col. (*Barber y col., Nature* 439: 682-687 (2006)) mostraron que los ratones infectados con una estirpe de laboratorio de LCMV desarrollaron infección crónica dando como resultado niveles elevados de virus en sangre y otros tejidos. Inicialmente, estos ratones desarrollaron una respuesta firme de células T, pero finalmente sucumbieron a la infección tras el agotamiento de las células T. Los autores descubrieron que la disminución en el número y función de las células T efectoras de ratón crónicamente infectado se puede revertir por medio de la inyección de un anticuerpo que bloquee la interacción entre PD-1 y PD-L1.

Recientemente, se ha comprobado que PD-1 se expresa en gran medida sobre células T en individuos infectados con VIH y que la expresión del receptor se correlaciona con la función de células T impedidas y la progresión de la enfermedad (Day y col., *Nature* 443: 350-4 (2006).; Trautmann L y col., *Nat. Med.* 12: 1198-202 (2006). En ambos estudios, el bloqueo del ligando PD-L1 aumentó significativamente la expansión de células de producción de IFN-gamma específicas de VIH *in vitro*.

Otros estudios implican la importancia del mecanismo de PD-1 para el control de la infección vírica. Los ratones knockout PD-1 exhiben un mejor control de la infección adenovírica que los ratones de tipo salvaje (Iwai y col., *J. Exp. Med.* 198: 39-50 (2003)). De igual forma, la transferencia adoptiva de células T específicas de HBV al interior

de animales transgénicos HBV dio lugar a la aparición de hepatitis (Isogawa M. y col., Immunity 23: 53-63 (2005)). El estado de enfermedad de estos animales oscila como consecuencia del reconocimiento de antígeno en el hígado y la sobre-regulación de PD-1 en células hepáticas.

5 El documento WO 2006/121 168 divulga anticuerpos monoclonales, en particular anticuerpos monoclonales humanos, que se unen específicamente a PD-1 con una elevada afinidad y su uso para el tratamiento de enfermedades.

10 También el documento US 2006/210 567 A1 divulga anticuerpos y/o antagonistas de PD-1 y sus composiciones. En el documento US 2006/210 567 A1 se divulga que dichas composiciones se pueden usar, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades auto-inflamatorias.

### **Breve resumen de la invención**

15 La invención proporciona anticuerpos aislados y fragmentos de anticuerpo que se unen a PD-1 humano y chino. En algunas realizaciones, el anticuerpo o los fragmentos de anticuerpo bloquean la unión de PD-L1 humano y PD-L2 humano a PD-1 humano. El anticuerpo PD-1 o fragmento de anticuerpo de la invención incluye los CDRs (Regiones de Determinación de Capacidad Complementaria de Anticuerpo) de Nos. de SEQ ID: 15, 16, 17, 18, 19 y 20; e incluye CDRs de cadena pesada de Nos. SEQ ID: 18, 19 y 20 y los CDRs de cadena ligera de Nos. de SEQ ID: 15, 20  
20 16 y 17. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo híbrido, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o uno de sus fragmentos.

25 Se divulga un anticuerpo aislado o un fragmento de antígeno que se une a PD-1 humano que comprende: una cadena ligera que comprende CDRs de Nos. SEQ ID: 9, 10 y 11, o variantes de cualesquiera de las citadas secuencias; y/o una cadena pesada que comprende CDRs de Nos. SEQ ID: 12, 13 y 14 o variantes de cualesquiera de las citadas secuencias.

30 En una realización, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de anticuerpo que se une a un PD-1 humano que comprende: una cadena ligera que comprende CDRs de Nos. SEQ ID: 15, 16 y 17 o variantes de cualesquiera de las citadas secuencias; y/o una cadena pesada que comprende CDRs de Nos. SEQ ID: 18, 19 y 20 o variantes de cualquiera de las citadas secuencias.

35 También, se divulga un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende una región variable de cadena pesada de N°. SEQ ID: 5 o una de sus variantes; y/o una región variable de cadena ligera que comprende un N°. SEQ ID: 6 o una de sus variantes.

40 En una realización, la invención comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende una región variable de cadena pesada de N°. SEQ ID: 7 o una de sus variantes; y/o una región variable de cadena ligera que comprende un N°. SEQ ID: 8 o una de sus variantes.

45 En una realización, la invención comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que comprende una región variable de cadena pesada que comprende residuos de amino ácidos 20 a 139 de N°. SEQ ID: 30 o una de sus variantes; y/o una región variable de cadena ligera que comprende residuos de amino ácidos de 20 a 130 de N°. SEQ ID: 32 o una de sus variantes.

50 En una realización, la invención comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que comprende una región variable de cadena pesada que comprende residuos de amino ácidos 20 a 139 de N°. SEQ ID: 30 o una de sus variantes; y/o una región variable de cadena ligera que comprende residuos de amino ácidos de 20 a 130 de N°. SEQ ID: 33 o una de sus variantes.

55 En una realización, la invención comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que comprende una región variable de cadena pesada que comprende residuos de amino ácidos 20 a 139 de N°. SEQ ID: 30 o una de sus variantes; y/o una región variable de cadena ligera que comprende residuos de amino ácidos de 20 a 130 de N°. SEQ ID: 34 o una de sus variantes.

60 En una realización, la invención comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácidos que tiene al menos un 90 % de homología con residuos de amino ácidos de 20 a 139 de N°. SEQ ID: 30; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácidos que tiene al menos un 90 % de homología con residuos de amino ácidos de 20 a 130 de N°. SEQ ID: 32, 33 ó 34.

65 En una realización, la invención proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de anticuerpo que se une a un PD-1 humano que comprende: una cadena pesada que comprende residuos de amino ácidos de 20 a 466 de N°. SEQ ID: 31 o una de sus variantes, y/o una cadena ligera que comprende residuos de amino ácidos de 20 a 237 de N°. de SEQ ID: 36 o una de sus variantes.

- 5 En una realización, la invención proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de anticuerpo que se une a un PD-1 humano que comprende: una cadena pesada que comprende residuos de amino ácidos de 20 a 466 de N°. SEQ ID: 31 o una de sus variantes, y/o una cadena ligera que comprende residuos de amino ácidos de 20 a 237 de N°. de SEQ ID: 37 o una de sus variantes.
- 10 En una realización, la invención proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de anticuerpo que se une a un PD-1 humano que comprende: una cadena pesada que comprende residuos de amino ácidos de 20 a 466 de N°. SEQ ID: 31 o una de sus variantes, y/o una cadena ligera que comprende residuos de amino ácidos de 20 a 237 de N°. de SEQ ID: 38 o una de sus variantes.
- 15 En una realización, la invención proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de anticuerpo que se une a un PD-1 humano que comprende: una cadena pesada que comprende residuos de amino ácidos de 20 a 469 de N°. SEQ ID: 35 o una de sus variantes, y/o una cadena ligera que comprende residuos de amino ácidos de 20 a 237 de N°. de SEQ ID: 36 o una de sus variantes.
- 20 En una realización, la invención proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de anticuerpo que se une a un PD-1 humano que comprende: una cadena pesada que comprende residuos de amino ácidos de 20 a 469 de N°. SEQ ID: 35 o una de sus variantes, y/o una cadena ligera que comprende residuos de amino ácidos de 20 a 237 de N°. de SEQ ID: 37 o una de sus variantes.
- 25 En una realización, la invención proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de anticuerpo que se une a un PD-1 humano que comprende: una cadena pesada que comprende residuos de amino ácidos de 20 a 469 de N°. SEQ ID: 35 o una de sus variantes, y/o una cadena ligera que comprende residuos de amino ácidos de 20 a 237 de N°. de SEQ ID: 38 o una de sus variantes.
- 30 En cualquiera de las realizaciones anteriores, la variante del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención puede comprender una, dos o tres sustituciones de amino ácidos modificados de forma conservativa.
- 35 En cualquiera de las realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención puede comprender una región constante de cadena pesada o una de sus variantes, en la que la variante comprende hasta 20 sustituciones de amino ácidos modificados de forma conservativa; y/o una región constante de cadena ligera humana o una de sus variantes, en la que la variante comprende hasta 20 sustituciones de amino ácido modificados de forma conservativa. En algunas realizaciones, la variante puede comprender hasta 10 sustituciones de amino ácidos modificados de forma conservativa. En algunas realizaciones, la variante puede comprender hasta 5 sustituciones de amino ácidos modificados de forma conservativa. En algunas realizaciones, la variante puede comprender hasta 3 sustituciones de amino ácidos modificados de forma conservativa. En cualquiera de las realizaciones anteriores, la región constante de cadena pesada humana o su variante puede ser del isotipo IgG1 o IgG4.
- 40 En cualquiera de las realizaciones anteriores, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención se puede unir a PD-1 humano con un  $K_D$  de aproximadamente 100 pM o menor. En otra realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede unir a un PD-1 humano con un  $K_D$  de aproximadamente 30 pM o menor. En otra realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede unir al PD-1 humano con aproximadamente el mismo  $K_D$  que el anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de amino ácido N°. SEQ. ID: 31 y una cadena ligera que comprende la secuencia de amino ácido N°. SEQ. ID: 32. En otra realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede unir a PD-1 humano con aproximadamente el mismo  $K_D$  que el anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de amino ácido N°. SEQ ID: 31 y una cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido de N°. SEQ ID: 33.
- 45 En cualquiera de las reivindicaciones descritas, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención se puede unir a PD-1 humano con una  $k_{asoc}$  de aproximadamente  $7,5 \times 10^5$  1/M·s o más rápida. En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede unir a PD-1 humano con una  $k_{asoc}$  de aproximadamente  $1 \times 10^6$  1/M·s o más rápida.
- 50 En cualquiera de las realizaciones anteriormente descritas, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se puede unir a un PD-1 humano con una  $k_{disoc}$  de aproximadamente  $2 \times 10^{-5}$  1/s o más lenta. En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede unir a PD-1 humano con una  $k_{disoc}$  de aproximadamente  $2,7 \times 10^{-5}$  1/s o más lenta. En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede unir a PD-1 humano con una  $k_{disoc}$  de aproximadamente  $3 \times 10^{-5}$  1/s o más lenta.
- 55 Los valores de  $K_D$ ,  $k_{asoc}$  y  $k_{disoc}$  se pueden medir usando cualquier procedimiento apropiado. En realizaciones preferidas, se mide la constante de disociación usando interferometría de bio-luz (por ejemplo, el procedimiento ForteBio Octet descrito en el Ejemplo 2). En otras realizaciones preferidas, se puede medir la constante de disociación usando resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, Biacore) o Kinexa.
- 60 Además, en cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención puede bloquear la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con un  $IC_{50}$  de

aproximadamente 1 nM o menor. El bloqueo de la unión de ligando se puede medir y se puede calcular el IC<sub>50</sub> usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, los procedimientos FACS o FMAT descritos en los ejemplos siguientes.

5 La invención también comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que compite para unir un epítipo sobre PD-1 humano con cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente, y que bloquea la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con un IC<sub>50</sub> de aproximadamente 1 nM o menor.

10 La invención también comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que compite para unir un epítipo sobre PD-1 humano con cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente, y que se une a PD-1 humano con un K<sub>D</sub> de aproximadamente 100 pM o menor. En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a PD-1 humano con K<sub>D</sub> de aproximadamente 30 pM o menor.

15 La invención también comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que compite para unir un epítipo sobre PD-1 humano con cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente, y que se une a PD-1 humano con aproximadamente la misma K<sub>D</sub> que un anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de amino ácido N°. SEQ ID: 31 y una cadena ligera que comprende la secuencia de amino ácido N°. SEQ ID: 32.

20 La invención también comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que compite para unir un epítipo sobre PD-1 humano con cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente, y que se une a PD-1 humano con aproximadamente la misma K<sub>D</sub> que un anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de amino ácido N°. SEQ ID: 31 y una cadena ligera que comprende la secuencia de amino ácido N°. SEQ ID: 33.

25 La invención también comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que compite para unir un epítipo sobre PD-1 humano con cualquiera de los anticuerpos anteriormente descritos, y que se une a PD-1 con una k<sub>asoc</sub> de aproximadamente 7,5 x 10<sup>5</sup> 1/M·s o más rápida. En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede unir a PD-1 humano con una k<sub>asoc</sub> de aproximadamente 1 x 10<sup>6</sup> 1/M·s o más rápida.

30 La invención también comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que compite para unir un epítipo sobre PD-1 humano con cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente, y que se une a PD-1 humano con una k<sub>disoc</sub> de aproximadamente 2 x 10<sup>-5</sup> 1/s o más lenta. En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede unir a PD-1 humano con una k<sub>disoc</sub> de aproximadamente 2,7 x 10<sup>-5</sup> 1/s o más lenta. En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede unir a PD-1 humano con una k<sub>disoc</sub> de aproximadamente 3 x 10<sup>-5</sup> 1/s o más lenta.

35 En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmentos de anticuerpo de la invención son anticuerpos híbridos o fragmentos de anticuerpos híbridos.

40 En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmentos de anticuerpo de la invención son anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmentos de anticuerpo de la invención son anticuerpos humanizados o fragmentos de anticuerpos humanizados.

45 En algunas realizaciones, los fragmentos de anticuerpo de la invención son fragmentos de anticuerpo Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv o F(ab')<sub>2</sub>.

En algunas realizaciones, los fragmentos de anticuerpo de la invención son diacuerpos.

50 La invención también comprende anticuerpos que comprenden uno cualquiera del anticuerpo o los fragmentos de anticuerpo descritos anteriormente que se unen a PD-1 humano.

55 En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-1 aislados y los fragmentos de anticuerpo de la invención aumentan la activación de células T medida gracias a medios típicos conocidos por el experto en la técnica (incluyendo, pero sin limitación, mayor proliferación de células inmunológicas, mayor secreción de citoquina o expresión de marcadores de activación tales como CD25 y/o CD69).

60 En cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención puede mejorar la respuesta inmunológica tras estimulación con Enterotoxina B de Staphylococcus o Toxida de Tétano ex vivo o in vivo. Se puede determinar la mayor activación inmunológica usando procedimientos conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo, cuantificando la proliferación de células inmunológicas (tales como células T) o la producción de citoquinas por parte de las células inmunológicas (por ejemplo, la producción de IFN $\gamma$  o IL-2 por parte de las células T).

65 La invención también comprende ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos anti-PD-1 y los fragmentos de anticuerpos de la invención. Se incluyen en la invención ácidos nucleicos que codifican a una cualquiera de las

secuencias de amino ácidos descritas en Nos. de SEQ ID: 7 a 8, 15 a 20 y 30-38 (con o sin secuencias predominantes). También se incluyen en la invención ácidos nucleicos que comprenden Nos. de SEQ ID: de 3 a 4 y de 21 a 29 (con o sin ácidos nucleicos que codifican las secuencias predominantes).

5 La invención también comprende células y vectores de expresión que comprenden ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpo de la invención. Además, la invención comprende un procedimiento para producir un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de la invención que comprende: (a) someter a cultivo la célula hospedadora que comprende ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención en un medio de cultivo en condiciones en las que se expresa la secuencia de ácido nucleico, produciendo de este modo polipéptidos que comprenden las regiones variables de cadena ligera y pesada; y (b) recuperar los polipéptidos a partir de la célula hospedadora o medio de cultivo.

10 La invención también comprende composiciones que comprenden un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención en combinación con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 La invención también comprende un procedimiento para aumentar la actividad de células inmunológicas, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención. En una realización, se puede usar el procedimiento para tratar cáncer. En otra realización, se puede usar el procedimiento para tratar una infección o enfermedad infecciosa. En otra realización, se puede usar el procedimiento como adyuvante de vacunas. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además administrar un segundo agente terapéutico o modalidad de tratamiento.

20 En algunas realizaciones, la invención comprende un procedimiento para aumentar la actividad de una célula inmunológica, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención, y que comprende además medir la activación de células T *ex vivo* en una muestra procedente del sujeto, en el que un aumento en la actividad de las células T indica que se debe continuar el tratamiento. En otras realizaciones, la invención comprende un procedimiento para aumentar la actividad de una célula inmunológica, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención, y que además comprende medir la activación de células T *ex vivo* en una muestra procedente del cuerpo del sujeto, en el que un aumento de la actividad de las células T predice la posibilidad de que el tratamiento resulte satisfactorio. En una realización, el aumento de la actividad de células T viene determinado por medio de: (i) medición de la producción inducida por SEB de una o más citoquinas seleccionadas entre el grupo que consiste en IL-2; TNF $\alpha$ , IL-17, IFN $\gamma$ , GM-CSF, RANTES, IL-6, IL-8, IL-5 e IL-13; o (ii) medición de la producción inducida por TT de una citoquina seleccionada entre el grupo que consiste en: IL-2, TNF $\alpha$ , IL-17, IFN $\gamma$ , GM-CSF, RANTES, IL-6, IL-8, IL-5 y IL-13.

25 La invención también comprende el uso de un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de anticuerpo de la invención para la preparación de un medicamento para aumentar la respuesta inmunológica.

30 La invención también comprende el uso de un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de anticuerpo de la invención para la preparación de un medicamento para tratar cáncer.

35 La invención también comprende el uso de un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de anticuerpo de la invención como coadyuvante de vacuna.

40 La invención también comprende un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de anticuerpo de la invención, unido a un agente terapéutico tal como una toxina bacteriana o una radiotoxina. Ejemplos no limitantes de agentes citotóxicos incluyen taxol, citochalasina B, mitomicina, etopósido y vincristina u otros antimetabolitos, agentes alquilantes, antibióticos y antimetabólicos.

45 La invención también comprende un procedimiento para aumentar la actividad, o reducir la modulación a la baja, de una célula inmunológica poniendo en contacto la célula inmunológica con uno cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención. Este procedimiento se podría usar para tratar cáncer o enfermedades infecciosas (tales como infecciones víricas crónicas) o se podría usar como adyuvante para un profiláctico o vacuna terapéutica.

50 La invención también comprende un procedimiento para aumentar la respuesta inmunológica a un antígeno, que comprende poner en contacto una célula inmunológica con un antígeno y un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de anticuerpo tal como un aumento o mejora de la respuesta inmunológica al antígeno. Este procedimiento se podría llevar a cabo *in vivo* (en un sujeto) o *ex vivo*.

55 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de anticuerpo se puede combinar con un segundo agente terapéutico o modalidad de tratamiento. En una realización, se puede combinar un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de anticuerpo con tratamientos de cáncer que implican la aplicación de citoquinas recombinantes o factores inmunológicos segregados. Ejemplos no limitantes de las combinaciones incluyen combinar un anticuerpo anti-PD-1 con IL-2 recombinante o IFN $\alpha$ 2 recombinante para el tratamiento de melanoma o carcinoma de células

renales. IL-2 recombinante mejora la excrecencia de las células T en pacientes con cáncer. IFN $\alpha$ 2 recombinante inhibe la proliferación celular de cáncer pero también aumenta la expresión de los ligandos inhibidores para PD-1 en células cancerígenas, células que presentan antígenos y otras células somáticas en los pacientes tratados. Se puede combinar anti-PD-1 con otras citoquinas que se podrían considerar útiles para el tratamiento de cáncer o enfermedades infecciosas.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-1 o fragmentos de anticuerpo se pueden combinar con una vacuna para evitar o tratar cáncer o una enfermedad infecciosa. Como ejemplo no limitante, se podría combinar anti-PD-1 con una proteína, péptido o vacuna de ADN que contenga uno o más antígenos que sean relevantes para el cáncer o infección objeto de tratamiento, o una vacuna que comprenda células dendríticas pulsadas con dicho antígeno a). Otra realización incluye el uso de un anti-PD-1 con una célula cancerígena (atenuada) o vacunas víricas completas. Una realización implica una combinación de una terapia anti-PD-1 con una vacuna para el cáncer de células completas que se somete a estudio técnico para segregar GM-CSF.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-1 o fragmentos de anticuerpo se pueden combinar con el tratamiento que se considera convencional en cuanto a asistencia médica de cáncer o una enfermedad infecciosa. El fundamento para dichas combinaciones es que la mayor activación inmunológica concurrente por medio de PD-1 induce o facilita la respuesta clínica inicial frente al patrón de tratamiento asistencial, e induce la respuesta clínica duradera y el control inmunológico a largo plazo de la enfermedad.

