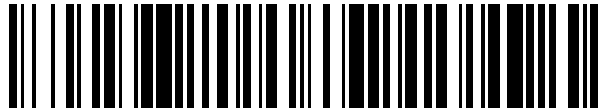


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 333**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2006 E 06786260 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015 EP 1907424**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales humanos para ligandos 1 (PD-L1) de muerte programada**

30 Prioridad:

01.07.2005 US 696426 P

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

22.09.2015

73 Titular/es:

**E. R. SQUIBB & SONS, L.L.C. (100.0%)
Route 206 & Province Line Road
Princeton, NJ 08540, US**

72 Inventor/es:

**KORMAN, ALAN J.;
SELBY, MARK J.;
WANG, CHANGYU;
SRINIVASAN, MOHAN;
PASSMORE, DAVID B.;
HUANG, HAICHUN y
CHEN, HAIBIN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 546 333 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 monoclonales humanos para ligandos 1 (PD-L1) de muerte programada

5 **Antecedentes**

La muerte programada 1 (PD-1) es un miembro de la familia de receptores CD28, que incluye CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1 y BTLA. Los miembros iniciales de la familia, CD28 e ICOS, se descubrieron por efecto funcional al aumentar la proliferación de células T después de la adición de anticuerpos monoclonales (Hutloff *et al.* (1999) *Nature* 397:263266; Hansen *et al.* (1980) *Immunogenics* 10:247-260). Se han identificado dos ligandos de glicoproteína de superficie celular para PD-1, PD-L1 y PD-L2, y se ha demostrado que subregulan la activación de células T y la secreción de citoquina al enlazarse a PD-1 (Freeman *et al.* (2000) *J Exp Med* 192:1027-34; Latchman *et al.* (2001) *Nat Immunol* 2:261-8; Carter *et al.* (2002) *Eur J Immunol* 32:634-43; Ohigashi *et al.* (2005) *Clin Cancer Res* 11:2947-53). Tanto PD-L1 (B7-H1) como PD-L2 (B7-DC) son homólogos de B7 que se enlazan a PD-1, pero no se enlazan a otros miembros de la familia CD28 (Blank *et al.* (2004). La expresión de PD-L1 en la superficie celular también ha demostrado suprarregularse a través de la estimulación de IFN- γ .

La expresión de PD-L1 se ha encontrado en varios cánceres humano y murinos, que incluyen pulmón humano, carcinoma de colón y ovario y varios mielomas (Iwai *et al.* (2002) *PNAS* 99:12293-7; Ohigashi *et al.* (2005) *Clin Cancer Res* 11:2947-53). Se ha sugerido que PD-L1 juega un papel en la inmunidad tumoral al incrementar la apoptosis de clones de células T específicas de antígeno (Dong *et al.* (2002) *Nat Med* 8:793-800). Se ha sugerido que PD-L1 puede involucrarse en la inflamación mucosa intestinal y la inhibición de PD-L1 suprime la enfermedad consuntiva asociada con colitis (Kanai *et al.* (2003) *J Immunol* 171:4156-63).

Koga *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24:2057-2062, 2004 notifican que el bloqueo de la interacción entre PD-1 y PD-L1 acelera la enfermedad de injerto arterial en aloinjerto cardiaco. Blank *et al.*, *Cancer Research* 64, 1140-1145, 2004 notifican que PD-L1/B7H-1 inhibe la fase efectora del rechazo del tumor mediante linfocitos T CD8+ transgénicos para el receptor de linfocitos T (TCR).

El documento se refiere a composiciones inmunopotenciadoras que comprenden un inhibidor de la señal inmunosupresora de PD-1, PD-L1 o PD-L2. El inhibidor puede ser un anticuerpo.

Barber *et al.*, *Nature* 439, 682-687, 2006 describe la restauración de la función en linfocitos T CD8 agotados durante la infección vírica crónica. La administración *vivo* de anticuerpos que cloquean la interacción entre PD-1 y PD-L1 potenció las respuestas de los linfocitos T. Brown *et al.*, *J. Immunol.* 170(3), 1257-1266 notifican que el bloqueo de los ligandos de PD-1 en células dendríticas potencia la activación e linfocitos T y la producción de citoquinas.

Sumario

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales aislados, en particular anticuerpos monoclonales humanos que se enlazan a PD-L1 y exhiben numerosas propiedades deseables. Estas propiedades incluyen enlace de alta afinidad a PD-L1 humano. Aún además, se ha demostrado que los anticuerpos de la invención incrementan la proliferación de células T, secreción de IFN- γ , y secreción de IL-2 en una reacción de linfocitos mezclada.

De acuerdo con ello, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de enlace a antígeno del mismo que tiene:

- (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEC ID N°:22;
- (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEC ID N°:32;
- (c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEC ID N°:42;
- (d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEC ID N°:52;
- (e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEC ID N°:62; y
- (f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEC ID N°:72.

Preferentemente el anticuerpo es un anticuerpo humano, aunque en realizaciones alternativas el anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico o humanizado.

En realizaciones particulares, el anticuerpo se enlaza a PD-L1 humano con un K_D de 5×10^{-8} M o menos, se enlaza a PD-L1 humano con un K_D de 1×10^{-8} M o menos, se enlaza a PD-L1 humano con un K_D de 5×10^{-9} M o menos, se enlaza a PD-L1 humano con un K_D de 5×10^{-9} M o menos, o se enlaza a PD-L1 humano con un K_D de entre 1×10^{-8} M y 1×10^{-10} M.

En una realización preferida, los anticuerpos comprenden adicionalmente al menos una de las siguientes propiedades:

- 5 (a) el anticuerpo incrementa la proliferación de células T en un ensayo de reacción de linfocitos mezclada (MLR);
 (b) el anticuerpo incrementa la producción de interferón- γ en un ensayo MLR; o
 (c) el anticuerpo incrementa la secreción de IL-2 en un ensayo MLR.

En realizaciones preferidas, el anticuerpo de la invención, o porción de enlace a antígeno del mismo, comprende:

- 10 (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº:2; y seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID N^{os}:21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, y 30;
 (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº:12.

- 15 Los anticuerpos invención pueden ser, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, por ejemplo de un isotipo de IgG1 o IgG4. Alternativamente, los anticuerpos pueden ser fragmentos de anticuerpo, tales como fragmentos Fab o Fab'2, o anticuerpos de cadena única.

20 La invención también proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo monoclonal de la invención, o porción de enlace a antígeno del mismo, enlazado a un agente terapéutico, como una citotoxina o un isótopo radioactivo. La invención también proporciona una molécula biespecífica que comprende un anticuerpo monoclonal, o porción de enlace a antígeno del mismo, de la invención, enlazada a un segundo residuo funcional que tiene una especificidad de enlace diferente que dicho anticuerpo, o porción de enlace a antígeno del mismo.

25 Las composiciones que comprenden un anticuerpo monoclonal, o porción de enlace a antígeno del mismo, o inmunoconjugado o molécula biespecífica de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable también se proporcionan.

30 Moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos, o porciones de enlace a antígeno de los mismos, de la invención también se comprenden por la invención, así como también vectores de expresión que comprenden tales ácidos nucleicos y células hospedadoras que comprenden tales vectores de expresión. Además, la invención proporciona un ratón transgénico que comprende transgenes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina humana, en donde el ratón expresa un anticuerpo la presente descripción de la invención, así como también hibridomas preparadas de tal un ratón, en donde el hibridoma produce el anticuerpo de la invención.

35 En todavía otro aspecto, la invención proporciona anticuerpo monoclonal, o una porción de enlace a antígeno del mismo, de la invención para su uso en la modulación de una respuesta inmune en un sujeto se modula. Preferentemente, el anticuerpo de la invención mejora, estimula o incrementa la respuesta inmune en el sujeto.

40 En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal , o porción de enlace a antígeno del mismo de la invención para utilizarse en un método de inhibición del crecimiento de células tumorales en un sujeto. Otros anticuerpos anti-PD-L1 pueden utilizarse en su lugar o en combinación con un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención. Por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 quimérico, humanizado o completamente humano puede utilizarse en el método para inhibir el crecimiento tumoral.

45 En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal, o porción de enlace a antígeno del mismo para utilizarse en un método para tratar una enfermedad infecciosa en un sujeto. Otros anticuerpos anti-PD-L1 pueden utilizarse en su lugar o en combinación con un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención. Por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 quimérico, humanizado o completamente humano puede utilizarse en el método para tratar una enfermedad infecciosa.