En una realización, el tratamiento con anticuerpos anti-PD-1 o fragmentos de anticuerpo se puede combinar con quimioterapia. La quimioterapia que usa agentes citotóxicos tiene como resultado la muerte de las células cancerígenas aumentando la liberación de antígenos tumorales. Dicha disponibilidad mayor de antígeno tumoral tiene como resultado la sinergia con el tratamiento anti-PD-1. Se proporciona un ejemplo no limitante por medio del uso de decarbazina o temozolomida para el tratamiento de melanoma y gemcitabina para el cáncer de páncreas.

En una realización, el tratamiento con anticuerpos anti-PD-1 o fragmentos de anticuerpo se puede combinar con radioterapia. La radioterapia induce la muerte de las células cancerígenas y aumenta la disponibilidad de antígenos tumorales para la presentación y activación de células inmunológicas.

En otra realización, el tratamiento con anticuerpos anti-PD-1 o fragmentos de anticuerpo se puede combinar con cirugía para retirar las células cancerígenas de un sujeto.

En otras realizaciones, los anticuerpos anti-PD-1 o fragmentos de anticuerpos se pueden combinar con terapias que pueden dar como resultado el bloqueo de PD-1 incluyendo agentes diana usados para la privación o inhibición de angiogénesis o proteínas diana activas en células tumorales, todo ello dando como resultado una mayor muerte de células tumorales y disponibilidad de antígenos tumorales estimuladores inmunológicos. En combinación con un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de anticuerpo, una mayor activación de células T puede dar como resultado un control inmunológico duradero del cáncer.

En algunas realizaciones se puede combinar un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de anticuerpo con otro anticuerpo terapéutico útil para el tratamiento de cáncer o una enfermedad infecciosa. Se proporciona un ejemplo no limitante por medio de la combinación de un anti-PD-1 con un anticuerpo que se dirige a Her2/neu o que se dirige al receptor EGF. En otro ejemplo no limitante, se combina un anticuerpo PD-1 o un fragmento de anticuerpo con un tratamiento que dirige a VEGF o a sus receptores. En otra realización, se combina un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de anticuerpo con anti-CTLA-4. En otro ejemplo no limitante, se combina anti-PD-1 con un anticuerpo que se dirige a RSV.

### **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1A y 1B muestran los resultados de los experimentos que demuestran que los anticuerpos inmovilizados a partir de sobrenadantes de hidridoma son capaces de reducir la secreción de IL-2 por medio de células Jurkat E6.2.11 estimuladas con anti-CD3 inmovilizado y anti-CD28 soluble.

La Figura 2 muestra el resultado de experimentos que demuestran que los anticuerpos frente a PD-1 humano se unen a PD-1. La Figura 2A es un gráfico que muestra la unión dependiente de la dosis de anticuerpos anti-PD-1 a PD-1/Fc purificado en ELISA de proteínas. La Figura 2B es un gráfico que muestra la unión dependiente de la dosis de anticuerpos anti-PD-1 a PD-1 expresados sobre la superficie de células CHO sometidas a transfección con hPD-1 en un CELISA.

La Figura 3 muestra los resultados de los experimentos de FMAT que demuestran que los anticuerpos frente a PD-1 compiten para unir PD-L1 y PD-L2 a células CHO sometidas a transfección con PD-1 humano. La Figura 3A es un gráfico que muestra la inhibición dependiente de la dosis de PD-L1 por medio de hPD-1,08A y hPD-1,09A y en menor medida por medio de J116. La Figura 3B es un gráfico que muestra la inhibición dependiente de la dosis de PD-L2.



- 5 La Figura 4 es un gráfico de barras que muestra los resultados de los experimentos que demuestran que se mejora la producción de IL-2 estimulada con SEB por medio de células sanguíneas de donante sano en presencia de anticuerpos anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-CTLA-4. Las barras muestran el número medio de veces de aumento de IL-2 para los donantes ( $\pm$  SEM). Los números debajo de cada barra indican el número de donantes representados. El (m)IgG1 de ratón es el control de isotipo para anti-PD-1,08A (08A), anti-PD-1,09A (09A) y anti-PD-L1. El (m)IgG2a de ratón es el control de isotipo para anti-CTLA-4. Se compara cada valor de IL-2 con su propio control para determinar el cambio en número de veces (un cambio en número de veces de IL-2 que adopta un valor de 4 significa un aumento de 400 % en la producción de IL-2 en comparación con SEB solo). Ninguno = SEB solo.
- 10 La Figura 5 muestra los resultados de los experimentos que demuestran que los anticuerpos anti-PD-1 favorecen la proliferación de células T y la secreción de citoquinas (IL-2 y IFN $\gamma$ ) cuando se estimulan con el toxoide de tétano de antígeno de recuerdo. La Figura 5 muestra la secreción de IFN $\gamma$  dependiendo de la concentración.
- 15 La Figura 6 es un gráfico que muestra las tasas de  $k_{asoc}$  y  $k_{disoc}$  para anticuerpos anti-PD-1 medidas por medio de interferometría de bio-luz. Las líneas diagonales indican los valores de  $K_D$  calculados teóricos. Los anticuerpos se listan a la derecha por medio de  $K_D$  en orden ascendente.
- 20 La Figura 7 es un gráfico de barras de los resultados de los experimentos que demuestran que se aumenta la producción de IL-2 estimulada con SEB por parte de células sanguíneas de donantes sanos en presencia de 25 ug/ml de anticuerpos anti-PD-1 murinos (091) o humanizados (h409A11, h409A16 y h409A17). Las barras muestran el aumento medio en número de veces en IL-2 para los tres donantes (+ SEM). (m) IgG1 de ratón es el control de isotipo para anti-PD-1,09A (09A). (h) IgG4 humano es el control de isotipo para los anticuerpos h409A11, h409A16 y h409A17. Se compara cada valor de IL-2 con su propio control para determinar el cambio en número de veces.
- 25 Ninguno = SEB solo.

### **Descripción detallada de la invención**

#### **Abreviaturas y definiciones**

- 30 A lo largo de la memoria descriptiva detallada y los ejemplos de la invención se usan las siguientes abreviaturas:

hPD-1,08A	Anticuerpo anti-hPD-1 monoclonal murino
hPD-1,09A	Anticuerpo anti-hPD-1 monoclonal murino
08A-VH	VH aislado a partir de hibridoma hPD-1,08A
08A-VK	VK aislado a partir de hibridoma hPD-1,08A
09A-VH	VH aislado a partir de hibridoma hPD-1,09A
09A-VK	VK aislado a partir de hibridoma hPD-1,09A
c109A	Versión híbrida de IgG1 de anticuerpo hPD1,09A
c109A-VH	Cadena pesada híbrida, que consiste en 09A-VH murino condensado con una región constante de IgG1
c109A-VK	Cadena pesada híbrida, que consiste en 09A-VK murino condensado con una región constante kappa
109A-H	Secuencia de cadena pesada de IgG1 09A humanizado con cero retro mutaciones
409A-H	Secuencia de cadena pesada de IgG4-09A humanizado con cero retro mutaciones FWR
K09A-L-11	Secuencia 09A-kappa humanizada con armazón que tienen originalmente una longitud CDR1 de 11 AAs
K09A-L-16	Secuencia 09A-kappa humanizada con armazón que tienen originalmente una longitud CDR1 de 16 AAs
K09A-L-17	Secuencia 09A-kappa humanizada con armazón que tienen originalmente una longitud CDR1 de 17 AAs
h409A11	Versión de IgG4 humanizada de anticuerpo 09A que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de 409A-H y una cadena ligera que comprende la secuencia de K09A-L-11
h409A16	Versión de IgG4 humanizada de anticuerpo 09A que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de 409A-H y una cadena ligera que comprende la secuencia de K09A-L-16
h409A17	Versión de IgG4 humanizada de anticuerpo 09A que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de 409A-H y una cadena ligera que comprende la secuencia de K09A-L-17
hPD-1	proteína PD-1 humanizada
CDR	Región que determina la complementariedad en las regiones variables de inmunoglobulina, definida usando el sistema de numeración de Kabat
EC50	concentración que tiene como resultado una unión o eficacia de 50 %
ELISA	Ensayo de inmunoabsorbente unido a enzima
FW	Región de armazón de anticuerpo: las regiones variables de inmunoglobulina que excluyen las regiones de CDR
HRP	peroxidasa de rábano rusticano
IL-2	interleucina 2
IFN	interferón
IC50	concentración que tiene como resultado una inhibición de 50 %

IgG	Inmunoglobulina G
Kabat	Una alineación de inmunoglobulina y sistema de numeración guiado por Elvin A Kabat
mAb	anticuerpo monoclonal
MES	Acido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
NHS	Suero humano normal
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
SAM	Anticuerpo policlonal anti-ratón (IgG) de oveja
región V	El segmentos de las cadenas de IgG que es variable en la secuencia entre los diferentes anticuerpos. Se extiende hasta el residuo 109 de Kabat en la cadena ligera y 113 en la cadena pesada
VH	Región variable de cadena pesada de inmunoglobulina
VK	Región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina

"Anticuerpo" se refiere a cualquier forma de anticuerpo que exhibe la actividad biológica deseada, tal como la unión inhibidora de un ligando a su receptor, o por medio de la señalización inducida por ligando inhibidor de un receptor. De este modo, "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y específicamente abarca, pero sin limitarse a, anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales y anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos).

"Fragmento de anticuerpo" y "fragmento de unión de anticuerpo" significan fragmentos de unión a anticuerpo y análogos de un anticuerpo, que normalmente incluyen al menos una parte de la unión de antígeno o regiones variables (por ejemplo, una o más CDRs) del anticuerpo parental. Un fragmento de anticuerpo parental retiene al menos parte de la especificidad de unión del anticuerpo parental. Normalmente, un fragmento de anticuerpo retiene al menos 10 % de la actividad de unión parental cuando se expresa la actividad en base molar. Preferentemente, un fragmento de anticuerpo retiene al menos 20%, 50%, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % o más de la afinidad de unión del anticuerpo por la diana. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitarse a, fragmentos Fab, Fab', F (ab')<sub>2</sub> y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena individual; por ejemplo, sc-Fv, unicuerpos (tecnología de Genmab); nanocuerpos (tecnología de Domantis); anticuerpos de dominio (tecnología de Ablynx); y anticuerpos multiespecíficos formados partir de fragmentos de anticuerpo. Se revisan las variantes de anticuerpo sometido a estudio técnico en Holliger y Hudson (2005) Nat. Biotechnol. 23:1126-1136.

Un "fragmento Fab" está formado por una cadena ligera y C<sub>H1</sub> y las regiones variables de una cadena pesada. La cadena pesada de la molécula de Fab no puede formar un enlace de disulfuro con otra molécula de cadena pesada.

Una región "Fc" contiene dos fragmentos de cadena pesada que comprenden los dominios C<sub>H1</sub> y C<sub>H2</sub> de un anticuerpo. Los dos fragmentos de cadena pesada se mantienen juntos por medio de dos o más enlaces de disulfuro y por medio de interacciones hidrófobas de los dominios CH3.

Un "fragmento Fab" contiene una cadena ligera y una parte de una cadena pesada que contiene el dominio VH y el dominio CH1 y también la región entre los dominios C<sub>H1</sub> y C<sub>H2</sub>, de manera que se puede formar un enlace de disulfuro intercatenario entre las dos cadenas pesadas de los dos fragmentos Fab' para formar una molécula F(ab')<sub>2</sub>.

Un "fragmento F(ab')<sub>2</sub>" contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una parte de la región constante entre los dominios C<sub>H1</sub> y C<sub>H2</sub>, de manera que se forma un enlace disulfuro intercatenario entre las dos cadenas pesadas. De este modo, un fragmento F(ab')<sub>2</sub> está formado por dos fragmentos Fab' que se mantienen unidos por medio de un enlace disulfuro entre las dos cadenas pesadas.

La "región Fv" comprende las regiones variables a partir de las cadenas tanto pesadas como ligeras, pero carece de regiones constantes.

Un "anticuerpo Fv de cadena individual" (o "anticuerpo scFv") se refiere a fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de un anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una cadena de polipéptido individual. De manera general, el polipéptido Fv comprende además un agente de unión de polipéptido entre los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que permite que scFv forme la estructura deseada para la unión del antígeno. Para una revisión de scFv, véase Pluckthun (1994) THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315. Véase también, la publicación de solicitud de patente internacional N°. WO 88/01649 y las patentes de EE.UU. Nos. 4.946.778 y 5.260.203.

Un "diacuerpo" es un fragmento de anticuerpo pequeño con dos sitios de unión a antígeno. El fragmento comprende un dominio (V<sub>H</sub>) variable de cadena pesada conectado a un dominio (V<sub>L</sub>) variable de cadena ligera en la misma cadena de polipéptido (V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> o V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>). Por medio del uso de un agente de enlace que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se provoca que los dominios se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 93/11161 y Holliger y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448.

Un "fragmento de anticuerpo de dominio" es un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional que contiene únicamente la región variable de una cadena pesada o la región variable de una cadena ligera. En algunos casos, se unen covalentemente dos o más regiones V<sub>H</sub> con un agente de enlace de péptido para crear un fragmento de anticuerpo de dominio bivalente. Las dos regiones V<sub>H</sub> de un fragmento de anticuerpo de dominio bivalente se pueden dirigir a antígenos iguales o diferentes.

Un fragmento de anticuerpo de la invención puede comprender una parte suficiente de la región constante para permitir la dimerización (o multimerización) de cadenas ligeras que se presentan capacidad reducida de unión de disulfuro, por ejemplo cuando se altera al menos una de las cisteínas de bisagra que normalmente se ven implicadas en la unión de disulfuro entre cadenas pesadas, como se describe en la presente memoria. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, uno que comprenda la región Fc, conserva al menos una de las funciones biológicas que normalmente se asocian a la región Fc cuando se encuentra presente en un anticuerpo intacto, tal como la unión de FcRn, modulación de la vida media del anticuerpo, función ADCC y/o unión de complementos (por ejemplo, cuando el anticuerpo tiene un perfil de glucosilación necesario para la función ADCC o la unión de complementos).

El término anticuerpo "híbrido" se refiere a anticuerpos en los cuales una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homólogo a las secuencias correspondientes de anticuerpos procedentes de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es(son) idéntica(s) a u homóloga(s) a las secuencias correspondientes de anticuerpos procedentes de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como también fragmentos de dichos anticuerpos, con tal de que exhiban la actividad biológica deseada (Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N<sup>o</sup>. 4.816.567 Y Morrison y col. 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murino) son anticuerpos híbridos que contienen una secuencia mínima procedente de una inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpos de receptor) en los cuales se sustituyen los residuos procedentes de una región hipervariable del receptor por residuos procedentes de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como un ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de armazón (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo de receptor y anticuerpo de donante. Estas modificaciones se llevan a cabo para refinar más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado, comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente dos dominios variables, en los cuales todo o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina humana y todas o sustancialmente todas las regiones de FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. De manera opcional, el anticuerpo humanizado también comprende al menos una parte de una región (Fc) constante de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones y col., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann y col., Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992).

La expresión "región hipervariable", según se usa en la presente memoria, se refiere a residuos de amino ácido de un anticuerpo que son responsables de la unión de antígeno. La región hipervariable comprende residuos de amino ácido procedentes de una "región que determina la complementariedad" o "CDR", definida por la alineación de secuencias, por ejemplo residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) del dominio variable de cadena ligera (y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) del dominio variable de cadena pesada; véase Kabat y col., 1991, Sequences of proteins of Immunological Interest, 5<sup>a</sup> ed. Public Health Services, National Institutes of Health, Bethesda, Md. y/o los residuos procedentes de un "bucle hipervariable" (HVL), como se definen estructuralmente, por ejemplo, residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; véase Chothia y Leskl, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917. Los residuos de "armazón" o "FR" son los residuos de dominio variable diferentes de los residuos de región hipervariable que se definen en la presente memoria.

Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo que posee una secuencia de amino ácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un humano y/o que se ha generado usando cualesquiera de las técnicas para la preparación de anticuerpos humanos como se describe en la presente memoria. Esta definición excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico y terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos y no proteínicos. En algunas realizaciones, el anticuerpo se purifica (1) hasta más de 95 % en peso del anticuerpo, como viene determinado por medio del procedimiento de Lowry, y del modo más preferido más de 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de amino ácidos internos o N-terminal por medio del uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta homogeneidad por medio de SDS-PAGE usando condiciones reductoras y no reductoras empleando azul de Coomassie o, preferentemente, tinte de plata. El

anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ con células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no está presente. No obstante, de manera común, se puede preparar el anticuerpo aislado por medio de al menos una etapa de purificación.

5 Un molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula contaminante de ácido nucleico que comúnmente se asocia a la fuente natural de ácido nucleico del anticuerpo. La molécula de ácido nucleico aislada es diferente de la forma o configuración en la cual se encuentra en la naturaleza. Por tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico tal y como existe en las células naturales. No obstante, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de  
10 ácido nucleico presente en las células que expresan comúnmente el anticuerpo en las que, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico se encuentra en una posición cromosómica diferente de la de las células naturales.

La expresión "anticuerpo monoclonal" según se usa en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que  
15 comprenden la población son idénticos exceptuando las posibles mutaciones que ocurren de forma natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un sitio antigénico individual. Además, al contrario que las preparaciones de anticuerpo convencionales (policlonales) que normalmente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante individual del antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene a partir de la población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no se interpreta como que requieren la producción del anticuerpo por medio de cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, se pueden preparar los anticuerpos monoclonales a usar de acuerdo con la presente invención por medio del procedimiento de hidridoma descrito por primera vez por Kohler y col, 1975, Nature 256: 495 o se puede preparar por medio de procedimientos de ADN recombinante (véase, por  
20 ejemplo, la patente de EE.UU. Nº. 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar a partir de bibliotecas de anticuerpos de bacteriófagos usando técnicas descritas en Clackson y col, 1991, Nature 352: 624-628 y Marks y col., 1991, J. Mol. Biol. 222: 581-597, por ejemplo. De manera específica, los anticuerpos monoclonales de la presente memoria incluyen anticuerpos "híbridos".

30 Según se usa en la presente memoria, la expresión "células inmunológicas" incluye células que son de origen hematopoyético y que juegan un papel en la respuesta inmunológica. Las células inmunológicas incluyen linfocitos, tales como células B y células T; linfocitos citolíticos naturales, células mieloides, tales como monocitos, macrófagos, eosinófilos, mastocitos, basófilos y granulocitos.

35 Según se usa en la presente memoria, un "inmunoconjugado" se refiere a un anticuerpo anti-PD-1, o uno de sus fragmentos, conjugado a un resto terapéutico, tal como una toxina bacteriana, un fármaco citotóxico o una radiotoxina. Se pueden conjugar los restos tóxicos a anticuerpos de la invención usando procedimientos disponibles en la técnica.

40 En la presente memoria, se usan los siguientes códigos de ambigüedad de ácido nucleico: R = A o G; Y = C o T; M = A o C; K = G o T; S = G o C; y W = A o T.

Según se usa en la presente memoria, una "variante" de secuencia se refiere a una secuencia que difiere de la secuencia divulgada en uno o más residuos de amino ácido pero que conserva la actividad biológica de la molécula  
45 resultante.

"Variantes conservativamente modificadas" o "sustitución de amino ácido conservativa" se refiere a sustituciones de amino ácidos que son conocidas por los expertos en la técnica y que, generalmente, se puede llevar a cabo sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en esta técnica reconocerán que, en general, las sustituciones de amino ácido individual en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, por ejemplo, Watson y col., Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4ª edición 1987)). Preferentemente, dichas sustituciones ejemplares se preparan de acuerdo con lo que se explica a continuación:

55

Sustituciones de Amino Ácido Conservativas Ejemplares

Residuo Original	Sustitución conservativa
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala

His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M) Phe (F)	Leu; Ile; Tyr Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

Según se usa en la presente memoria, "% de identidad" entre dos secuencias se refiere a una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = nº de posiciones idénticas/nº de posiciones totales x 100), teniendo en cuenta el número de intersticios, y la longitud de cada intersticio, que es necesario introducir para la alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre las dos secuencias se puede conseguir usando un algoritmo matemático. Por ejemplo, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias de amino ácido se puede determinar usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)) que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0) usando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de intersticio de 12 y una penalización de intersticio de 4. Además, se puede determinar el porcentaje de identidad entre las dos secuencias de amino ácidos usando un algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de soporte lógico GCG (disponible en [www.gcg.com](http://www.gcg.com)), bien usando una matriz Blossum 62 o bien usando una matriz PAM250, y un peso de intersticio de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ó 4 y una longitud de intersticio de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

Según se usa en la presente memoria, el término "aproximadamente" se refiere a un valor que se encuentra dentro del intervalo de error aceptable para el valor particular, determinado por el experto ordinario en la técnica. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar 1 o más de 1 desviación estándar para la práctica de la técnica. Alternativamente, "aproximadamente" o "comprende esencialmente" puede significar un intervalo de hasta 20 %. Además, en particular con respecto a los sistemas biológicos o procesos, los términos pueden significar hasta un orden de magnitud o hasta 5 veces un valor. Cuando se proporcionan valores particulares en la solicitud y en las reivindicaciones, a menos que se afirme lo contrario, se debería asumir que el significado de "aproximadamente" o "comprende esencialmente" se encuentra dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular.

Se une "específicamente", cuando se hace referencia a un ligando/receptor, anticuerpo/antígeno, u otro par de unión, indica una reacción de unión que determina la presencia de la proteína, por ejemplo, PD-1, en una población heterogénea de proteínas y/o otras sustancias biológicas. De este modo, en las condiciones designadas, un ligando/antígeno especificado se une a un receptor/anticuerpo particular y no se une a una cantidad significativa de otras proteínas presentes en la muestra.

"Administración" y "tratamiento", según se aplica a un animal, humano, sujeto experimental, célula, tejido, órgano o fluido biológico, se refiere a la puesta en contacto de una sustancia farmacéutica exógena, sustancia terapéutica, agente diagnóstico o composición para el animal, humano, sujeto, células, tejido, órgano o fluido biológico. "Administración" y "tratamiento" puede hacer referencia, por ejemplo, a procedimientos terapéuticos, farmacocinéticos, diagnósticos, de investigación y experimentales. El tratamiento de una célula engloba poner en contacto un reactivo con la célula, así como también poner en contacto el reactivo con un fluido, en el que el fluido está en contacto con la célula. "Administración" y "tratamiento" también significan tratamientos *in vitro* y *ex vivo*, por ejemplo, de una célula, por medio de un reactivo, diagnóstico, composición de unión o por medio de otra célula.

"Cantidad eficaz" engloba una cantidad suficiente para aliviar o prevenir un síntoma o signo de la enfermedad médica. Cantidad eficaz también significa una cantidad suficiente para permitir o facilitar la diagnosis. Una cantidad eficaz para un sujeto particular puede variar dependido de factores tales como la enfermedad objeto de tratamiento, la salud global del paciente, la ruta del procedimiento y la dosis de administración y la gravedad de los efectos secundarios. Una cantidad eficaz puede ser la dosis máxima o protocolo de dosificación que evite los efectos secundarios significativos o efectos tóxicos. El efecto tiene como resultado una mejora de la medición de diagnóstico o parámetro en al menos 5 %, normalmente al menos 10 %, más normalmente al menos 20 %, de la manera más normal al menos 30 %, preferentemente al menos 40 %, más preferentemente al menos 50 %, del modo más preferido al menos 60 %, de manera ideal al menos 70 %, de manera más ideal al menos 80 %, y del modo más ideal al menos 90 %, en el que 100 % se define como el parámetro de diagnóstico mostrado por un sujeto normal (véase, por ejemplo, Maynard y col. (1996) A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, FL; Dent (2001) Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., Londres, Reino Unido).

### Anticuerpos Monoclonales

Los anticuerpos monoclonales para PD-1 se pueden preparar de acuerdo con el conocimiento y la experiencia en la técnica para inyectar un antígeno PD-1 a sujetos de ensayo y posteriormente aislar hibridomas que expresan anticuerpos, teniendo las secuencia o las características funcionales deseadas.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se somete a secuenciación usando procedimientos convencionales (por ejemplo, por medio del uso de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales). Las células de hidridoma sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que posteriormente se someten a transfección en el interior de células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células de COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que, de otro modo, no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. A continuación, se describe la producción recombinante de anticuerpos con más detalle.

En otra realización, se pueden aislar los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos a partir de bibliotecas de bacteriófagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty y col., 1990 *Nature*, 348:552-554. Clackson y col., 1991, *Nature*, 352:624-628 y Marks y col., 1991, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de bacteriófagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo de nM) por medio de redistribución de cadena (Marks y col., 1992, *Bio/technology*, 10: 779-783) así como también infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para la construcción de bibliotecas de bacteriófagos muy amplias (Waterhouse y col., 1993, *Nuc. Acids. Res.* 21: 2265-2266). De este modo, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpo monoclonal para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

### Anticuerpos Híbridos

El ADN de anticuerpo también se puede modificar, por ejemplo, por medio de sustitución de la secuencia de codificación para los dominios constantes humanos de cadena pesada y cadena ligera en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de EE.UU. N°. 4.816.567; Morrison y col., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851) o por medio de unión covalente a la secuencia de codificación de inmunoglobulina de todo o parte de la secuencia de codificación para el material que no es de inmunoglobulina (por ejemplo, dominios de proteína). Normalmente, dicho material que no es de inmunoglobulina está sustituido por los dominios constantes de un anticuerpo, o está sustituido por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente híbrido que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

### Anticuerpos Humanos y Humanizados

Un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de amino ácidos a partir de una fuente que no es humana. Los residuos de amino ácidos no humanos, con frecuencia, son denominados residuos de "importación", y típicamente procedente de un dominio variables de "importación". La humanización se puede llevar a cabo generalmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col., 1986, *Nature*, 321:522.525; Riechmann y col., 1988, *Nature*, 332: 323-327; Verhoeyen y col., 1988, *Science* 239; 1534-1536) por medio de sustitución de las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano por secuencias de CDR o CDRs de roedor. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos híbridos (patente de EE.UU. N°. 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable intacto se ha sustituido por la correspondiente secuencia procedente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los cuales se sustituyen algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR por residuos procedentes de sitios análogos en anticuerpos no humanos, por ejemplo, de roedor.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, a usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir el carácter antigénico. De acuerdo con el denominado procedimiento del "mejor encaje", se contrasta la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor frente a una biblioteca completa de secuencias conocidas de dominio variable humano. A continuación, se acepta la secuencia humana que se encuentra más próxima a la del roedor como los armazones humanos (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims y col., 1987, *J. Immunol.* 151: 2296; Chothia y col., 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901). Otro procedimiento usa un armazón particular procedente de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Se puede usar el mismo armazón para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter y col., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285; Presta y col., 1993, *J. Immunol.* 151:2623).

También es importante que los anticuerpos se humanicen con retención de elevada afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo con un procedimiento preferido, se

preparan anticuerpos humanizados por medio de un proceso de análisis de secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tri-dimensionales de secuencias parentales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tri-dimensionales se encuentran comúnmente disponibles y resultan familiares para los expertos en la técnica. Los programas de ordenador se encuentran disponibles e ilustran y muestran estructuras conformacionales tri-dimensionales probables de secuencias candidatas de inmunoglobulina seleccionadas. Las inspección de estas presentaciones permite el análisis del posible papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, se pueden escoger los residuos de FR y se pueden combinar a partir de secuencias de receptor y de importación de manera que se obtengan las características de anticuerpo deseadas, tales como mayor afinidad por el(los) antígeno(s) diana. En general, los residuos de CDR tienen una implicación directa y de la manera más sustancial a la hora de ejercer efectos en la unión de antígeno.

La humanización de anticuerpos es una clara cuestión de ingeniería de proteínas. Se pueden humanizar casi todos los anticuerpos murinos por medio de injertado de CDR, dando lugar a la retención de la unión de antígeno. Véase, Lo, Benny, K.C., editor, en *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, volumen 248, Humana press, Nueva Jersey, 2004.

Alternativamente, ahora resulta posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que sean capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de la producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región de unión de cadena pesada de anticuerpo (JH) en la mutación híbrida y de línea germinal tiene como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la serie de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones de mutantes de línea germinal tiene como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la prueba de antígenos. Véase, por ejemplo, Jakobovits y col., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551; Jakobovits y col., 1993, *Nature* 362: 255-258; Bruggermann y col., 1993, *Year in Immunology* 7: 33; y Duchosal y col., 1992, *Nature* 355: 258. Los anticuerpos humanos también pueden proceder de bibliotecas de presentación de bacteriófagos (Hoogenboom y col., 1991, *J. Mol. Biol.* 227: 381; Marks y col., *J. Mol. Biol.* 1991, 222: 581-597; Vaughan y col., 1996, *Nature Biotech* 14: 309).

### 30 Purificación de Anticuerpos

Cuando se usan técnicas recombinantes, se puede producir el anticuerpo por vía intracelular, en el espacio periplásmico, o se puede segregar directamente en el medio. Si se produce el anticuerpo por vía intracelular, como primera etapa, se retira el residuo en forma de partículas, ya sean células de hospedador o fragmentos sometidos a lisis, por ejemplo, por medio de centrifugación o ultrafiltración. Carter y col., 1992, *Bio/Technology* 10: 163-167 describen un procedimiento para aislar anticuerpos que son segregados al espacio periplásmico de *E. Coli*. Brevemente, se descongela la pasta celular en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 minutos. Se pueden retirar los residuos celulares por medio de centrifugación. Cuando se segrega el anticuerpo en el interior del medio, generalmente en primer lugar se concentran los sobrenadantes a partir de los sistemas de expresión usando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración de Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar la proliferación de contaminantes adventicios.

Se puede purificar la composición de anticuerpos preparada a partir de las células usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis de gel, diálisis y cromatografía de afinidad, prefiriéndose la cromatografía de afinidad como técnica de purificación. La adecuación de la proteína A como ligando de afinidad depende de las especies e isotipo de cualquier región Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. Se puede usar la proteína A para purificar anticuerpos que estén basados en cadenas pesadas gamma 1, gamma 2 o gamma 4 humanas (Lindmark y col., 1983, *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13). Se recomienda la proteína G para todos los isotipos de ratón y para gamma 3 humana (Guss y col., 1986, *EMBO J* 5: 1567-1575). De la manera más frecuente, la matriz a la cual se une el ligando de afinidad es agarosa, pero otras matrices se encuentran disponibles. Matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirendivinil)benzeno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos de los que se pueden conseguir con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX<sup>TM</sup> (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) resulta útil para purificación. Otras técnicas para purificación de proteínas tales como separación en columna de intercambio iónico, precipitación de etanol, HPLC de fase reversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina, cromatografía SEPHAROSE<sup>TM</sup> sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de sulfato de amonio también se encuentran disponibles, dependiendo del anticuerpo objeto de recuperación.

En una realización, se puede purificar la glucoproteína usando adsorción sobre un sustrato de lecitina (por ejemplo, una columna de afinidad de lecitina) para retirar la glucoproteína que contiene fucosa a partir de la preparación y, de este modo, enriquecer la glucoproteína que no contiene fucosa.

## Formulaciones Farmacéuticas

La invención comprende formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo PD-1 o fragmento de anticuerpo de la invención. Para preparar composiciones farmacéuticas o estériles, se mezcla el anticuerpo o su fragmento con un vehículo farmacéuticamente aceptable o excipiente, véase, por ejemplo Remington's Pharmaceutical Services y U.S Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984). Se pueden preparar formulaciones de agentes terapéuticos y diagnósticos por medio de mezcla con vehículos fisiológicamente aceptables, excipientes, o estabilizadores en forma de, por ejemplo, polvos liofilizados, suspensiones, disoluciones acuosas o suspensiones (véase, por ejemplo, Hardman y col. (2001) Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, Nueva York, NY; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, Nueva York, NY; Avis, y col. (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman y col. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, y col. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner y Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety; Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY).

Se puede determinar la toxicidad y la eficacia terapéutica de las composiciones de anticuerpos, administradas solas o en combinación con un agente inmunosupresor, por medio de procedimientos analíticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar los valores de LD<sub>50</sub> (dosis letal para el 50 % de la población) y ED<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente eficaz en 50 % de la población). La proporción de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la proporción entre ID<sub>50</sub> y ED<sub>50</sub>. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de cultivos celulares y estudios con animales se pueden usar para formular un intervalo de dosificación para uso en humanos. Preferentemente, la dosificación de dichos compuestos se encuentra dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen el ED<sub>50</sub> con escasa o nula toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la ruta de administración utilizada.

Rutas de administración apropiadas incluyen administración parenteral, tal como intramuscular, intravenosa o administración subcutánea y administración oral. La administración del anticuerpo usado en la composición farmacéutica o para la práctica del procedimiento de la presente invención se puede llevar a cabo en una variedad de formas convencionales, tal como ingestión oral, inhalación, aplicación tópica o cutánea, subcutánea, intraperitoneal, parenteral, intraarterial o inyección intravenosa. En una realización, el compuesto de unión de la invención se administra por vía intravenosa. En otra realización, el compuesto de unión de la invención se administra por vía subcutánea.

Alternativamente, es posible administrar el anticuerpo de forma local en lugar de sistémica, por ejemplo, por medio de inyección del anticuerpo directamente en el sitio de acción, con frecuencia en una formulación de liberación prolongada o retardada. Además, se puede administrar el anticuerpo en un sistema de suministro de fármaco diana.

Guías para la elección apropiada de las dosis de anticuerpos, citoquinas y moléculas pequeñas se encuentran disponibles (véase, por ejemplo, Wawrzynczak (1996) Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd., Oxfordshire, Reino Unido; Kresina (ed.) (1991) Monoclonal Antibodies Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, Nueva York, NY; Bach (ed) (1993) Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, Nueva York, NY; Baert, y col. (2003) New Engl. J. Med. 348:601-608; Milgrom y col. (1999) New Engl. J. Med. 341:1966-1973; Slamon y col. (2001) New Engl. J. Med. 344: 783-792; Beniaminovitz y col. (2000) New Engl. J. Med. 342: 613-619; Gosh y col. (2003) New Engl. J. Med. 348: 24-32; Lipsky y col. (2000) New Engl. J. Med. 343: 1594-1602).

La determinación de la dosis apropiada se lleva a cabo por parte del médico, por ejemplo, usando parámetros o factores conocidos o presuntamente conocidos en la técnica que influyen en el tratamiento o que se predice que influyen en el tratamiento. De manera general, la dosis comienza con una cantidad bastante menor que la dosis óptima y se aumenta por medio de pequeños incrementos posteriormente hasta lograr el efecto deseado u óptimo con o sin ningún efecto secundario negativo. Mediciones diagnósticas importantes incluyen síntomas de, por ejemplo, inflamación o nivel de citoquinas inflamatorias producidas.

Se pueden proporcionar los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y citoquinas por medio de infusión continua, o por medio de dosis a intervalos de, por ejemplo, una semana, o 1-7 veces por semana. Las dosis se pueden proporcionar por vía intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, cutánea, tópica, oral, nasal, rectal, intramuscular, intracerebral, intraespinal o por medio de inhalación. Un protocolo preferido es el que implica la dosis máxima o frecuencia de dosis que evita efectos secundarios no deseados. Generalmente, la dosis semanal es de al menos 0,05 µg/kg de peso corporal, más generalmente de al menos 0,2 µg/kg, de la manera más general de 0,5 µg/kg, normalmente de al menos 1 µg/kg, de la manera más normal de al menos 10 µg/kg, de la manera más normal de al menos 100 µg/kg, preferentemente de al menos 0,2 mg/kg, más preferentemente de al menos 1,0 mg/kg, del modo más preferido de al menos 2,0 mg/kg, de manera óptima de al menos 10 mg/kg, de manera más óptima de al menos 25 mg/kg y del modo más óptimo de al menos 50 mg/kg (véase, por ejemplo, Yang y col. (2003) New Engl. J. Med. 349: 427-434; Herold y col. (2002) New Eng. J. Med. 346: 1692-1698; Liu y col. (1999) J. Neurol. Neurosurg. Psych. 67: 451-456; Portielji y col. (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52: 133-144). La dosis deseada de una sustancia terapéutica de molécula pequeña, por ejemplo, un mimético de péptido, producto natural o sustancia química



orgánica, es aproximadamente la misma que para un anticuerpo o polipéptido, en una base de moles/kg.

Según se usa en la presente memoria, "inhibir" o "tratar" o "tratamiento" incluyen posponer el desarrollo de los síntomas asociados a la enfermedad y/o una reducción de la gravedad de dichos síntomas que se desarrollan, o se espera que se desarrollen, con la citada enfermedad. Los términos además incluyen aliviar los síntomas existentes, evitar síntomas adicionales y aliviar o evitar las causas subyacentes de dichos síntomas. De este modo, los términos indican que se confiere un resultado beneficioso a un sujeto vertebrado con una enfermedad.

Según se usa en la presente memoria, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un anticuerpo anti-PD-1 o uno de sus fragmentos, que cuando se administra solo o en combinación con un agente terapéutico adicional a una célula, tejido o sujeto resulta eficaz para evitar o aliviar la enfermedad o el trastorno objeto de tratamiento. Una dosis terapéuticamente eficaz hace referencia a esa cantidad del compuesto suficiente para dar como resultado un alivio de los síntomas, por ejemplo, tratamiento, curación, prevención o alivio del trastorno médico relevante, o un aumento de la tasa de tratamiento, curación, prevención o alivio de dicho trastornos. Cuando se aplica a un principio activo individual administrado solo, dosis terapéuticamente eficaz se refiere a ese ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a cantidades combinadas de principios activos que dan como resultado el efecto terapéutico, cuando se administran en combinación, de forma seriada o simultánea. Normalmente, una cantidad eficaz de sustancia terapéutica disminuye los síntomas en al menos 10 %; normalmente al menos 20 %; preferentemente al menos aproximadamente 30 %; más preferentemente al menos 40 % y del modo más preferido al menos 50 %.

Los procedimientos para la co-administración o tratamiento con un segundo agente terapéutico se conocen bien en la técnica, véase, por ejemplo, Hardman y col. (eds.) (2001) Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10ª ed., McGraw-Hill, Nueva York, NY; Poole and Peterson (eds) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; Chabner y Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA.

La composición farmacéutica de la invención también puede contener otro agente, incluyendo pero sin limitarse a un agente citotóxico, citostático, anti-angiogénico o anti-metabolito, un agente dirigido a un tumor, un agente inmuno-estimulador o inmuno-modulador o un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico, citostático u otro tóxico. También se puede emplear la composición farmacéutica con otras modalidades terapéuticas tales como cirugía, quimioterapia y radiación.

Sujetos de investigación experimentales y veterinarios normales incluyen monos, perros, gatos, ratas, ratones, conejos, cobayas, caballos y humanos.

#### Usos Terapéuticos para el Anticuerpo y Fragmentos de Anticuerpo de la Invención

Se pueden usar el anticuerpo o los fragmentos de unión de antígeno de la invención, que se unen específicamente a PD-1 humano, para aumentar, mejorar, estimular o sobre-regular un respuesta inmunológica. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención son particularmente apropiados para tratar sujetos que tienen un trastorno que se puede tratar por medio del aumento de la respuesta inmunológica con mediación de células T. Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos que necesitan la mejora de una respuesta inmunológica.

#### *Cáncer*

Se pueden usar el anticuerpo o los fragmentos de unión a antígeno de la invención para tratar cáncer (es decir, para inhibir la proliferación o la supervivencia de células tumorales). Cánceres preferidos cuya proliferación se puede inhibir usando los anticuerpos de la invención incluyen normalmente cánceres que responden a inmunoterapia, pero también cánceres que hasta la fecha no se han asociado a inmunoterapia. Ejemplos no limitantes de cánceres preferidos para el tratamiento incluyen melanoma (por ejemplo, melanoma maligno con metástasis), cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células claras), cáncer de próstata (por ejemplo, adenocarcinoma de próstata resistente a hormonas), adenocarcinoma de páncreas, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células que no son pequeñas), cáncer de esófago, carcinoma de cuello escamoso de la cabeza y el cuello, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de tiroides, glioblastoma, glioma, leucemia, linfoma y otros tumores neoplásicos. De manera adicional, la invención incluye tumores recurrentes o resistentes cuya proliferación se puede inhibir usando los anticuerpos de la invención.