50 Además, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal, o porción de enlace a antígeno del mismo, de la invención, para utilizarse en un método para mejorar una respuesta inmune a un antígeno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto. El antígeno puede ser, por ejemplo, un antígeno tumoral, un antígeno viral, un antígeno bacteriano o un antígeno de un patógeno. Otros anticuerpos anti-PD-L1 pueden utilizarse en su lugar (o en combinación con un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención). Por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 quimérico, humanizado o completamente humano puede utilizarse en el método para mejorar una respuesta inmune a un antígeno en un sujeto. .

60 **Breve descripción de los dibujos**

Figura 1A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N^o:81) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N^o:1) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 3010. Las regiones CDR1 (SEC ID N^o:21), CDR2 (SEC ID N^o:31) y CDR3 (SEC ID N^o:41) se delinean y se indican las derivaciones de línea germinal V, D y J.

Figura 1B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N^o:91) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N^o:11) de

la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 3G10. Las regiones CDR1 (SEC ID N°:51), CDR2 (SEC ID N°:61) y CDR3 (SEC ID N°:71) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

Figura 2A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 82) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N°:2) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 12A4. Las regiones CDR1 (SEC ID N°:22), CDR2 (SEC ID N°:32) y CDR3 (SEC ID N°:42) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

Figura 2B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°:92) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N°:12) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 12A4. Las regiones CDR1 (SEC ID N°:52), CDR2 (SEC ID N°:62) y CDR3 (SEC ID N°: 72) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

Figura 3A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 83) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 3) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 10A5. Las regiones CDR1 (SEC ID N°:23), CDR2 (SEC ID N°:33) y CDR3 (SEC ID N°:43) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

Figura 3B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°:93) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N°:13) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 10A5. Las regiones CDR1 (SEC ID N°:53), CDR2 (SEC ID N°:63) y CDR3 (SEC ID N°:73) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

Figura 4A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 84) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N°:4) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 5F8. Las regiones CDR1 (SEC ID N°:24), CDR2 (SEC ID N°:34) y CDR3 (SEC ID N°:44) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

Figura 4B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°:94) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N°:14) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 5F8. Las regiones CDR1 (SEC ID N°:54), CDR2 (SEC ID N°:64) y CDR3 (SEC ID NO:74) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

Figura 5A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°:85) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 5) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 10H10. Las regiones CDR1 (SEC ID N°:25), CDR2 (SEC ID N°:35) y CDR3 (SEC ID N°:45) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

Figura 5B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°:95) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N°:15) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 10H10. Las regiones CDR1 (SEC ID N°:55), CDR2 (SEC ID N°:65) y CDR3 (SEC ID N°:75) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

Figura 6A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 86) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N°:6) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 1B12. Las regiones CDR1 (SEC ID N°:26), CDR2 (SEC ID N°:36) y CDR3 (SEC ID N°:46) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

Figura 6B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°:96) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N°:16) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 1B12. Las regiones CDR1 (SEC ID N°:56), CDR2 (SEC ID N°:66) y CDR3 (SEC ID N°: 76) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

Figura 7A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 87) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 7) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 7HI. Las regiones CDR1 (SEC ID N°:27), CDR2 (SEC ID N°:37) y CDR3 (SEC ID N°:47) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

Figura 7B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°:97) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N°:17) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 7HI. Las regiones CDR1 (SEC ID N°:57), CDR2 (SEC ID N°:67) y CDR3 (SEC ID N°:77) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

Figura 8A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 88) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 8) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 11E6. Las regiones CDR1 (SEC ID N°:28), CDR2 (SEC ID N°:38) y CDR3 (SEC ID N°:48) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

Figura 8B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°:98) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N°:18) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 11E6. Las regiones CDR1 (SEC ID N°:58), CDR2 (SEC ID N°:68) y CDR3 (SEC ID N°:78) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

Figura 9A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 89) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N°:9) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 12B7. Las regiones CDR1 (SEC ID N°:29), CDR2 (SEC ID N°:39) y CDR3 (SEC ID N°:49) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

Figura 9B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°:99) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N°:19) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 12B7. Las regiones CDR1 (SEC ID N°:59), CDR2 (SEC ID N°:69) y CDR3 (SEC ID N°: 79) se delimitan y se indican las derivaciones de línea

germinal V y J.