Se pueden usar el anticuerpo o los fragmentos de anticuerpo de la invención solos o en combinación con: otros agentes antineoplásicos o agentes inmunogénicos (por ejemplo, células cancerígenas atenuadas, antígenos tumorales (incluyendo proteínas recombinantes, péptidos y moléculas de carbohidrato), células que presentan antígenos tales como células dendríticas pulsadas con antígenos procedentes de tumor o ácidos nucleicos, citoquinas inmuno-estimuladoras (por ejemplo, IL-2, IFN $\alpha$ 2, GM-CSF) y células sometidas a transfección con genes que codifican citoquinas inmuno-estimuladoras tales como, pero sin limitarse a, GM-CSF); tratamientos convencionales de cáncer (por ejemplo, quimioterapia, radioterapia o cirugía); u otros anticuerpos (incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos para VEGF, EGFR, Her2/neu, receptores de VEGF, otros receptores de factor de

proliferación, CD20, CD40, CTLA-4, OX-40, 4-1BB e ICOS).

#### *Enfermedades Infecciosas*

5 También se puede usar el anticuerpo o los fragmentos de anticuerpo de la invención para evitar o tratar infecciones y una enfermedad infecciosa. Se pueden usar el anticuerpo o los fragmentos de anticuerpo solos, o en combinación con vacunas, para estimular la respuesta inmunológica frente a patógenos, toxinas y auto-antígenos. Se pueden usar los anticuerpos o sus fragmentos de anticuerpo para estimular la respuesta inmunológica frente a infecciones víricas en humanos, tales como, pero sin limitarse a, virus de inmunodeficiencia humana, virus de hepatitis de clase 10 A, B y C, virus de Eppstein Barr, citomegalovirus humano, virus de papiloma humano, virus herpes. Se pueden usar los anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno para estimular la respuesta inmunológica frente a la infección con bacterias o parásitos fúngicos, y otros patógenos.

#### *Coadyuvante de Vacunación*

15 Se pueden usar el fragmento o los fragmentos de anticuerpo de la invención junto con otras proteínas recombinantes y/o péptidos (tales como antígenos tumorales o células cancerígenas) con el fin de aumentar la respuesta inmunológica frente a estas proteínas (es decir, en un protocolo de vacunación).

20 Por ejemplo, se pueden usar los anticuerpos anti-PD-1 y sus fragmentos de anticuerpo para estimular las respuestas inmunológicas específicas de antígeno por medio de co-administración de un anticuerpo anti-PD-1 con un antígeno de interés (por ejemplo, una vacuna). Por consiguiente, en otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para mejorar una respuesta inmunológica frente a un antígeno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto: (i) el antígeno; y (ii) un anticuerpo anti-PD-1 de la invención o una de sus partes de unión a antígeno, de manera que 25 se mejore la respuesta inmunológica frente al antígeno en el sujeto. El antígeno puede ser, por ejemplo, un antígeno tumoral, un antígeno vírico, un antígeno bacteriano o un antígeno procedente de un patógeno. Ejemplos no limitantes de dichos antígenos incluyen, sin limitación, antígenos tumorales o antígenos procedentes de virus, bacterias u otros patógenos.

#### *Enfermedades con Mediación de Th2*

También se pueden usar los anticuerpos anti-PD-1 y los fragmentos de anticuerpo de la invención para tratar enfermedades con mediación de Th2, tales como asma y alergia. Esto se basa en el descubrimiento de que los anticuerpos de la invención puede contribuir a inducir la respuesta The. De este modo, los anticuerpos de la 35 invención se pueden usar en enfermedades con mediación de Th2 para generar una respuesta inmunológica más equilibrada.

#### *Activación Ex-Vivo de Células T*

40 También se pueden usar los anticuerpos y los fragmentos de antígeno de la invención para la activación ex vivo y la expansión de células T específicas de antígeno y la transferencia adoptiva de estas células al interior de pacientes con el fin de aumentar las células T específicas de antígeno contra el tumor. También se pueden usar estos procedimientos para activar las respuestas de las células T frente a agentes infecciosos tales como CMV. Cabe esperar que la activación ex vivo en presencia de anticuerpos anti-PD-1 aumente la frecuencia y la actividad de las 45 células T transferidas de forma adoptiva.

#### *Otras Terapias de Combinación*

50 Como se ha descrito previamente, se pueden co-administrar los anticuerpos anti-PD-1 de la invención con uno u otro de más agentes terapéuticos, por ejemplo, un **agente** citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor. Se puede ligar el anticuerpo al agente (como inmunocomplejo) o se puede administrar por separado a partir del agente. En el último caso (administración por separado), se puede administrar el anticuerpo antes, después o de manera concurrente con el agente y se puede co-administrar con otras terapias conocidas.

55 También se pueden usar los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de la invención para aumentar la eficacia de las células T específicas de injertadas como donante.

#### *Usos No Terapéuticos del Anticuerpo y los Fragmentos de Anticuerpo de la Invención*

60 Ya existe un mercado de anticuerpos anti-PD-1 para usos no terapéuticos, como queda demostrado por medio de las ventas comerciales de los anticuerpos J116 y J105 un anti-hPD-1 monoclonal, comercializados por eBioscience de San Diego, California, EE.UU, para su uso en el análisis citométrico de flujo, inmunohistoquímica y ensayos funcionales *in vitro*; y mab1086, un anticuerpo anti-hPD-1 monoclonal comercializado por R&D Systems de Minneapolis, MN, USA, para su uso en citometría de flujo, inmunotransferencia y ELISA. Se pueden usar los 65 anticuerpos de la invención con cualquier finalidad no terapéutica proporcionada ahora por J116, J105 y/o Mab1086.

Se puede usar el anticuerpo de la invención como agente de purificación de afinidad.

El anticuerpo de la invención también puede ser útil en ensayos diagnósticos, por ejemplo, para detectar la expresión de PD-1 en células específicas, tejidos o suero. Con fines diagnósticos, normalmente se marca el anticuerpo (ya sea de forma directa o indirecta) con un resto detectable. Numerosos marcadores se encuentran disponibles y se pueden agrupar de forma general en las siguientes categorías: biotina, fluorocromos, radionucleótidos, enzimas, yodo y marcadores biosintéticos.

Se puede emplear el anticuerpo de la presente invención en cualquier procedimiento de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos intercalados directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, Monoclonal Antibodies. A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

También se puede usar el anticuerpo para ensayos diagnósticos *in vivo*. Generalmente, se marca el anticuerpo con un radionucleido (tal como,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^0\text{C}$ ,  $^{31}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  o  $^{18}\text{F}$ ) de manera que el antígeno o las células que los expresan se puedan localizar usando inmunoescintigrafía o tomografía con emisión de positrones.

#### Depósito de Materiales

Se han depositado construcciones de ADN que codifican las regiones variables de cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos humanizados h409A11, h409A16 y h409A17 en el American Type Culture Collection Patent Depository (18801 University Blvd., Manassas, VA). Se depositó el plásmido que contenía ADN que codificaba la cadena pesada de h409A-11, h409A-16 y h409A-17, el 9 de junio de 2008 y se identificó como 081469\_SPD-H. Se depositó el plásmido que contenía ADN que codificaba la cadena ligera de h409A11 el 9 de junio de 2008 y se identificó como 0801470\_SPD-L-11. Se depositó el plásmido que contenía ADN que codificaba la cadena ligera de h409A16 el 9 de junio de 2008 y se identificó como 0801471\_SPD-L-16. Se depositó el plásmido que contenía ADN que codificaba la cadena ligera de h409A17 el 9 de junio de 2008 y se identificó como 0801472\_SPD-L-17. Se prepararon los plásmidos bajo las condiciones de Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patente Procedure and the Regulations (Tratado de Budapest).

Se considera que la especificación escrita anteriormente es suficiente para permitir al experto en la técnica la práctica de la invención. La presente invención no se encuentra limitada en cuanto al alcance por parte del cultivo depositado, ya que se pretende la realización depositada como ilustración individual de un aspecto de la invención y cualquier cultivo que sea funcionalmente equivalente se encuentra dentro del alcance de la presente invención. El depósito de material de la presente memoria no constituye la admisión de que la descripción escrita de la presente memoria sea inadecuada para permitir la práctica de cualquiera aspecto de la invención, incluyendo su mejor modo, ni debe interpretarse como limitante del alcance de las reivindicaciones para la ilustración específica que representa. De hecho, varias modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en la presente memoria resultarán evidentes para el experto en la técnica a partir de la descripción anterior y se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

La invención se comprenderá de manera más completa haciendo referencia a los siguientes ejemplos. No obstante, no deberían interpretarse como limitantes del ámbito de la presente invención.

#### **Ejemplos**

##### **Ejemplo 1: Inmunización y Selección de Anticuerpos anti-PD-1**

###### Inmunización de Ratones con ADNc de hPD-1

Para generar los anticuerpos contra el receptor PD-1 humano ("hPD-1"), se obtuvo un ADNc que codificaba el sistema de lectura abierto del receptor hPD-1 por medio de PCR y se subclonó para dar lugar al vector pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad; CA). A continuación, se sometieron las células CHO-K1 a transfección de forma satisfactoria con hPD-1, y se controló la expresión usando citometría de flujo. Se aislaron los clones CHO-K1 que expresaban PD-1 humano sobre sus membranas y se nombraron como CHO-hPD1.

Se inmunizaron ratones por medio de inmunización con pistola génica usando una pistola génica Helios (BioRad) y balas de oro revestidas con ADN (BioRad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se revistieron partículas de oro de 1  $\mu\text{m}$  con ADNc de hPD-1 (clonado para dar pcDNA3.1) y, cuando se indicó, vectores de expresión comerciales para Flt3L de ratón y GM-CSF de ratón en una proporción de 2:1:1 (ambos de Aldevron, Fargo, ND). Se usó un total de 1  $\mu\text{g}$  de ADN de plásmido para revestir 500  $\mu\text{g}$  de balas de oro.

Específicamente, se inmunizaron ratones de BALB/C hembras de 7-8 semanas de edad, en la oreja, por medio de una pistola génica recibiendo 2, 3 ó 4 ciclos de un disparo sobre ambas orejas (véase la Tabla I). Un ratón recibió un refuerzo final con  $5 \times 10^6$  células de CHO-hPD1 en la cavidad peritoneal. Aproximadamente, concentraciones de 1:1000 de anti-PD-1 se detectaron en suero de ratón tras dos inmunizaciones con ADN por medio de ELISA celular usando CHO-PD-1 frente a células parentales CHO-K1. Cuatro días después de la inmunización final, se sacrificaron los ratones, y se prepararon poblaciones de células esplénicas desprovistas de eritrocitos como se ha descrito

anteriormente (Steenbakkers y col., 1992, J. Immunol. Meth. 152: 69-77; Steenbakkers y col., 1994, Mol. Biol. Rep. 19: 125-134) y se congelaron a - 140 °C.

5 Tabla I: Programa de inmunización usado para inducir concentraciones de anticuerpo específico de hPD-1 en ratones Balb/c

	Semana 1	Semana 4	Semana 7	Semana 8	Semana 9	Semana 10	Semana 11
Ratón 730	2 disparos hPD1 pCDNA3.1	2 disparos hPD1 pCDNA3.1		2 disparos hPD1 pCDNA3.1	recogida de células esplénicas		
Ratón 731	2 disparos hPD1 pCDNA3.1	2 disparos hPD1 pCDNA3.1			5 millones de CHO-HPD1	recogida de células esplénicas	
Ratón 738	2 disparos hPD1 pCDNA3.1 (mFlt3L + MGM-CSF)	2 disparos hPD1 pCDNA3.1 (mFlt3L + MGM-CSF)	2 disparos hPD1 pCDNA3.1 (mFlt3L + MGM-CSF)			2 disparos hPD1 pCDNA3.1 (mFlt3L + MGM-CSF)	recogida de células esplénicas

#### Selección de Células B que Producen Anticuerpos Anti-PD-1

10 Para seleccionar clones de células B que producían anticuerpos anti-PD-1 humanos, se agruparon  $2 \times 10^7$  células esplénicas desprovistas de eritrocitos a partir de un ratones con ADN inmunizado de hPD-1, es decir, ratones 730, 731 y 738 (véase la Tabla I), para un cultivo de células B. Se incubaron las células esplénicas en DMEM/HAM's F12/10 % de suero de ternera (Hyclone, Logan, UT, EE.UU.) durante una hora a 37 °C en un matraz de cultivo de plástico para retirar los monocitos. Se sometieron las células no adherentes a un ciclo de selección negativa sobre células CHO-K1, seguido de selección positiva sobre células CHO-hPD1. Se llevaron a cabo ambos procedimientos durante una hora a 37 °C sobre cultivos de proliferación confluyente en placas de Petri de 21 cm<sup>2</sup> o matraces de cultivo T25 (se irradiaron los cultivos celulares antes de su uso, hasta una dosis total de 2000 RAD). Tras la selección positiva, se retiraron las células no ligadas por medio de lavado diez veces con PBS complementado con 0,132 % de CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O y 0,1 % de MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O. Finalmente, se recogieron las células B ligadas por medio de tratamiento con tripsina.

Se sometieron a cultivo las células B seleccionadas y se immortalizaron como se describe en Steenbakkers y col., 1994, Mol. Biol. Rep. 19: 125-134. Brevemente, se mezclaron las células B con 7,5 % (v/v) de sobrenadante de células T y 50.000 células de Sertoli EL-4 B5 irradiadas (2.500 RAD) en un volumen final de 200 µl de DMEM/HAM's F12/10 % de suero de ternera bovino, en placas de cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos. El día ocho, se inspeccionó la reactividad anti-PD-1 de los sobrenadantes por medio de ELISA con células CHO-hPD-1 usando el siguiente procedimiento. Se sometieron a cultivo células CHO-K1 y CHO-hPD1 hasta confluencia en las placas de 96 pocillos de fondo plano en 50 µl de DMEM/HAM's F12, 10 % de FBS. A continuación, se añadieron 50 µl de sobrenadante que contenía inmunoglobina durante 1 hora a 37 °C. Después de tres lavados con PBS-Tween, se añadieron 100 µl de peroxidasa de rábano rusticano-anti ratón-cabra (dilución 1:1000) (HRP, Southern, Birmingham, AL, EE.UU.) en DMEM/HAM's F12/10 % de FBS, durante 1 hora a 37 °C. Tras tres lavados con PBS-Tween, se visualizaron inmunoglobulinas inmovilizadas con UPO/TMB (Biomerieux, Boxtel, Países Bajos).

A partir de este cultivo de células B, se identificaron 13 sobrenadantes reactivos hPD-1 y se comprobó que inhibían la activación de células T de Jurkat cuando se inmovilizaron sobre plástico, y se immortalizaron clones de células b a partir de pocillos positivos por medio de mini-electro fusión siguiendo los procedimientos publicados (Steenbakkers y col., 1992, J. Immunol. Meth. 152: 69-77; Steenbakkers y col., 1994, Mol. Biol. Rep. 19: 125-134). Específicamente, se mezclaron células B con  $10^6$  células de mieloma NS-1, y se retiró el suero por medio de lavado con DMEM/HAM's F12. A continuación, se trataron las células con disolución de pronasa durante tres minutos y posteriormente se lavó con un medio de fusión. Se llevó a cabo la electro fusión en una cámara de fusión de 50 µl por medio de un campo eléctrico alterno de 30s, 2 MHz, 400 V/cm seguido de un pulso de campo elevado, cuadrado de 10 µs, 3 kV/cm y de nuevo un campo eléctrico alterno de 30 s, 2 MHz, 400 V/cm. Finalmente, se transfirió el contenido de la cámara de fusión hasta un medio de selección de hibridoma y se colocó en una placa de 96 pocillos en condiciones limitantes de dilución. En el día 14 tras la fusión, se examinaron los cultivos en cuanto a la proliferación de hibridoma y se evaluó la presencia de reactividad de anticuerpos hasta hPD-1. Este procedimiento dio como resultado cinco hibridomas anti-hPD-1 diferentes, llamados hPD-1,05A, hPD-1,06B, hPD-1,08A, hPD-1,09A y hPD-1,13A, que se subclonaron por medio de dilución limitante para salvaguardar su integridad y se sometieron a cultivo adicional para producir anticuerpos. Los sobrenadantes obtenidos a partir de estos hibridomas inhibieron intensamente la producción de IL-2 a partir de células Jurkat E6.2.11 tras la estimulación de anti-CD3/anti-CD28 (véase la Figura 1 y el texto siguiente).

Se subclonaron células de Jurkat E6.1 (American Type Culture Collection) por medio de dilución limitante usando una metodología convencional y se sometieron los subclones en cuanto a una capacidad mejorada para producir IL-

2 tras reticulación de CD3 y CD28. Se obtuvo un subclón que produjo una elevada cantidad de IL-2 y posteriormente, nombrado como Jurkat E6.2.1 land, se usó en los ensayos adicionales. Se revistieron placas de ensayo de 96 pocillos de Costar 3370 durante la noche a 4 °C con 5 µg/ml de Ig de anti-ratón de oveja (SAM). Se retiró el exceso de SAM y se bloquearon las placas durante 1 hora a temperatura ambiente con 200 µl/pocillo de PBS/10 % de suero bovino fetal. Tras tres lavados con PBS, se revistieron los pocillos con 100 µl/pocillo de anti-CD3 (OKT3; 10 ó 60 ng/ml) durante 1 hora a 37 °C. Tras tres lavados con PBS, se añadieron 50 µl/pocillo de PBS / 10 % de suero bovino fetal y se añadieron 50 µl/pocillo de células B o de sobrenadante de hidridoma durante 30 minutos a 37 °C. Tras tres lavados con PBS, se añadieron 120 µl/pocillo de suspensión de células, células de Jurkat E6.2.11 (2 x 10<sup>5</sup> células/pocillo + 0,5 µg/ml de anti-CD28 (Sanguin # M1650, Central Laboratory for Bloodtransfusion, Amsterdam, NL) en DMEM/F12/10 % de suero bovino fetal). Tras un cultivo de 6 h, se examinó el sobrenadante en cuanto a la producción de IL-2 usando ELISA de sandwich convencional con una captura de anti-hIL-2 y pares de anticuerpos de detección biotinilados de Pharmingen y Peroxidasa de Rábano Rusticano-Estreptavidina (Southern Biotech) como reactivo de detección. Para determinar la potencia de estos anticuerpos en comparación con PD-L1, se produjo un pequeño grupo de mAbs a una escala mayor. Se purificaron los mAbs usando cromatografía de afinidad de Proteína G (véase Ejemplo 2). Se revistieron anticuerpos purificados, hPD-L1/Fc (híbrido B7-H1/Fc humano recombinante, R&D systems) o IgG1 kappa de ratón (de Sigma) como control negativo en concentraciones idénticas sobre placas con anti-CD3 como se ha descrito anteriormente. Se añadieron células Jurkat E6.2.11 y anti-CD-28 durante seis horas, y se midió la activación de las células T por medio del IL-2 producido en el sobrenadante. Dos de los anticuerpos (hPD1.08A y hPD1.09A) mostraron una inhibición 8-10 veces más potente en comparación con PD-L1/Fc inmovilizado.

## Ejemplo 2: Purificación y caracterización de anticuerpos anti-PD-1 murinos

Estabilización de hibridomas que producen anti-PD-1 y purificación de anticuerpos anti-PD-1

Se obtuvieron poblaciones de células clonales para cada uno de los hibridomas sometiéndolos a rondas múltiples (> 4) de dilución limitante. Posteriormente, se sometieron a cultivo las células de hibridoma estables en condiciones libres de suero usando bio-reactores CELLline (Integra-biosciences) durante seis a ocho días. Se sembraron las células en la cámara interna en un medio libre de suero a una densidad de 3 x 10<sup>6</sup> c/ml en 15 ml y se expandieron hasta aproximadamente 4 x 10<sup>7</sup> c/ml durante ocho días. Se llenó la cámara externa con medio complementado con hasta 10 % de BCS (suero de ternera bovino). En el día seis a ocho, se recogió el cultivo de la cámara interna, se lavó con 15 ml de medio de SF y se re-inoculó con células de hidridoma. Se combinaron el sobrenadante del bio-reactor y el lavado y se clarificó por medio de centrifugación. Se filtró el sobrenadante resultante a través de una membrana filtrante de 0,22 µm. Para la purificación de anticuerpos, se diluyeron los sobrenadantes 1:1 en un tampón de unión de alto contenido en sal (Glicina 1M / NaCl 2M, pH 9,0) y se purificaron mAbs usando una columna de Proteína G HiTrap 5 ml (GE healthcare). Tras el lavado con PBS, se eluyeron los anticuerpos usando Glicina 0,1 M pH = 2,7, seguido de neutralización de pH usando Tris 3 M. Finalmente, se sometió el tampón a intercambio de PBS usando columna de filtración de gel PD-10 (GE healthcare), y se concentraron los anticuerpos usando concentradores centrífugos Ultra-15 (Amicon) y se cuantificó usando espectrofotometría.