Figura 10A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 90) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N°:10) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 13G4. Las regiones CDR1 (SEC ID N°:30), CDR2 (SEC ID N°:40) y CDR3 (SEC ID N°: 50) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

Figura 10B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°:100) y secuencia de aminoácidos (SEC ID N°:20) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 13G4. Las regiones CDR1 (SEC ID N°:60), CDR2 (SEC ID N°:70) y CDR3 (SEC ID N°:80) se delimitan y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

Figura 11 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 3G10 con la secuencia de aminoácidos V_H 1-18 de línea germinal humana (SEC ID N°:101).

Figura 12 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 12A4 con la secuencia de aminoácidos V_H 1-69 de línea germinal humana (SEC ID N°:102).

Figura 13 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 10A5 con la secuencia de aminoácidos V_H 1-3 de línea germinal humana (SEC ID N°:103).

Figura 14 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 5F8 con la secuencia de aminoácidos V_H 1-69 de línea germinal humana (SEC ID N°:102).

Figura 15 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 10H10 con la secuencia de aminoácidos V_H 3-9 de línea germinal humana (SEC ID N°:104).

Figura 16 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 1B12 con la secuencia de aminoácidos V_H 1-69 de línea germinal humana (SEC ID N°:102).

Figura 17 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 7HI con la secuencia de aminoácidos V_H 1-69 de línea germinal humana (SEC ID N°:102).

Figura 18 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 11E6 con la secuencia de aminoácidos V_H 1-69 de línea germinal humana (SEC ID N°:102).

Figura 19 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 12B7 con la secuencia de aminoácidos V_H 1-69 de línea germinal humana (SEC ID N°:102).

Figura 20 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 13G4 con la secuencia de aminoácidos V_H 3-9 de línea germinal humana (SEC ID N°:104).

Figura 21 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 3G10 con la secuencia de aminoácidos V_k L6 de línea germinal humana (SEC ID N°:105).

Figura 22 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 12A4 con la secuencia de aminoácidos V_k L6 de línea germinal humana (SEC ID N°:105).

Figura 23 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 10A5 con la secuencia de aminoácidos V_k L15 de línea germinal humana (SEC ID N°:106).

Figura 24 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 5F8 con la secuencia de aminoácidos V_k A27 de línea germinal humana (SEC ID N°:107).

Figura 25 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 10H10 con la secuencia de aminoácidos V_k L15 de línea germinal humana (SEC ID N°:106).

Figura 26 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 1B12 con la secuencia de aminoácidos V_k L6 de línea germinal humana (SEC ID N°:105).

Figura 27 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 7HI con la secuencia de aminoácidos V_k L6 de línea germinal humana (SEC ID N°:105).

Figura 28 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 11E6 con secuencia de aminoácidos V_k A27 la de línea germinal humana (SEC ID N°:107).

Figura 29 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 11E6a (SEC ID N°:109) con la secuencia de aminoácidos V_k A27 de línea germinal humana (SEC ID N°:107).

Figura 30 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 12B7 con la secuencia de aminoácidos V_k L6 de línea germinal humana (SEC ID N°:105).

Figura 31 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 13G4 con la secuencia de aminoácidos V_k L18 de línea germinal humana (SEC ID N°:108).

Figuras 32A-C muestran los resultados de experimentos de citometría de flujo que demuestran que los anticuerpos monoclonales humanos 3G10, 10A5, y 12A4, dirigidos contra PD-L1 humano, enlazan la superficie celular de las células CHO transfectadas con PD-L1 humano de longitud completa. (A) Diagrama de citometría de flujo para 3G10 (B) Diagrama de citometría de flujo para 10A5 (C) Diagrama de citometría de flujo para 12A4.

Figura 33 muestra los resultados de experimentos de citometría de flujo que demuestran que los anticuerpos monoclonales humanos 3G10, 10A5, y 12A4, dirigidos contra PD-L1 humano, enlazan la superficie celular de las células CHO transfectadas con PD-L1 humano de longitud completa en una manera dependiente de la concentración.