Anticuerpos Comerciales

Se usaron los siguientes anticuerpos comerciales en varios estudios descritos en la presente memoria: se adquirió el clon de anticuerpo Anti-PD-1 J116 (Nº. 14-9989) en eBioscience. Se adquirió el clon anti-CTLA-4 14D3 (mAb 16-1529) en eBioscience. Se adquirió el clon Anti-PD-1 192106 (mAb1086) en R&D systems (Nº. mAb1086). Se adquirió el clon MOPC21, kappa, de anticuerpo de control de isotipo mIgG1 en Sigma (Nº. M9269). Se adquirieron los controles de isotipo mIgG1 kappa (mAb 16-4714) y IgG2a kappa (mAb 16-4724) en eBioscience.

Análisis de Unión

Se usaron experimentos de ELISA basado en células ("CELISA") y basado en proteínas para determinar las afinidades de unión aparentes (presentadas como valores de EC50). En algunos casos, se comparó la unión de los anticuerpos anti-PD-1 con la de los anticuerpos PD-1 J116 (eBiosciences) y Mab1086 (R&D systems).

Se usó ELISA de proteínas para la determinación de la unión relativa de los anticuerpos a PD-1/Fc humano. Se inmovilizó hPD-1/Fc (R&D Systems) sobre placas de 96 pocillos de Maxisorp (Nunc) por medio de incubación durante 4 h a temperatura ambiente (o durante la noche a 4 °C). Se bloquearon los sitios de unión específicos por medio de incubación con 3 % de BSA en PBST durante una hora a temperatura ambiente. Tras el revestimiento, se lavaron las placas tres veces con PBST. Se prepararon diluciones de anticuerpos anti-PD-1 en tampón de unión (PBS que contenía 0,1 % de Tween 20 y 0,3 % de BSA) y se incubaron con proteína de fusión inmovilizada durante una hora a 25 °C. Tras la unión, se lavaron las placas tres veces con PBST, se incubaron durante una hora a 25 °C con IgG anti-ratón de cabra marcada con peroxidasa (Southern Biotech) diluida 1/4.000 en tampón de unión, se lavó de nuevo y se desarrolló usando TMB. La Figura 2 muestra los resultados de ELISA. Se presenta la concentración de unión a mitad del máximo como una medición de la afinidad de unión relativa (Tabla II).

También se evaluó la unión a células CHO-PD-1 por medio de CELISA. Para CELISA, se sometieron a cultivo células CHO-hPD-1 hasta 80 a 100 por ciento de confluencia en un 50 µl de medio de cultivo (DMEM/HAM's F12, 10 % de PBS). A continuación, se añadieron 50 µl de medio que contenía varias concentraciones de mAb purificado durante una hora a 37 °C. Tras tres lavados con PBS-Tween, se añadieron 100 µl de HRP-anti-ratón-cabra (Southern Biotech N°. 1030-05) (diluido 1:1000 en medio de cultivo) durante una hora a 37 °C. Tras tres lavados adicionales con PBS-Tween, se visualizaron inmunoglobulinas inmovilizadas con sustrato de peroxidasa colorimétrica TMB (BD Biosciences). Se midió el aumento de absorbancia debido a la actividad de peroxidasa (450 nm) en un lector de placa de microlitros. La Figura 2 muestra la relación dosis-respuesta entre la concentración y la unión para los anticuerpos hPD-1,08A y hPD-1,09A. La Tabla II recoge los resultados de los estudios de unión de proteínas y células.

Análisis cinético por medio de interferometría de bio-luz (Forte Bio)

Para caracterizar de manera adicional las características de unión de los anticuerpos, se estableció el perfil de cada una usando interferometría de bio-luz sobre el sistema Octet (ForteBio, Menlo Park, CA) para dilucidar las cinéticas de unión y calcular las constantes de unión de equilibrio. Se llevó a cabo este ensayo por medio de acoplamiento de una proteína de fusión PD-1-Fc (R&D Systems) a biosensores reactivos con amina (ForteBio) usando química de amina convencional. Posteriormente, se observó la unión mAb anti-PD-1 y la disociación a partir de los biosensores a varias concentraciones de anticuerpo. Específicamente, se pre-humedecieron los biosensores reactivos con amina sumergiéndolos en pocillos que contenían 0,1 M de MES pH 0 5,5 durante 5 minutos. A continuación, se activaron los biosensores usando una mezcla NHS 0,1 M / EDC 0,4 M durante 5 minutos. Se acopló la proteína de fusión PD1-Fc (R&D Systems) sumergiendo los biosensores en una disolución de 12 µg/ml de PD-1/Fc en MES 0,1 M durante 7,5 minutos. Se inactivó la superficie del biosensor usando una disolución de 1M de etanolamina durante 5 minutos. Se equilibraron los biosensores en PBS durante 5 minutos. Se observó la asociación de mAbs anti-PD-1 colocando los biosensores en pocillos que contenían varias concentraciones de anticuerpo (10-80 nM anticuerpo purificado > 99 % por medio de SDS-PAGE en PBS) y controlando la interferometría durante 30 minutos. Se midió la disociación tras la transferencia de los biosensores al interior de PBS y controlando la señal de interferometría durante 60 minutos. Se ajustaron las tasas de activación y desactivación ( $k_{obs}$  y  $k_d$ ) usando un modelo de ajuste global de unión 1:1 que comprendía todas las concentraciones sometidas a ensayo, y se calculó la constante  $K_D$  de unión de equilibrio. La Tabla II y la Figura 6 siguientes presentan los resultados de los estudios cinéticos.

Tabla II: Resumen de caracterización bioquímica de mAbs anti-PD-1 murinos

mAb	Análisis de Unión		Bloqueo de Ligando			Análisis Cinético		
	ELISA	CELISA	FACS	FMAT		ForteBio Octet		
	EC50 (pM)	EC50 (pM)	IC50 (pM)	IC50 (pM)		$k_{asoc}$	$k_{disoc}$	$K_D$
	hPD-1/Fc	hPD-1/CHO	PD-L1	PD-L1	PD-L2	1/s	1/MS	M
05A	338		15			1,62E+05	1,11E-04	6,90E-10
06B	135		160			8,32E+04	9,74E-05	1,17E-09
08A	76	79	0,9	0,73	2,1	1,25E+06	3,03E-05	2,41E-11
09A	123	113	0,8	0,90	1,7	1,64E+06	3,60E-05	2,20E-11
13A	485		64			1,46E+05	4,16E-04	2,85E-09
J116	410	349	106	> 100	44	8,24E+04	1,50E-04	1,82E-09
mAb1086	59	> 10000	> 10000	> 10000	> 10000	2,45E+05	1,68E-04	6,86E-10

Se sometieron a ensayo dos anticuerpos monoclonales, hPD-1,08A y hPD-1,09A, unidos considerablemente de manera más intensa que cualquier otro mAb usando este ensayo, siendo  $K_D$  determinado de 24 a 22 pM para hPD-1,08A y hPD-1,09A, respectivamente. En comparación con los otros anticuerpos anti-PD-1 sometidos a ensayo, la mayor afinidad se debe a una menor tasa de desactivación y a una tasa de activación significativamente más rápida medida para hPD-1,08A y hPD-1,09A.

Bloqueo de Ligando

Se estudió el bloqueo de la unión de ligando usando citometría de flujo. Se disociaron células CHO que expresaban PD-1 humano a partir de matraces de cultivo adherentes y se mezclaron con concentraciones variables de anticuerpo anti-PD-1 y una concentración constante (600 ng/ml) de hPD-L1/Fc no marcado o proteína de fusión PD-L2/Fc humana recombinante (a partir de R&D Systems) en una placa de 96 pocillos. Se equilibró la mezcla durante 30 minutos sobre hielo, se lavó tres veces con tampón FACS (PBS que contenía 1 % de BCS y 0,1 % de azida de sodio), y se incubó con Fa anti-humano de cabra marcado con FITC durante 15 minutos adicionales sobre hielo. Se lavaron de nuevo las células con tampón FACS y se analizaron por medio de citometría de flujo. Se analizaron los datos con Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) usando regresión no lineal, y se calcularon los valores de IC50.

La Tabla II recoge los datos de IC<sub>50</sub> resumidos. Se determinaron los anticuerpos 05A, 06B y 13A para demostrar un  $K_D$  entre 600 pM y 3 nM para la unión de hPD-1. A pesar de la unión intensa, cada uno de estos anticuerpos demostró IC<sub>50</sub>> 10 nM para el bloqueo de la unión hPD-L1 a hPD-1. El anticuerpo J116 anti-PD-1 comercialmente

disponible (eBiosciences) compitió de forma débil con PD-L1 en cuanto a la unión, presentando un valor de IC<sub>50</sub> calculado fuera del intervalo de este experimento (> 100, nM). El IgG1 de ratón de control no compite con PD-L1 para la unión de PD-1. Por el contrario, los anticuerpos de elevada afinidad hPD-1,08A y hPD-1,09A inhibieron la unión de PD-L1 con valores de IC<sub>50</sub> por debajo de 1nM, mientras que la unión de PD-L2 se bloqueó con valores de IC<sub>50</sub> de alrededor de 1-2 nM (Tabla II). Se informó de que PD-L2 se unía de forma preliminar a PD-1 con una afinidad de dos a seis veces mayor que en el caso de PD-L1 (Youngnak P. y col., 2003, Biochem. Biophys. Res. Commun. 307, 672-677).

Se confirmó el bloqueo de ligando usando un ensayo de competición homogéneo y la detección usando tecnología de ensayo de microvolumen fluorométrico (FMAT). Brevemente, se disociaron CHO.hPD-1 de los matraces de cultivo adherentes, se mezclaron con concentraciones variables de anticuerpo anti-PD-1 y una concentración constante (600 ng/ml) de proteína de fusión hPD-L1/Fc o hPD-L2/Fc (ambas de R&D Systems), marcada con un colorante fluorescente (AlexaFluor 647, Invitrogen) en una placa de 96 pocillos. Se equilibró la mezcla durante 90 minutos a 37 °C y se tomó lectura usando un Analizador de Detección Celular AB8200 (Applied Biosystems), Foster, City, CA). Se analizaron los datos con Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) usando regresión no lineal, y se calcularon los valores de IC<sub>50</sub>. La Figura 3 muestra los resultados de un experimento de dosis-respuesta que indica que se determina la magnitud del bloqueo de ligando por medio de la concentración de anticuerpo. Se puede inhibir completamente la unión tanto de hPD-L1/Fc como de hPD-L2/Fc a células CHO-hPD-1 por medio de hPD-1,08A, hPD-1,09A y (en menor medida) por 1116 de manera dependiente de la dosis. La Tabla II resume los datos de IC<sub>50</sub> calculado. Confirmando los resultados obtenidos usando citometría de flujo, los anticuerpos de elevada afinidad hPD-1,08A y hPD-1,09A inhibieron la unión de **PD-L1** con valores de IC<sub>50</sub> por debajo de 1 nM.

#### Reactividad Cruzada de Especies

Para evaluar la reactividad cruzada de las especies de los anticuerpos, se clonaron receptores PD-1 de macaco cinomólogo y de ratón por medio de PCR y se generaron células de CHO-K1 sometidas a transfección de forma estable. Se sometieron a ensayo los anticuerpos en cuando a la unión al receptor cinomólogo usando CELISA. Se comprobó que el anticuerpo comercial J116, hPD-1,08A y hPD-1,09A se unía con igual afinidad a PD-1 humano y cinomólogo y bloqueaba la unión de hPD-L1/Fc y hPD-L2/Fc a PD-1 cinomólogo con similar eficacia en comparación con PD-1 humano. Esto no resulta sorprendente ya que se comprobó que la secuencia de amino ácidos de la parte extracelular de PD-1 cinomólogo era 97 % idéntica a la del PD-1 humano. Además de PD-1 de macaco cinomólogo, hPD-1,08A y hPD-1,09A también bloquearon funcionalmente PD-1 procedente de macacos de la India en cultivos celulares de sangre estimulados con SEB descritos en el Ejemplo 3. Ninguno de los anticuerpos sometidos a ensayo se unió a PD-1 de ratón con afinidad detectable en ninguno de los ensayos usados.

En resumen, se purificaron y caracterizaron cinco anticuerpos anti-PD-1 monoclonales, que se aislaron en base a su capacidad para modular la función de Jurkat. Estos anticuerpos se unieron intensamente a PD-1 (con constantes de disociación en el intervalo de 20 pM a 3 nM) y fueron capaces de bloquear la interacción tanto con PD-L1 como PD-L2 con valores variables de IC<sub>50</sub>. Cuatro de estos mAbs anti-hPD-1 se consideraron mejores que los mejores mAbs anti-PD-1 disponibles comercialmente. Cada uno de los anticuerpos, cuando se añadieron en disolución actuaron como antagonistas de receptor, que finalmente mejoraban las respuestas de células T (véase Ejemplo 3).

#### Ejemplo 3: Formación de Perfil Funcional de Anticuerpos Anti-PD-1

Se mejora la respuesta de células T humanas frente a SEB por medio de hPD-1,08A y hPD-1,09A

Se sometieron a ensayo anticuerpos anti-PD-1 en cuanto a su capacidad para mejorar la actividad de las células T *in vitro* usando células sanguíneas procedentes de voluntarios sanos. Un ensayo usado para caracterizar la consecuencia funcional de bloquear el receptor humano PD-1 utilizó enterotoxina B de Staphylococcus (SEB) para unirse y activar todas las células T que expresaban la cadena de receptor celular Vβ3 y Vβ8. Se obtuvo sangre de donante humano sano y se diluyó 1:10 para dar lugar a un medio de cultivo. Se colocó la sangre diluida en placas (150 μl por pocillo) de fondo redondo de 96 pocillos y se preincubó durante 30-60 minutos con mAb y concentraciones variables. Posteriormente, se añadió SEB a diferentes concentraciones que variaron de 10 ng/ml a 10 μg/ml. Se recogieron los sobrenadantes tras 2 a 4 días de cultivo y se cuantificó la cantidad de IL-2 producido usando ELISA (descrito en el Ejemplo 1) o usando tecnología de multiplex convencional (plataforma Luminex - estuches de detección de citoquina Biosource). La valoración de SEB de 100 ng/ml hasta 10 μg/ml estimuló de forma significativa la producción de IL-2 por parte de las células sanguíneas. Normalmente, dependiendo del donante, se detectó de 100 a 1000 μg/ml de IL-2 por medio de ELISA 2-4 días después de la estimulación con 1 μg/ml de SEB. La adición de hPD-1,08A y hPD-1,09A mejoró la producción de IL-2 sobre IgG1 de ratón de control, de media de 2 a 4 veces a la concentración de anticuerpo más elevada sometida a ensayo (25 μg/ml). Se calculó el valor medio del índice de estimulación para los experimentos llevados a cabo con un conjunto de voluntarios sanos independientes (Figura 4). Estos experimentos demostraron que tanto hPD-1,08A como hPD-1,09A mejoraron la producción de IL-2 tras la estimulación con SEB de células sanguíneas diluidas. Los niveles de expresión tanto de PD-1 como de PD-L1 (pero no de PD-L2) estuvieron sobre-regulados (cuantificados por medio de citometría de flujo) con el tiempo tras la estimulación con SEB de células sanguíneas. El anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 (clon MIH5,

Ebiosciences N°. 16-5982) y anti-CTLA-4 (clon 14D3, eBiosciences N°. 16-1529) también indujeron un aumento de la producción de IL-2 en condiciones similares, un descubrimiento que posteriormente validó el uso del ensayo de estimulación con SEB para cuantificar la actividad de las células T tras la manipulación de los mecanismos co-estimuladores (Figura 4). Se descubrió que la producción mejorada de IL-2 por medio de los anticuerpos anti-PD-1 era dependiente de la dosis. Además de IL-2, por medio de la tecnología Luminex, también se descubrió que los niveles de TNF $\alpha$ , IL-17, IL-7, IL-6 e IFN $\gamma$  se modulaban significativamente por medio de hPD-1,08A y hPD-1,09A. Los resultados de estos experimentos indican que hPD-1,08A y hPD-1,09 se pueden usar para estimular las respuestas de las células T humanas.

De manera adicional, se sometió a ensayo la capacidad del anticuerpo anti-PD-1, hPD-1,09A para mejorar la actividad de las células T *in vitro* usando células sanguíneas procedentes de pacientes con cáncer. Se sometió a ensayo la sangre procedente de pacientes con melanoma avanzado (1 paciente) o cáncer de próstata (3 pacientes) siguiendo el protocolo anterior. Los resultados de la cuantificación de citoquina se presentan en la Tabla III, como número de veces de aumento de la citoquina producida cuando se estimulan las células en presencia de 25 ug/ml de hPD-1,09A en comparación con la estimulación de SEB en ausencia de anticuerpo. En resumen, se comprobó que hPD-1,09A aumenta la producción de IL-2 inducida por SEB de 2 a 3,5 veces para cada uno de los 4 pacientes. Similarmente, se mejoró la producción de TNF $\alpha$ , IL-17 y IFN $\gamma$  y disminuyó la producción de IL-5 e IL-13. Estos experimentos indican que hPD-1,09A tiene la capacidad de estimular las respuestas de las células T en pacientes con cáncer. Además, estos experimentos sugieren una preferencia hacia las respuestas Th 1.

Tabla III: Producción de citoquina estimulada con SEB en presencia de hPD-1,09A

Paciente	Tipo de cáncer	Número de veces de cambio en el nivel de citoquina						
		IL-2	TNF $\alpha$	IFN $\gamma$	IL-5	IL-6	IL-13	IL-17
A	Próstata	3,4	2,0	1,9	0,7	2,1	0,8	1,8
B	Próstata	2,1	1,5	1,2	0,4	2,2	0,6	2,6
C	Próstata	2,0	2,4	2	0,9	2,4	1,1	2,4
D	Melnoma	2,0	1,9	1,5	0,4	1,9	0,5	2,0

La respuesta de reclutamiento las células T humanas frente a la prueba TT se mejora por medio de hPD-1,08A y hPD-1,09

Otro ensayo usado para establecer el perfil del efecto funcional de anticuerpos PD-1 anti-humanos que bloquean la interacción del receptor con sus ligandos naturales usaron el antígeno de toxoide de tétano (TT) para estimular las células T de memoria pre-existentes en sangre de donante sano. Para ello, se colocó PBMC preparado de nuevas ( $2 \times 10^5$  células) en placas de fondo redondo de 96 pocillos en medio RPMI 1640 completo (que contenía 5 % de suero humano inactivado térmicamente), se pre-incubó con anticuerpos de ensayo a concentración variable y se estimuló con TT (Astarte Biologics) a una concentración de 100 ng/ml. Se incubaron las células durante 3-7 días a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> después de lo cual se recogieron los sobrenadantes. Se determinaron las concentraciones de citoquina por medio de ELISA (conjuntos de pares de anticuerpos de detección por ELISA IL-1 e IFN- $\gamma$  de eBioscience) y análisis de multiplex (plataforma Luminex - estuches de detección de citoquina Biosource). El bloqueo de PD-1 mejoró la proliferación y mejoró significativamente la producción de citoquina (Figura 5) incluyendo IFN $\gamma$  e IL-2 en comparación con el antígeno solo. El análisis de Luminex reveló que la producción de citoquinas GM-CSF, RANTES e IL-6 aumenta tras el bloqueo de PD-1.

Tinción de PD-1 humano sobre células humanas con parafina incorporada y fijadas con formalina

Debido a que las células sanguíneas estimuladas con SEB demostraron una expresión mejorada de PD-1 por medio de citometría de flujo, se usaron estas células para determinar si hPD-1,09A podía detectar PD-1 en un tejido con parafina incorporada y fijadas con formalina para uso histológico. Se estimularon células mononucleares sanguíneas periféricas de donante humano con 0,1  $\mu$ g/ml de SEB durante 3 días, después de lo cual se recogieron las células no adherentes (principalmente linfocitos), se lavaron dos veces con PBS y se centrifugaron (1100 rpm durante 5 min.). Se fijaron las células durante 10 minutos en formaldehído de 4 %, se incorporó la célula-pella a agarosa, se deshidrataron en etanol (posteriormente 70 %, 80 %, 96 % y 100 %) y xileno, y posteriormente se incorporaron a parafina. Se montaron secciones (4  $\mu$ m) sobre portaobjetos de vidrio y se hidrataron (xileno, etanol 100 %, 96 %, 80 %, 70 %, tampón PBS), después de lo cual se llevó a cabo la recuperación de antígeno en el tampón de citrato caliente usando metodología convencional. Se bloqueó la actividad de peroxidasa usando metanol de 100 % que incluía H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 0,3 % y se lavaron los portaobjetos en agua y PBS, Tween de 0,1 %. Se incubaron las secciones con hPD-1,09A durante 1,5 horas a temperatura ambiente, se lavaron con PBS-Tween, seguido de procedimientos de detección convencionales. Se contra-tiñeron los portaobjetos con hematotoxina durante 30 segundos a temperatura ambiente, se deshidrataron con xileno, y se montaron para el examen microscópico. Estos experimentos mostraron que los linfocitos procedentes de cultivos de PBMC estimulados con SEB se tiñeron intensamente (en comparación con el control de isotipo) con hPD-1,09A, al contrario que los cultivos de PBMC no estimulados, indicando que hPD-1,09A es útil como reactivo de diagnóstico.



**Ejemplo 4: Secuencias de Anticuerpo anti-PD-1 y Humanización Posterior**

## Clonación de ADNc de inmunoglobulina

5 Usando procedimientos basados en PCR de primero degenerado, se determinaron las secuencias de ADN que codificaban las regiones variables de los anticuerpos de ratón expresados por medio de los hibridomas hPD-1,08A y hPD-1,09A. Brevemente, se generaron ADNc específicos génicos para cadenas pesadas y ligeras, usando el estuche de síntesis de ADNc iScript Select (Biorad N°. 1708896) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los primeros de PCR usados estaban basados en el conjunto Ig-primeros (Novagen N°. 69831-3). Se llevaron a cabo reacciones de PCR degenerados usando Taq polimerasa de acuerdo con el protocolo de conjunto de primeros de Novagen. Se analizaron los productos de PCR por medio de electroforesis de gel de agarosa. El tamaño de amplicón esperado para ambas regiones variables de cadena ligera y pesada es de aproximadamente 500 pares de bases. Se clonaron dos µl de producto de PCR amplificado con Taq procedente de las reacciones que dieron como resultado una banda apropiada para dar lugar a un vector pCR4 TOPO (Invitrogen N°. K4595-40) y se transformaron en E.coli DH5-alfa dirigido por medio del fabricante. Se evaluaron los clones por medio de PCR de colonias usando primeros universales M13 directos e inversos y se eligieron de dos a tres clones para cada una de las reacciones para el análisis de secuenciación de ADN.

20 Se sometieron los clones a secuenciación en ambas direcciones usando primeros universales M13 directo, M13 inverso, T3 y T7. Se analizaron los resultados de cada reacción de secuenciación para cada clon usando Seqman. Se buscaron secuencias de consenso frente a bases de datos de secuencias de región de línea germinal y Ig Variable reordenada usando NCBI blastocito-Ig (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/ligblast/>). Los resultados de blastocitos para hPD-1,08A identificaron una cadena pesada reordenada de forma productiva (en bloque) sin la introducción de codones de detención. Se identificaron clones de cadenas ligeras que codificaban dos secuencias diferentes; una es una cadena ligera reordenada de forma productiva (en fase) sin la introducción de codones de detención, y la otra es una secuencia reordenada de forma no productiva que contiene un cambio de fase que conduce a un codón de detección en la región FR4. La fracción transcrita estéril no productiva observada se origina probablemente a partir del socio de fusión de mieloma (Carroll W. L. y col., Mol. Immunol. 25: 991-995 (1988) y se descartó.

30 Los resultados de blastocitos para hPD-1,09A identificaron cadenas ligeras y pesadas reordenadas de forma productiva (en fase) sin la introducción de codones de detención. Se confirmaron las secuencias de amino ácido de las proteínas expresadas por medio de espectrometría de masas. Se describen las secuencias en el Listado de Secuencia adjunto y se recogen en la Tabla IV.

35 Tabla IV: Números de ID de secuencia para los anticuerpos PD-1 anti-humano murinos de la presente invención

NO DE ID DE SECUENCIA:	Descripción
1	región variable de cadena pesada hPD-1,08A (ADN)
2	región variable de cadena ligera hPD-1,08A (ADN)
3	región variable de cadena pesada hPD-1,09A (ADN)
4	región variable de cadena ligera hPD-1,09A (ADN)
5	región variable de cadena pesada hPD-1,08A (AA)
6	región variable de cadena ligera hPD-1,08A (AA)
7	región variable de cadena pesada hPD-1,09A (AA)
8	región variable de cadena ligera hPD-1,09A (AA)
9	CDR1 de cadena ligera hPD-1,08A (AA)
10	CDR2 de cadena ligera hPD-1,08A (AA)
11	CDR3 de cadena ligera hPD-1,08A (AA)
12	CDR1 de cadena pesada hPD-1,08A (AA)
13	CDR2 de cadena pesada hPD-1,08A (AA)
14	CDR3 de cadena pesada hPD-1,08A (AA)
15	CDR1 de cadena ligera hPD-1,09A (AA)
16	CDR2 de cadena ligera hPD-1,09A (AA)
17	CDR3 de cadena ligera hPD-1,09A (AA)
18	CDR1 de cadena pesada hPD-1,09A (AA)
19	CDR2 de cadena pesada hPD-1,09A (AA)
20	CDR3 de cadena pesada hPD-1,09A (AA)
21	región variable de cadena pesada 109A-H (ADN)

(continuación)

NO DE ID DE SECUENCIA:	Descripción
22	región variable de cadena pesada 109A-H optimizada con codón (ADN)
23	longitud completa de cadena pesada 409A-H optimizada de codón (ADN)
24	región variable de cadena ligera K09A-L-11 (ADN)
25	región variable de cadena ligera K09A-L-16 (ADN)
26	región variable de cadena ligera K09A-L-17 (ADN)
27	región variable de cadena ligera K09A-L-11 optimizada de codón (ADN)
28	región variable de cadena ligera K09A-L-16 optimizada de codón (ADN)
29	región variable de cadena ligera K09A-L-17 optimizada de codón (ADN)
30	región variable de cadena pesada 109A-H (AA)
31	longitud completa de cadena pesada 409A-H (AA)
32	región variable de cadena ligera K09A-L-11 (AA)
33	región variable de cadena ligera K09A-L-16 (AA)
34	región variable de cadena ligera K09A-L-17 (AA)
35	longitud completa de cadena pesada 109A-H (AA)
36	longitud completa de cadena ligera K09A-L-11 (AA)
37	longitud completa de cadena ligera K09A-L-16 (AA)
38	longitud completa de cadena ligera K09A-L-17 (AA)

Se anotan las regiones de armazón y CDR de acuerdo con Kabat E.A. y col., 1991, Sequences of proteins of Immunological interest, en: NIH Publication N°. 91-3242, US Department of Health and Human Services, Bethesda, MD.

5

#### Construcción y Expresión de Anticuerpo c109A Híbrido

Se construyeron cadenas pesadas y ligeras híbridas por medio de unión de ADNc clonados con PCR de regiones de VL y VH de PD-1,09A de ratón a regiones constantes IgG1 y kappa humanas, respectivamente. Se modificaron los extremos 5' y 3' de las secuencias de ADNc de ratón usando primeros de PCR diseñados para añadir una secuencia predominante apropiada a cada cadena, y sitios de restricción para permitir la clonación para dar lugar a los vectores de expresión de anticuerpos recombinantes existentes.

10

Se sometieron a electroporación células COS-7 (0,7 ml a  $10^7$ /ml) con 10 µg cada una de los plásmidos híbridos de expresión de cadena pesada y ligera. Posteriormente, se sometieron estas células a cultivo en 8 ml de medio de proliferación durante tres días. Se usó ELISA sandwich para medir las concentraciones de anticuerpo en los sobrenadantes a partir de las transfecciones de COS-7. Esto mostró que las células COS-7 sometidas a transfección segregaron aproximadamente 295 ng/ml de anticuerpo kappa-IgG1 híbrido en tres transfecciones separadas.

15

20

Se midió la unión del anticuerpo híbrido producido por medio de las células COS-7 sometidas a transfección usando ELISA de unión de PD-1 y CELISA (véase Ejemplo 2) y se comprobó que se unían a PD-1 con afinidad comparable a la del anticuerpo murino.

#### Diseño de Anticuerpo Humanizado

25

Se humanizó el anticuerpo hPD-1,09A por medio de MRCT (Cambridge, Reino Unido) usando tecnología de injertado CDR (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N°. 5.225.539). Brevemente, se compararon las secuencias de cadena variables del anticuerpo murino hPD-1,09A con las disponibles en el banco de datos de proteínas Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB). Se generó un modelo de homología de hPD-1,09A basado en las estructuras VH y VK más próximas. Se identificaron y analizaron las secuencias humanas con la identidad más elevadas con respecto a hPD-1,09A. (Foote y Winter, J. Mol. Biol. 224: 487-499 (1992); Morea V. y col., Methods 20: 267-279 (2000); Chothia C. y col., J. Mol. Biol. 186: 651-663 (1985). Se identificaron los armazones humanos más apropiados sobre los cuales construir el CDR injertado con las cadenas pesadas y ligeras.

30

35

Para la cadena pesada, se determinó el armazón codificado por el N°. AB063829 de acceso al banco de genes como que era el más apropiado. El análisis de la secuencia hPD-1,09A VK muestra que su longitud de CDR1 (15 residuos) no se encontró en ningún humano VK. Por este motivo, se analizaron los armazones de tres longitudes CDR1 diferentes (residuos 11, 16 y 17) con el fin de someter a ensayo que longitud CDR1 reproduciría el comportamiento de hPD-1,09A VK. Se identificaron las secuencias VK humanas con la identidad más elevada a hPD-1,09A VK en los residuos seleccionados importantes en la estructura y con longitudes CDR1 11, 16 y 17. Se seleccionó el N°. M29469 de acceso al banco de genes sobre el cual se basó K109A-L-11. Se seleccionó el armazón del N°. AB064135 de acceso al banco de genes sobre el cual se basó K09A-L-16 y se escogió el armazón procedente del N°. X72431 de acceso al banco de genes sobre el cual se basó K09A-L-17.

40

45

Se llevaron a cabo injertos directos para generar construcciones de expresión para cada cadena. Se describen las secuencias de ADN y proteínas de 109A-H, K09A-L-11, K09A-L-16 y K09A-L-17 en el Listado de Secuencia adjunto

(Tabla IV).

Se produjo una versión de IgG4 de h109A humanizado, con la mutación de Adair de estabilización (Angal S. y col., Mol. Immunol. 30: 105-108 (1993)), en la que se convierte serina 241 (numeración de Kabat) en prolina. Esta secuencia se describe en los NOS DE SEQ. ID: 23 y 41.

**Ejemplo 5: Características de Unión y Propiedades Funcionales de Anticuerpos anti-PD-1 Humanizados**

**Producción y Purificación**

Se produjeron anticuerpos humanizados h409A11, H409A16 y h409A17 por medio de transfección transitoria de células CHO-S. Se sometieron las células a proliferación en medios CD-CHO (Gibco) y C5467 (Sigma) durante 8 días en matraces de agitación. Se purificaron los anticuerpos a partir de los sobrenadantes de células por medio de cromatografía de Proteína A, se lavaron, se eluyeron usando ácido acético 1 M y se neutralizaron usando Tris 3 M. Finalmente, se sometió a intercambio el tampón para ácido acético 100 mM que se había ajustado hasta pH 5,5 con base Tris 1 M.

**Análisis de Unión y Cinético**

Se llevaron a cabo ELISAs basados en proteína y en células para determinar las afinidades de unión aparentes (presentadas como valores EC 50) como se describe en el Ejemplo 2. Cada uno de los anticuerpos humanizados anti-PD-1 se unió a PD-1/Fc y expresaron celularmente PD-1 con valores de EC50 comparables al anticuerpo parental murino (Tabla V).

También se llevaron a cabo las características de unión cinéticas de los anticuerpos usando interferometría de bio-luz como se describe en el Ejemplo 2 (Figura 6). Dos de los anticuerpos humanizados, h409A11 y h409A16, se unieron considerablemente de manera más intensa que cualquier otro mAb sometido a ensayo usando esta prueba, siendo  $K_D$  determinado de 29 y 27 pM para h409A11 y h409A16, respectivamente (Tabla V). En comparación con los otros anticuerpos anti-PD-1 sometidos a ensayo, la mayor afinidad se debe principalmente a un menor tasa de desactivación. De manera similar a los anticuerpos parentales murinos, los anticuerpos anti-PD-1 humanizados h409A11, h409A16 demostraron unión a PD-1 cinomólogo PD-1 con  $K_D$  determinado por debajo de 120 pM.

**Bloqueo de Ligando**

Se midió la capacidad de los anticuerpos humanizados para bloquear la unión de PD-L1 y PD-L2 a PD-1 usando un ensayo de competición homogéneo y detección usando un ensayo de competición de FMAT como se describe en el Ejemplo 2.

La unión tanto de hPD-L1/Fc y hPD-L2/Fc a células CHO-hPD-1 se puede inhibir completamente de forma dependiente de la dosis por medio de cualesquiera anticuerpos humanizados sometidos a ensayo. Los datos de  $IC_{50}$  calculados se resumen en la Tabla V. Similarmente al anticuerpo hPD-1,09A murino parental, cada uno de los mAbs humanizados, h409A11, h409A16 y h409A17 inhibieron la unión de hPD-L1 y PD-L2 con valores de  $IC_{50}$  por debajo de 1nM. De manera similar a los anticuerpos parentales murinos, los anticuerpos anti-PD-1 humanizados h409A11, h409A16 y h409A17 demostraron inhibición de la unión de ligandos a PD-1 cinomólogo con valores de  $IC_{50}$  calculados por debajo de aproximadamente 1 nM.

Tabla V: Características de unión de los anticuerpos humanizados anti-hPD-1 de la invención

mAb	Análisis de Unión		Bloqueo de Ligando		Análisis Cinético		
	ELISA	CELISA	FMAT		Fortebio Octet		
	EC50 (pM)	EC50 (pM)	IC50 (pM)		$k_{asoc}$	$k_{disoc}$	$K_D$
	hPD-1/Fc	hPD-1/CHO	PD-L1	PD-L2	1/s	1/MS	M
h409A11	76	62	625	695	1,04E+06	3,05E-05	2,93E-11
h409A16	90	63	696	810	9,97E+05	2,72E-05	2,73E-11
h409A17	88	83	818	463	1,00E+06	1,91E-04	1,91E-10

**La Respuesta de Células T Humanas frente a SEB se Mejora por medio de mAbs Humanizados**

Se sometió a ensayo la capacidad de anticuerpos anti-PD-1 humanizados para mejorar la actividad de las células T in vitro usando células sanguíneas procedentes de voluntarios sanos como se describe en el Ejemplo 3. Se recogieron los sobrenadantes después de 4 días de cultivo y se cuantificó la cantidad de IL-2 producido usando ELISA. Los anticuerpos PD-1 humanizados demostraron la capacidad de aumentar la producción de IL-2 estimulada por SEB (Figura 7). De manera adicional, los anticuerpos anti-PD-1 humanizados aumentaron la producción de IL-2 inducida por SEB en sangre de pacientes con cáncer, de forma similar a como se describe en el Ejemplo 3.

# ES 2 437 327 T3

En resumen, los mAbs humanizados h409A11, h409A16 y h409A17 conservaron toda la actividad funcional durante el proceso de humanización. Los mAbs h409A11 y h409A16 conservaron completamente la afinidad del anticuerpo parental de ratón hPD109A tras humanización.

## 5 Listado de Secuencias

<110> N.V. Organon Carven, Gregory Van Enennaam, Hans Dulos, Gradus Johannes

<120> ANTICUERPOS FRENTE A HPD-1

10

<130> OR06827

<150> 60/944583

<151> 2007-06-18

15

<160> 38

<170> Versión de patenteIn 3,5

20

<210> 1

<211> 435

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> región variable de cadena pesada hPD-1,08A

<400> 1

30

```
atgrgatgga gctgtatcat kctctttttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactcccag      60
gtccaactgc agcagcctgg ggctgaactg gtgaagcctg gggcttcagt gaagttgtcc      120
tgcaaggcct ctggctacac cttcaccagt tattatctgt actggatgaa acagaggcct      180
ggacaaggcc ttgagtggat tgggggggtt aatcctagta atggtggtac taacttcagt      240
gagaagttca agagcaagge cacactgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg      300
caactcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtacaag aagggattct      360
aactacgacg ggggctttga ctactggggc caaggcacta ctctcacagt ctctcagcc      420
aaaacgacac cccca                                     435
```

<210> 2

<211> 453

35

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región variable de cadena ligera hPD-1,08A

40

<400> 2

45

50

ES 2 437 327 T3

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60  
gacattgtgc tgacacagtc tctacttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 120  
atctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct ttagttattt gcaactggtac 180  
caacagaaac caggacagcc acccaactc ctcactttc ttgcatccaa cctagagtct 240  
ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 300  
cctgtggagg aggaggagc tgcaacctat tattgtcagc acagttggga gcttccgctc 360  
acgttcgggtg ctgggaccaa gctggagctg aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc 420  
atcttcccac catccagtaa gcttgggaag ggc 453

5 <210> 3  
<211> 464  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> región variable de cadena pesada hPD-1,09A

<400> 3

atgraatgca gctggggttat yctctttttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactcccag 60  
gtccaactgc agcagcctgg ggctgaactg gtgaagcctg ggacttcagt gaagttgtcc 120  
tgcaaggctt ctggctacac cttcaccaac tactatatgt actgggtgaa gcagaggcct 180  
ggacaaggcc ttgagtggat tggggggatt aatcctagca atggtggtac taacttcaat 240  
gagaagttca agaacaaggc cacactgact gtagacagtt cctccagcac aacctacatg 300  
caactcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtacaag aagggttat 360  
aggttcgaca tgggctttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctcagcc 420  
aaaacgacac ccccatccgt ytatcccbtg gccctggaa gctt 464

15 <210> 4  
<211> 438  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> región variable de cadena ligera hPD-1,09A

25 <400> 4

30

ES 2 437 327 T3

atggagwcag acacaactset gytatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggc 60  
gacattgtgc tgacacagtc tctgcttcc ttagctgtat ctctgggaca gagggccgcc 120  
atctcatgca gggccagcaa aggtgtcagt acatctggct atagttattt gcaactggtac 180  
caacagaaac caggacagtc acccaaactc ctcatctatc ttgcatecta cctagaatct 240  
ggggtccttg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcacocct caacatccat 300  
cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga ccttccgctc 360  
acgttcggta ctgggaccaa gctggagctg aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc 420  
atcttcccac catccagt 438

<210> 5  
<211> 122  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
10 <223> región variable de cadena pesada hPD-1,08A

<400> 5  
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15  
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30  
Tyr Leu Tyr Trp Met Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45  
Gly Gly Val Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Ser Glu Lys Phe  
50 55 60  
Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Thr Arg Arg Asp Ser Asn Tyr Asp Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110  
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys  
115 120

15 <210> 6  
<211> 111  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

ES 2 437 327 T3

<220>

<223> región variable de cadena ligera hPD-1,08A

5 <400> 6

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser  
20 25 30

Gly Phe Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Phe Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala  
50 55 60

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

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp  
85 90 95

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
100 105 110

<210> 7

10 <211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> región variable de cadena pesada hPD-1,09A