Figura 34 muestra los resultados de experimentos ELISA que demuestran que los anticuerpos monoclonales humanos 3G10, 10A5, y 12A4, dirigidos contra PD-L1 humano, se enlazan a la proteína de fusión PD-L1-Fc.

Figura 35 muestra los resultados de experimentos que demuestran la concentración de HuMab en células T CD4+ humanas estimuladas.

Figura 36 muestra los resultados de experimentos que demuestran la concentración de HuMab en PBMC cinomolgo estimulado.

Figuras 37A-C muestran los resultados de experimentos de citometría de flujo que demuestran que los anticuerpos monoclonales humanos 3G10, 10A5, y 12A4, dirigidos contra PD-L1 humano, enlazan PD-L1 en la superficie celular de células T activadas. (A) Diagrama de citometría de flujo para 3G10 (B) Diagrama de citometría de flujo para 10A5 (C) Diagrama de citometría de flujo para 12A4.

5 Figura 38 demuestra el enlace de HuMabs a células ES-2.

Figuras 39A-D muestran los resultados de experimentos que demuestran que anticuerpos monoclonales humanos contra PD-L1 humano promueven la proliferación de células T, secreción de IFN- γ y secreción de IL-2 en un ensayo de reacción de linfocitos mezclada. Figura 39A es una gráfica de barras que muestra la proliferación de células T dependiente de concentración utilizando HuMab 10A5; Figura 39B es una gráfica de barras que muestra la secreción de IFN- γ dependiente de concentración utilizando HuMab 10A5; Figura 39C es una gráfica de barras que muestra la secreción de IFN- γ utilizando los HuMab 3G10 y 12A4; Figura 39D es una gráfica de barras que muestra la secreción de IL-2 dependiente de concentración utilizando HuMab 10A5. Figura 40 demuestra el efecto de anticuerpo anti-PD-L1 humano en la proliferación y la secreción de IFN- γ en MLR utilizando células dendríticas alogénicas y células T (células T efectoras CD4+) Células dendríticas.

10 Figuras 41A-B muestran los resultados de experimentos que demuestran que anticuerpos monoclonales humanos contra PD-L1 humano promueven la proliferación de células T y la secreción de IFN- γ en MLR que contiene células T reguladoras. Figura 41A es una gráfica de barras que muestra proliferación de células T dependiente de concentración utilizando HuMab 10A5; Figura 41B es una gráfica de barras que muestra la secreción de IFN- γ dependiente de concentración utilizando HuMab 10A5.

20 Figura 42 demuestra los resultados de anticuerpos anti-PD-L1 en proliferación celular en una Reacción de linfocitos Mezclada en la presencia de células T reguladoras.

Figura 43 demuestra los resultados de anticuerpos anti-PD-L1 en producción de citoquina en una Reacción de linfocitos Mezclada en la presencia de células T reguladoras.

25 Figura 44 demuestra los resultados de anticuerpos anti-PD-L1 en secreción de IFN- γ de PBMC humano estimulada por lisado CMV.

Figura 45 muestra los resultados de experimentos de citometría de flujo que demuestran que los anticuerpos monoclonales humanos contra PD-L1 humano bloquean el enlace de PD-L1 a células transfectadas CHO que expresan PD-1.

30 Figura 46 muestra que los anticuerpos anti-PD-L1 bloquean el enlace de PD-1 a células ES-2 tratadas con IFN γ .

Figura 47 muestra el efecto de anticuerpos anti-PD-L1 en crecimiento tumoral *vivo*.

Descripción detallada

35 En un aspecto, la presente descripción se refiere a anticuerpos monoclonales aislados, particularmente anticuerpos monoclonales humanos que se enlazan específicamente a PD-L1. En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención muestran una o más propiedades funcionales deseables, como enlace de alta afinidad a PD-L1, la capacidad para aumentar la proliferación de célula T, secreción de IFN- γ y/o IL-2 en reacciones de linfocito mezcladas, la capacidad para inhibir el enlace de PD-L1 al receptor PD-1, la capacidad para estimular las respuestas de anticuerpo y/o la capacidad para invertir la función de supresión de células reguladoras T. Adicional o

40 alternativamente, los anticuerpos de la invención se derivan de secuencias de línea germinal de cadena ligera y pesada particulares y/o comprenden características estructurales particulares como regiones CDR que comprenden secuencia de aminoácidos particulares.