<400> 7

20

25

30

35

ES 2 437 327 T3

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

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

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

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60

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

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

Thr Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys  
 115 120

<210> 8  
 <211> 111  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> región variable de cadena ligera hPD-1,09A

<400> 8

15

20

25

30



ES 2 437 327 T3

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

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

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

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

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

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg  
 85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105 110

5 <210> 9  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> CDR1 de cadena ligera hPD-1,08A  
 <400> 9

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Phe Ser Tyr Leu His  
 1 5 10 15

15 <210> 10  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> CDR2 de cadena ligera hPD-1,08A  
 <400> 10

25 Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
 1 5

30 <210> 11  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 437 327 T3

<220>  
 <223> CDR3 de cadena ligera hPD-1,08A  
 <400> 11  
 5  
                   Gln His Ser Trp Glu Leu Pro Leu Thr  
                   1                                  5  
 <210> 12  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 10 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> CDR1 de cadena pesada hPD-1,08A  
 15 <400> 12  
  
                           Ser Tyr Tyr Leu Tyr  
                           1                          5  
 20  
 <210> 13  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 25  
  
 <220>  
 <223> CDR2 de cadena pesada hPD-1,08A  
 30 <400> 13  
  
           Gly Val Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Ser Glu Lys Phe Lys  
           1                  5                          10                          15  
 35  
 <210> 14  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> CDR3 de cadena pesada hPD-1,08A  
 <400> 14  
  
                   Arg Asp Ser Asn Tyr Asp Gly Gly Phe Asp Tyr  
                   1                  5                          10  
 45  
  
 <210> 15  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 50  
  
 <220>  
 <223> CDR1 de cadena ligera hPD-1,09A  
 55 <400> 15

ES 2 437 327 T3

Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His  
 1 5 10 15

5 <210> 16  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> CDR2 de cadena ligera hPD-1,09A  
 <400> 16

Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser  
 1 5

15 <210> 17  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> CDR3 de cadena ligera hPD-1,09A  
 <400> 17

Gln His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr  
 1 5

30 <210> 18  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> CDR1 de cadena pesada hPD-1,09A  
 40 <400> 18

Asn Tyr Tyr Met Tyr  
 1 5

45 <210> 19  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>  
 <223> CDR1 de cadena pesada hPD-1,09A  
 <400> 19

55

ES 2 437 327 T3

Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Asn

5 <210> 20  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> CDR1 de cadena pesada hPD-1,09A  
 <400> 20

Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr  
 1 5 10

15 <210> 21  
 <211> 417  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> región variable de cadena pesada 109A-H

25 <220>  
 <221> sig\_péptido  
 <222> (1)..(57)

30 <400> 21

atggactgga cctggagcat ccttttcttg gtggcagcac caacaggagc ccaactccaa 60  
 gtgcagctgg tgcagtctgg agttgaagtg aagaagcccg gggcctcagt gaaggtctcc 120  
 tgcaaggctt ctggctacac ctttaccaac tactatatgt actgggtgcg acaggcccct 180  
 ggacaagggc ttgagtggat gggagggatt aatcctagca atggtggtac taacttcaat 240  
 gagaagttca agaacagagt caccttgacc acagactcat ccacgaccac agcctacatg 300  
 gaactgaaga gcctgcaatt tgacgacacg gccgtttatt actgtgcgag aagggattat 360  
 aggttcgaca tgggctttga ctactggggc caagggacca cggtcaccgt ctcgagc 417

35 <210> 22  
 <211> 417  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <223> región variable de cadena pesada 109A-H optimizada de codón

45 <220>  
 <221> sig\_péptido  
 <222> (1)..(57)

<400> 22

ES 2 437 327 T3

atggactgga cctgggtctat cctgttcctg gtggccgctc ctaccggegc tcaactcccag 60  
 gtgcagctgg tgcagtcctgg cgtggaggtg aagaagcctg ggcctccgt caaggtgtcc 120  
 tgcaaggcct ccggctacac cttcaccaac tactacatgt actgggtgcg gcaggctccc 180  
 ggccagggac tggagtggat gggcggcatc aacccttcca acggcggcac caacttcaac 240  
 gagaagttca agaaccgggt gaccctgacc accgactcct ccaccaccac cgcctacatg 300  
 gagctgaagt ccctgcagtt cgacgacacc gccgtgtact actgcgccag gcgggactac 360  
 cggttcgaca tgggcttcga ctactggggc cagggcacca ccgtgaccgt gtcctcc 417

<210> 23  
 <211> 1398  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <223> longitud completa de cadena pesada 409A-H optimizada de codón

10

<220>  
 <221> sig\_péptido  
 <222> (1)..(57)

15

<400> 23

atggccgtgc tgggctgct gttctgctg gtgaccttcc cttectgcgt gctgtcccag 60  
 gtgcagctgg tgcagtcctgg cgtggaggtg aagaagcctg ggcctccgt caaggtgtcc 120  
 tgtaaggcct ccggctacac cttcaccaac tactacatgt actgggtgcg gcaggcccca 180  
 ggccagggac tggagtggat gggcggcatc aacccttcca acggcggcac caacttcaac 240  
 gagaagttca agaaccgggt gaccctgacc accgactcct ccaccacaac cgcctacatg 300  
 gaactgaagt ccctgcagtt cgacgacacc gccgtgtact actgcgccag gcgggactac 360  
 cggttcgaca tgggcttcga ctactggggc cagggcacca ccgtgaccgt gtcctccgct 420  
 agcaccaagg gcccttccgt gttccctctg gcccttctgt cccgggccac ctccgagtcc 480  
 accgccgctc tgggctgtct ggtgaaggac tacttcctg agcctgtgac cgtgagctgg 540  
 aactctggcg ccctgacctc eggcgtgac accttcctg ccgtgctgca gtcctccggc 600

20

25

30

ES 2 437 327 T3

ctgtactccc tgtcctccgt ggtgaccgtg ccttcctcct ccctgggcac caagacctac 660  
 acctgcaacg tggaccacaa gccttccaac accaaggtgg acaagcgggt ggagtccaag 720  
 tacggccctc cttgccctcc ctgccctgcc cctgagttcc tgggcggacc ctccgtgttc 780  
 ctgttccctc ctaagcctaa ggacaccctg atgatctccc ggaccctga ggtgacctgc 840  
 gtggtggtgg acgtgtccca ggaagatcct gaggtccagt tcaattggta cgtggatggc 900  
 gtggaggtgc acaacgcca gaccaagcct cgggaggaac agttcaactc cacctaccgg 960  
 gtggtgtctg tgctgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaagga atacaagtgc 1020  
 aaggtcagca acaagggcct gccctcctcc atcgagaaaa ccatctccaa ggccaagggc 1080  
 cagcctcgcg agcctcaggt gtacaccctg cctcctagcc aggaagagat gaccaagaat 1140  
 caggtgtccc tgacatgcct ggtgaagggc ttctaccctt ccgatatcgc cgtggagtgg 1200  
 gagagcaacg gccagccaga gaacaactac aagaccacc ctcctgtgct ggactccgac 1260  
 ggctccttct tcctgtactc caggctgacc gtggacaagt cccggtgga ggaaggcaac 1320  
 gtcttttct gctccgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagtcctctg 1380  
 tcctgtctc tgggcaag 1398

<210> 24  
 <211> 393  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> región variable de cadena ligera K09A-L-11

<220>  
 <221> sig\_péptido  
 <222> (1)..(60)

15 <400> 24

atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60  
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120  
 ctctcctgca gggccagcaa aggtgtcagt acatctggct atagttattt gcactggtat 180  
 caacagaaac ctggccaggc tcccaggctc ctcatctatc ttgcatccta cctagaatct 240  
 ggcgtcccag ccaggttcag tggtagtggg tctgggacag acttcactct caccatcagc 300  
 agcctagagc ctgaagattt tgcagtttat tactgtcagc acagcagga ccttccgctc 360  
 acgttcggcg gagggaccaa agtggagatc aaa 393

<210> 25  
 <211> 393  
 <212> ADN

ES 2 437 327 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> región variable de cadena ligera K09A-L-16

5 <220>  
<221> sig\_péptido  
<222> (1)..(60)

10 <400> 25

atggaaaccc cagcgcagct tctcttcctc etgctactct ggctcccaga taccaccgga 60  
gaaattgtgc tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca ccctggaga gccggcctcc 120  
atctcctgca gggccagcaa aggtgtcagt acatctggct atagttattt gcattggtac 180  
ctccagaagc cagggcagtc tccacagctc ctgatctatc ttgcatccta cctagaatct 240  
ggggtccctg acaggttcag tggcagtgga tcaggcacag attttacct gaaaatcagc 300  
agagtggagg ctgaggatgt tggggtttat tactgccagc atagtaggga ctttccgctc 360  
acgtttggcc aggggaccaa gctggagatc aaa 393

<210> 26  
<211> 393  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> región variable de cadena ligera K09A-L-17

20 <220>  
<221> sig\_péptido  
<222> (1)..(60)

25 <400> 26

atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct gggctctctgg atccagtggg 60  
gatattgtga tgaccagac tccactctcc ctgcccgtca ccctggaga gccggcctcc 120  
atctcctgca gggccagcaa aggtgtcagt acatctggct atagttattt gcattggtat 180  
ctgcagaagc cagggcagtc tccacagctc ctgatctatc ttgcatccta cctagaatct 240  
ggagtcccag acaggttcag tggcagtggg tcaggcactg ctttcacct gaaaatcagc 300  
aggggtggagg ctgaggatgt tggactttat tactgccagc atagtaggga ctttccgctc 360  
acgtttggcc aggggaccaa gctggagatc aaa 393

<210> 27  
<211> 390  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

30

35

ES 2 437 327 T3

<220>  
 <223> región variable de cadena ligera K09A-L-11 optimizada de codón

5 <220>  
 <221> sig\_péptido  
 <222> (1)..(57)

<400> 27

```

atggcccctg tgcagctgct gggcctgctg gtgctgttcc tgccctgccaat gcggtgcgag      60
atcgtgctga cccagtcccc tgccaccctg tccttgagcc ctggcgagcg ggctaccctg      120
agctgcagag cctccaaggg cgtgtccacc tccggctact cctacctgca ctggtatcag      180
cagaagccag gccaggcccc tcggtgctg atctacctgg cctcctacct ggagtccggc      240
gtgccctgccc ggttctccgg ctccggaagc ggcaccgact tcaccctgac catctctctc      300
ctggagcctg aggacttcgc cgtgtactac tgccagcact cccgggacct gcctctgacc      360
tttggcggcg gaacaaaggt ggagatcaag      390
    
```

10

<210> 28  
 <211> 390  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>  
 <223> región variable de cadena ligera K09A-L-16 optimizada de codón

20 <220>  
 <221> sig\_péptido  
 <222> (1)..(57)

<400> 28

25

```

atggcccctg tgcagctgct gggcctgctg gtgctgttcc tgccctgccaat gcggtgcgag      60
atcgtgctga cccagtcccc tctgtccctg cctgtgacct ctggcgagcc tgccctccatc      120
tcctgccggg cctccaaggg cgtgtccacc tccggctact cctacctgca ctggtatctg      180
cagaagcctg gccagtcccc ccagtctgctg atctacctgg cctcctacct ggagtccggc      240
gtgccctgacc ggttctccgg ctccggcagc ggcaccgact tcaccctgaa gatctcccgg      300
gtggaggccg aggacgtggg cgtgtactac tgccagcact cccgggacct gcctctgacc      360
ttcggccagg gcaccaagct ggagatcaag      390
    
```

30 <210> 29  
 <211> 390  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

30

<220>  
 <223> región variable de cadena ligera K09A-L-17 optimizada de codón

35



ES 2 437 327 T3

<220>  
 <221> sig\_péptido  
 <222> (1)..(57)

5 <400> 29

```

atggcccctg tgcagctgct gggcctgctg gtgctgttcc tgccctgccat gcggtgcgac      60
atcgtgatga cccagacccc tctgtccctg cctgtgaccc ctggcgagcc tgccctccatc      120
tctgcccggg cctccaaggg cgtgtccacc tccggctact cctacctgca ctggtatctg      180
cagaagcctg gccagtcccc tcagctgctg atctacctgg cctcctacct ggagtcggcg      240
gtgcctgacc ggttctccgg ctccggaagc ggcaccgctt ttaccctgaa gatctccaga      300
gtggaggccg aggacgtggg cctgtactac tgccagcact cccgggacct gcctctgacc      360
ttcggccagg gcaccaagct ggagatcaag                                         390
    
```

10 <210> 30  
 <211> 139  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> región variable de cadena pesada 109A-H

20 <220>  
 <221> sig\_péptido  
 <222> (1)..(19)

<400> 30

```

Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Pro Thr Gly
1          5          10          15

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys
20          25          30

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

Thr Asn Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50          55          60

Glu Trp Met Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn
65          70          75          80

Glu Lys Phe Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr
85          90          95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val
100          105          110
    
```

25

ES 2 437 327 T3

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr  
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 130 135

<210> 31  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> longitud completa de cadena pesada 409A-H

<220>  
 <221> sig\_péptido  
 <222> (1)..(19)

<400> 31

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

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys  
 20 25 30

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

Thr Asn Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn  
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr  
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr  
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 130 135 140

20

ES 2 437 327 T3

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser  
 145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
 165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val  
 210 215 220

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys  
 225 230 235 240

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly  
 245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu  
 275 280 285

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg  
 305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu  
 340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 370 375 380

ES 2 437 327 T3

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp  
 420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu  
 450 455 460

Gly Lys  
 465

5 <210> 32  
 <211> 130  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> región variable de cadena ligera K09A-L-11

15 <220>  
 <221> sig\_péptido  
 <222> (1)..(19)

<400> 32

Met Ala Pro Val Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Phe Leu Pro Ala  
 1 5 10 15

Met Arg Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu  
 20 25 30

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val  
 35 40 45

Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 50 55 60

Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly  
 65 70 75 80

Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
 85 90 95

ES 2 437 327 T3

Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln  
 100 105 110

His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu  
 115 120 125

Ile Lys  
 130

<210> 33  
 <211> 130  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> región variable de cadena ligera K09A-L-16

<220>  
 <221> sig\_péptido  
 <222> (1)..(19)

<400> 33

Met Ala Pro Val Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Phe Leu Pro Ala  
 1 5 10 15

Met Arg Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val  
 20 25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val  
 35 40 45

Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly  
 50 55 60

Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly  
 65 70 75 80

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
 85 90 95

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln  
 100 105 110

His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu  
 115 120 125

Ile Lys  
 130

ES 2 437 327 T3

<210> 34  
 <211> 130  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> región variable de cadena ligera K09A-L-17  
 10  
 <220>  
 <221> sig\_péptido  
 <222> (1)..(19)  
 <400> 34  
 Met Ala Pro Val Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Phe Leu Pro Ala  
 1 5 10 15  
 Met Arg Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val  
 20 25 30  
 Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val  
 35 40 45  
 Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly  
 50 55 60  
 Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly  
 65 70 75 80  
 Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu  
 85 90 95  
 Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln  
 100 105 110  
 His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu  
 115 120 125  
 Ile Lys  
 130  
 15  
 <210> 35  
 <211> 469  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 20  
 <220>  
 <223> longitud completa cadena pesada 109A-H  
 25  
 <220>  
 <221> sig\_péptido  
 <222> (1)..(19)  
 <400> 35  
 30

ES 2 437 327 T3

Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys  
1, 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys  
20 25 30

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

Thr Asn Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
50 55 60

Glu Trp Met Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn  
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr  
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val  
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr  
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
195 200 205

5

10

ES 2 437 327 T3

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 210 215 220

Asn His Lys Pro Ser Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
 225 230 235 240

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 245 250 255

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 260 265 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 275 280 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 305 310 315 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
 370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser



ES 2 437 327 T3

450

455

460

Leu Ser Pro Gly Lys  
465

<210> 36

<211> 237

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> longitud completa cadena ligera K09-L11

10

<220>

<221> sig\_péptido

<222> (1)..(19)

15 <400> 36

Met Ala Pro Val Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Phe Leu Pro Ala  
1 5 10 15

Met Arg Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu  
20 25 30

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val  
35 40 45

Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
50 55 60

Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly  
65 70 75 80

Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
85 90 95

Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln  
100 105 110

His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu  
115 120 125

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser  
130 135 140

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn  
145 150 155 160

ES 2 437 327 T3

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala  
 165 170 175

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys  
 180 185 190

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp  
 195 200 205

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu  
 210 215 220

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235

5 <210> 37  
 <211> 237  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> longitud completa cadena ligera K09-L16

15 <220>  
 <221> sig\_péptido  
 <222> (1)..(19)  
 <400> 37

Met Ala Pro Val Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Phe Leu Pro Ala  
 1 5 10 15

Met Arg Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val  
 20 25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val  
 35 40 45

Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly  
 50 55 60

Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly  
 65 70 75 80

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
 85 90 95

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln

ES 2 437 327 T3

	100		105		110														
His	Ser	Arg	Asp	Leu	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu				
		115					120					125							
Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser				
	130					135					140								
Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn				
145					150					155					160				
Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala				
				165					170					175					
Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys				
			180					185					190						
Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp				
		195					200					205							
Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu				
	210					215					220								
Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys							
225					230					235									

5 <210> 38  
 <211> 237  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> longitud completa cadena ligera K09-L17

15 <220>  
 <221> sig\_péptido  
 <222> (1)..(19)

<400> 38

ES 2 437 327 T3

Met Ala Pro Val Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Phe Leu Pro Ala  
 1 5 10 15

Met Arg Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val  
 20 25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val  
 35 40 45

Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly  
 50 55 60

Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly  
 65 70 75 80

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu  
 85 90 95

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln  
 100 105 110

His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu  
 115 120 125

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser  
 130 135 140

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn  
 145 150 155 160

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala  
 165 170 175

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys  
 180 185 190

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp  
 195 200 205

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu  
 210 215 220

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235

## REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a PD-1 humano, que comprende:
- Nos. de SEQ ID de CDRs de cadena ligera: 15, 16 y 17 y Nos. de SEQ ID de CDRs: 18, 19 y 20; en el que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo bloquea la unión de PD-L1 humano y PD-L2 humano a PD-1 humano.
- 10 2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo bloquea la unión de PD-L1 humano y/o PD-L2 humano a PD-1 humano, con un IC<sub>50</sub> de aproximadamente 1 nM o menor.
- 15 3. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 ó 2, que comprende:
- a. una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:
- 20 i. N°. de SEQ ID: 7 o una de sus variantes, en la que dicha variante comprende una, dos o tres sustituciones de amino ácido modificadas de forma conservativa;
- ii. residuos de amino ácido de 20 a 139 de N°. de SEQ ID: 30 o una de sus variantes, en los que dicha variante comprende una, dos o tres sustituciones de amino ácido modificado de forma conservativa; y
- iii. una secuencia de amino ácido que tiene al menos 90 % de homología con residuos de amino ácido 20 a 139 de N°. de SEQ ID: 30;
- 25 y que además comprende
- b. una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido seleccionada entre el grupo que consiste en:
- 30 i. N°. de SEQ ID: 8 o una de sus variantes, en la que dicha variante comprende una, dos o tres sustituciones de amino ácido modificadas de forma conservativa;
- ii. residuos de amino ácido de 20 a 130 de N°. de SEQ ID: 32 o una de sus variantes, en los que dicha variante comprende una, dos o tres sustituciones de amino ácido modificado de forma conservativa; y
- 35 iii. residuos de amino ácido de 20 a 130 de N°. de SEQ ID: 33 o una de sus variantes, en los que dicha variante comprende una, dos o tres sustituciones de amino ácido modificado de forma conservativa; y
- iv. residuos de amino ácido de 20 a 130 de N°. de SEQ ID: 34 o una de sus variantes, en los que dicha variante comprende una, dos o tres sustituciones de amino ácido modificado de forma conservativa; y
- v. una secuencia de amino ácido que tiene al menos 90 % de homología con residuos de amino ácido 20 a 130 de N°. de SEQ ID: 32, 33 ó 34.
- 40 4. El anticuerpo de la reivindicación 1 ó 2, que comprende:
- a. una cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido seleccionada entre el grupo que consiste en:
- 45 i. residuos de amino ácido de 20 a 466 de N°. de SEQ ID: 31 o una de sus variantes, en los que dicha variante comprende una, dos o tres sustituciones de amino ácido modificado de forma conservativa; y
- ii. residuos de amino ácido de 20 a 469 de N°. de SEQ ID: 35 o una de sus variantes, en los que dicha variante comprende una, dos o tres sustituciones de amino ácido modificado de forma conservativa;
- 50 y
- b. una cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:
- 55 i. residuos de amino ácido de 20 a 237 de N°. de SEQ ID: 36 o una de sus variantes, en los que dicha variante comprende una, dos o tres sustituciones de amino ácido modificado de forma conservativa;
- ii. residuos de amino ácido de 20 a 237 de N°. de SEQ ID: 37 o una de sus variantes, en los que dicha variante comprende una, dos o tres sustituciones de amino ácido modificado de forma conservativa; y
- 60 iii. residuos de amino ácido de 20 a 237 de N°. de SEQ ID: 38 o una de sus variantes, en los que dicha variante comprende una, dos o tres sustituciones de amino ácido modificado de forma conservativa.
5. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a PD-1 humano, que comprende
- a. una región variable de cadena pesada que comprende residuos de amino ácido de 20 a 139 de N°. de SEQ ID: 30, y
- 65 b. una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácidos seleccionada entre el

grupo que consiste en:

- i. residuos de amino ácido de 20 a 130 de N°. de SEQ ID: 32;
- ii. residuos de amino ácido de 20 a 130 de N°. de SEQ ID: 33; y
- iii. residuos de amino ácido de 20 a 130 de N°. de SEQ ID: 34.

6. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a PD-1 humano, que comprende

- a. una cadena pesada que comprende residuos de amino ácido de 20 a 466 de NO de ID de SEQ: 31, y
- b. una cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

- i. residuos de amino ácido de 20 a 237 de N°. de SEQ ID: 36;
- ii. residuos de amino ácido de 20 a 237 de N°. de SEQ ID: 37; y
- iii. residuos de amino ácido de 20 a 237 de N°. de SEQ ID: 38.

7. El anticuerpo de la reivindicación 6, en el que la cadena pesada comprende residuos de amino ácido de 20 a 466 de N°. de SEQ ID: 31 y la cadena ligera comprende residuos de amino ácido 20 a 237 de N°. de SEQ ID: 36.

8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 5, que además comprende una región constante de cadena pesada que comprende una región constante de cadena pesada humana  $\gamma 4$  o  $\gamma 1$ .

9. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo:

- a. se une a PD-1 humano con un  $K_D$  de aproximadamente 100 pM o menor;
- b. se une a PD-1 humano con un  $K_D$  de aproximadamente 30 pM o menor;
- c. se une a PD-1 humano con aproximadamente el mismo  $K_D$  que un anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de amino ácidos de N°. de SEQ ID: 31 y una cadena ligera que comprende la secuencia de amino ácidos de N°. de SEQ ID: 32;
- d. se une a PD-1 humano con aproximadamente el mismo  $K_D$  que un anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de amino ácidos de N°. de SEQ ID: 31 y una cadena ligera que comprende la secuencia de amino ácidos de N°. de SEQ ID: 33;
- e. se une a PD-1 humano con un  $k_{asoc}$  de aproximadamente  $7,5 \times 10^5$  l/M·s o más rápido;
- f. se une a PD-1 humano con un  $k_{asoc}$  de aproximadamente  $1 \times 10^6$  l/M·s o más rápido;
- g. se une a PD-1 humano con un  $k_{disoc}$  de aproximadamente  $2 \times 10^{-5}$  l/s o más lento;
- h. se une a PD-1 humano con un  $k_{disoc}$  de aproximadamente  $2,7 \times 10^{-5}$  l/s o más lento;
- i. se une a PD-1 humano con un  $k_{disoc}$  de aproximadamente  $3 \times 10^{-5}$  l/s o más lento; o
- j. bloquea la unión de PD-L1 humano y/o PD-L2 humano a PD-1 humano con un  $IC_{50}$  de aproximadamente 1nM o menor.

10. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es:

- a. un anticuerpo híbrido o uno de sus fragmentos;
- b. un anticuerpo humano o uno de sus fragmentos; o
- c. un anticuerpo humanizado o uno de sus fragmentos.

11. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el fragmento de anticuerpo está seleccionado entre el grupo que consiste en Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(aV)<sub>2</sub> y un diacuerpo.

12. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo aumenta la activación de las células T.

13. Un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

14. El polinucleótido aislado de la reivindicación 13, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende residuos de amino ácido 20 a 466 de N°. de SEQ ID: 31 y una cadena ligera que comprende residuos de amino ácido de 20-237 de N°. de SEQ ID: 36.

15. El polinucleótido aislado de la reivindicación 13, que comprende N°. de SEQ ID: 23 y N°. de SEQ ID: 27 o N°. de SEQ ID: 22 y N°. de SEQ ID: 27.

16. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a

15.

17. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la reivindicación 16.

5 18. Un procedimiento de producción de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 que comprende:

10 a. someter a cultivo la célula hospedadora de la reivindicación 17 en un medio de cultivo en condiciones en las que se expresa la secuencia de ácido nucleico, produciendo de este modo polipéptidos que comprenden las regiones variables de cadena ligera y pesada; y  
b. recuperar los polipéptidos de la célula hospedadora o del medio de cultivo.

15 19. Una composición que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o que se puede obtener por medio del procedimiento de la reivindicación 18 en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

20 20. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o que se puede obtener por medio del procedimiento de la reivindicación 18 para su uso en el tratamiento de cáncer o una infección o enfermedad infecciosa.

21. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 12, para su uso en un procedimiento para el tratamiento de cáncer.

Figura 1

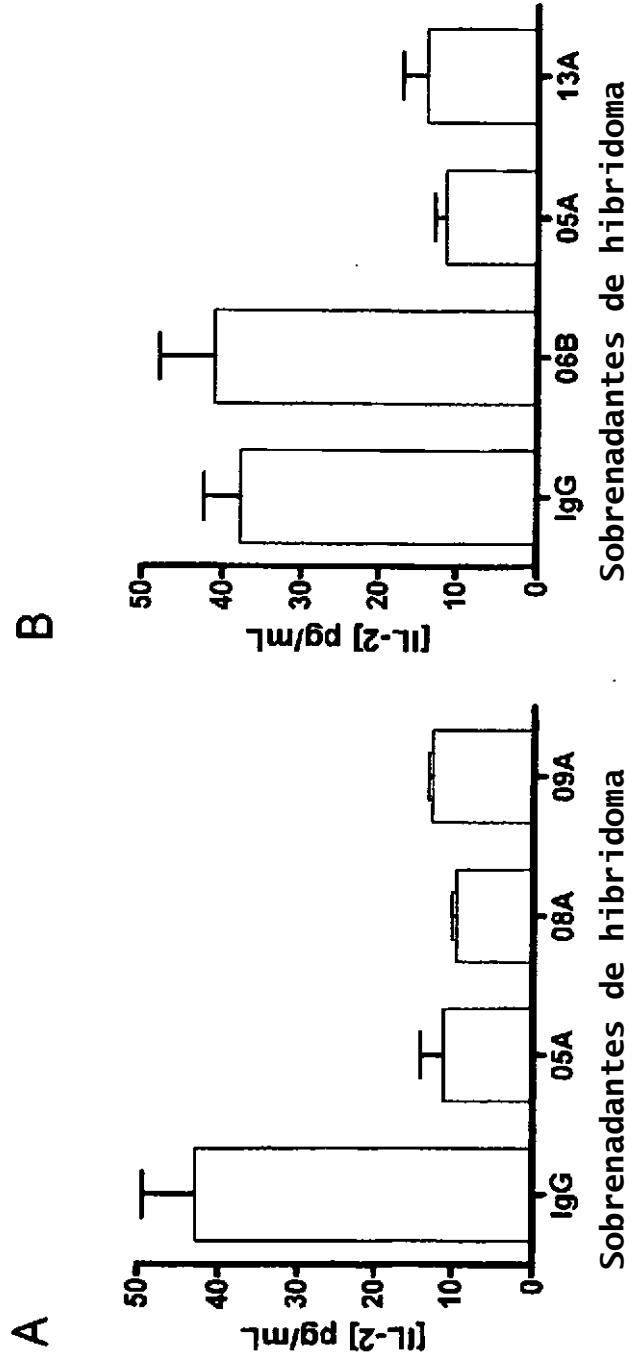




Figura 2

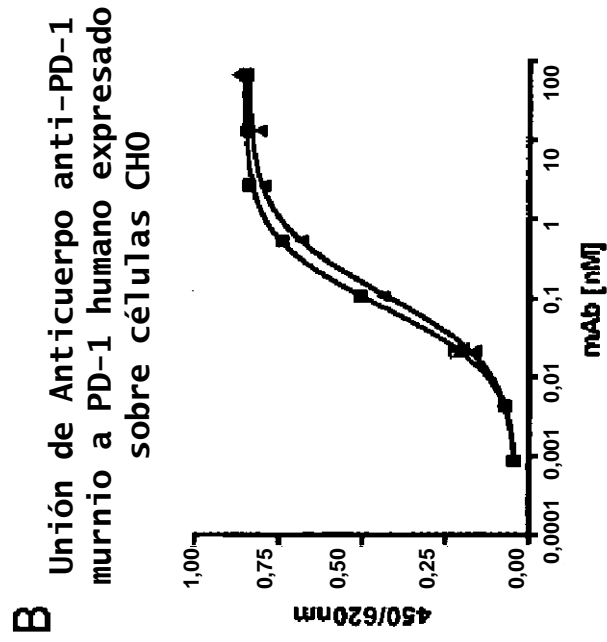
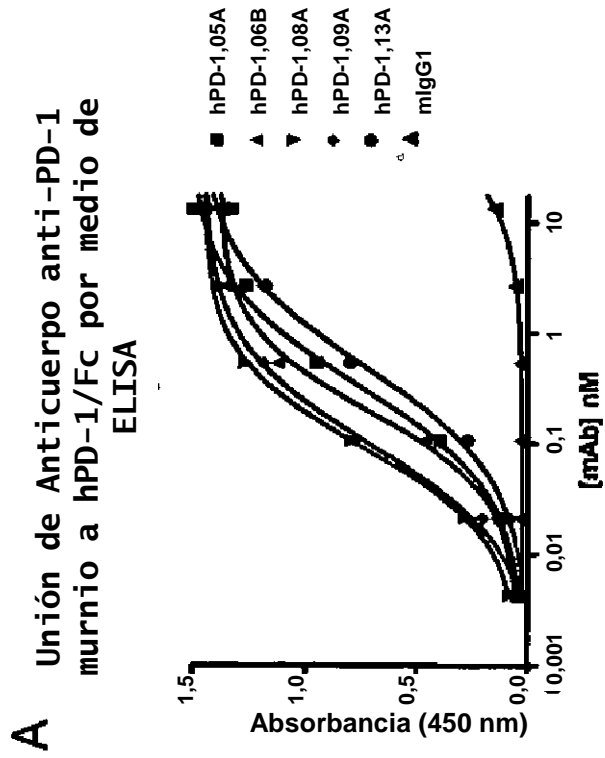


Figura 3

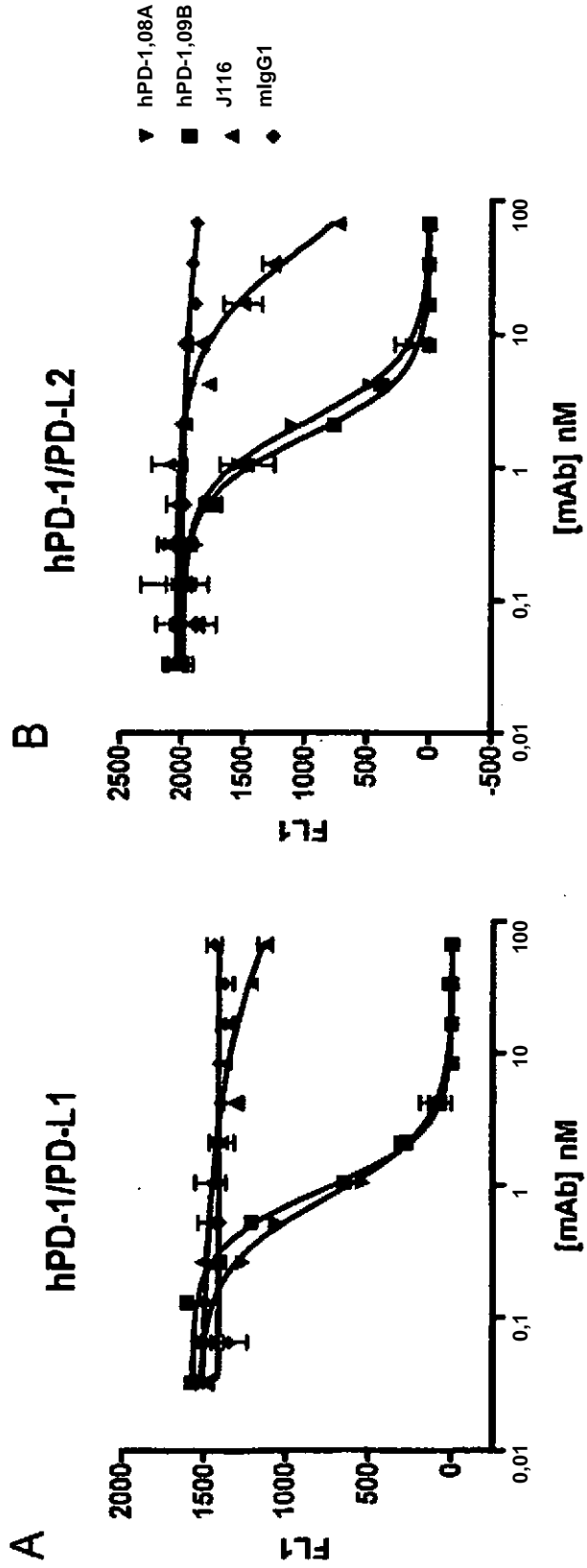


Figura 4

Estimulación de sangre entera con SEB

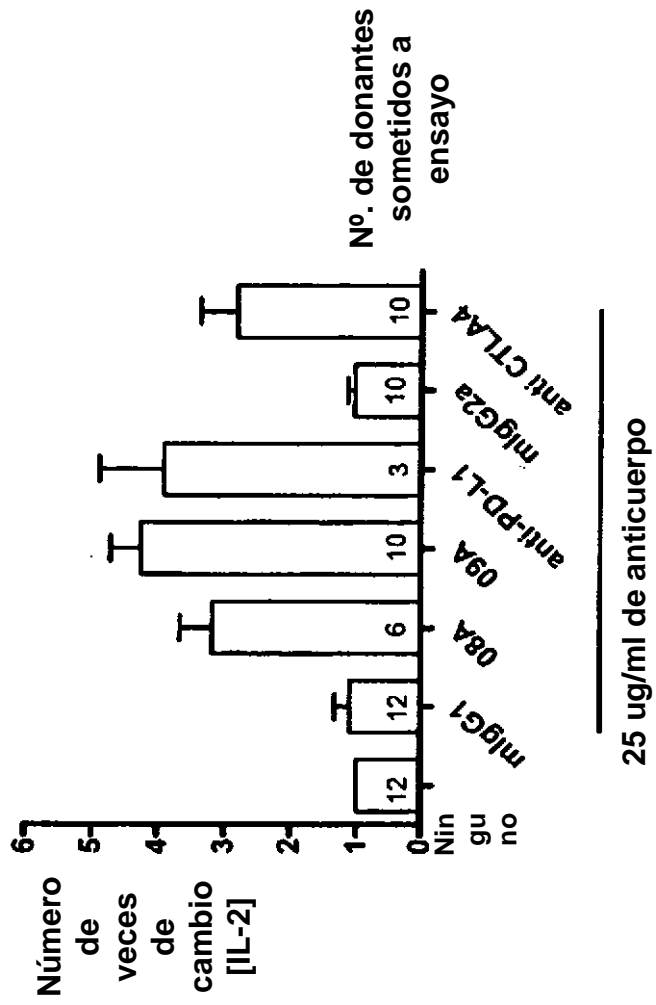


Figura 5

Respuesta de Reclutamiento TT

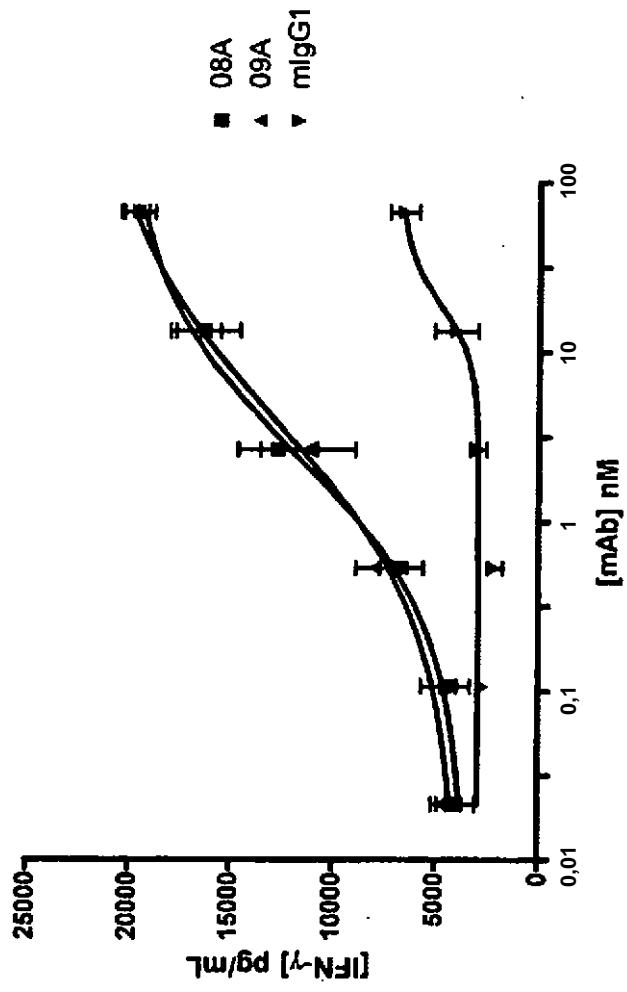


Figura 6  
Análisis cinético de mAbs anti-PD-1

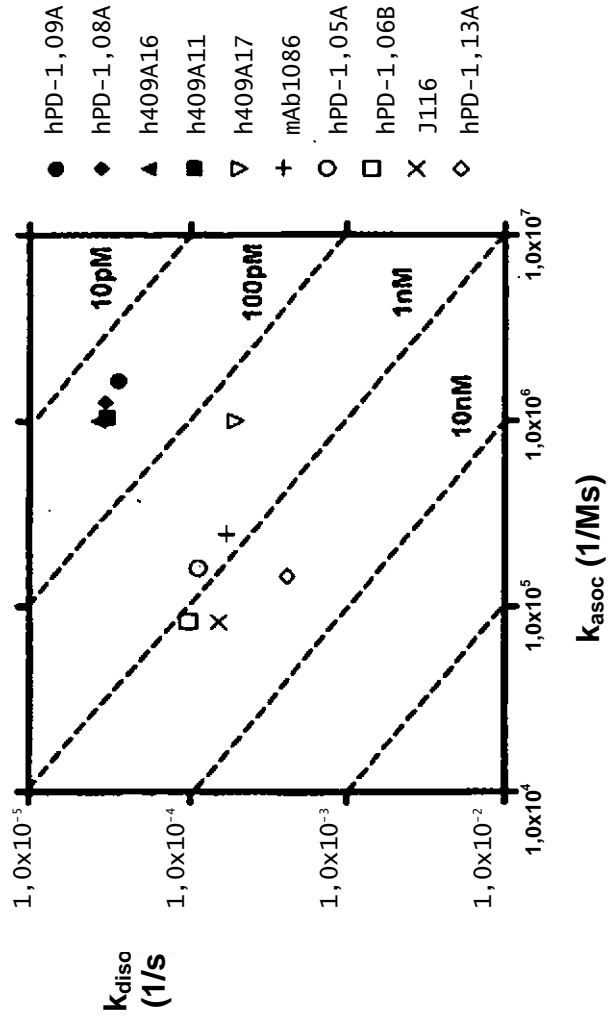


Figura 7