45 La presente descripción proporciona, por ejemplo, anticuerpos aislados, métodos para hacer tales anticuerpos, inmunoconjugados y moléculas biespecíficas que comprenden tales anticuerpos y composición farmacéuticas que contienen los anticuerpos, inmunoconjugados o moléculas biespecíficas de la invención.

50 Los anticuerpos anti-PD-L1 pueden utilizarse para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto para modificar una respuesta inmune, así como también para tratar enfermedades como cáncer o enfermedad infecciosa, o para estimular una respuesta autoinmune protectora o para estimular respuestas inmunes específicas de antígeno (por ejemplo, por coadministración de anti-PD-L1 con un antígeno de interés).

55 Para que la presente descripción pueda entenderse fácilmente, se definen primero ciertos términos. Las definiciones adicionales se establecen por toda la descripción detallada. El término "respuesta inmune" se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células que presentan antígeno, células fagocíticas, granulocitos, y macromoléculas solubles por las células anteriores o el hígado (que incluyen anticuerpos, citoquinas, y complemento) que resulta en daño selectivo a, destrucción de, o eliminación del cuerpo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerígenas, o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, tejidos o células de humano normales.

60

Una "trayectoria de transducción de señal" se refiere a la relación bioquímica entre varias moléculas de transducción de señal que juegan un papel en la transmisión de una señal de una porción de una célula a otra porción de una célula. Como se utiliza en el presente documento, la frase "receptor de superficie celular" incluye, por ejemplo, moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y la transmisión de tal señal a través de la membrana de plasma de una célula. Un ejemplo de un "receptor de superficie celular" de la presente invención es el

65

Receptor PD-L1.

El término "anticuerpo" como se refiere en el presente documento incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de enlace a antígeno (*es decir*, "porción de enlace a antígeno") o cadenas únicas del mismo. Un "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) inter-conectadas por enlaces de disulfuro, o una porción de enlace a antígeno del mismo. Cada cadena pesada se comprende de una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada se comprende de tres dominios, C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Cada cadena ligera se comprende de una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera se comprende de un dominio, C_L. Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones que determinan la complemento (CDR), interpuestas con regiones que se conservan más, denominadas regiones de estructura (FR). Cada V_H y V_L se compone de tres CDR y cuatro FR, instaladas del extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FRI, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de enlace que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar el enlace de la inmunoglobulina a los factores o tejidos hospedadores, que incluyen varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema complemento clásico.

El término "porción de enlace a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), como se utiliza en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad para enlazarse específicamente a un antígeno (por ejemplo, PD-L1). Se ha demostrado que la función de enlace a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de enlace comprendidos dentro del término "porción de enlace a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios V_L, V_H, C_L y C_{H1}; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente de disulfuro en la región de articulación; (iii) un fragmento Fd que consiste de los dominios V_H y C_{H1}; (iv) un fragmento Fv que consiste de los dominios V_L y V_H de un brazo único de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.* (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste de un dominio V_H; y (vi) una región de determinación de complemento aislada (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, se codifican por los genes separados, pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que les permite hacerse como una cadena de proteína única en la cual el par de regiones V_L y V_H forman moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv); ver por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85:5879-5883). También se propone que los anticuerpos de cadena única se comprendan dentro del término "porción de enlace a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por aquellos expertos en la materia, y los fragmentos se seleccionan por utilidad en la misma manera como los anticuerpos intactos.

Un "anticuerpo aislado," como se utiliza en el presente documento, se propone referirse a un anticuerpo que está substancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que enlaza específicamente PD-L1 está substancialmente libre de anticuerpos que específicamente enlazan antígenos diferentes a PD-L1). Un anticuerpo aislado que enlaza específicamente PD-L1, sin embargo, puede tener reactividad cruzada a otros antígenos, como moléculas PD-L1 de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar substancialmente libre de otros químicos y/o material celular.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se utiliza en el presente documento se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal despliega una afinidad y especificidad de enlace única para un epítipo particular.

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

El término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que despliegan una especificidad de enlace única que tienen regiones variables en las cuales tanto la estructura como regiones CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humano y un transgén de cadena ligera fusionado a una célula inmortalizada.

El término “anticuerpo humano recombinante,” como se utiliza en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado del mismo (descrito más abajo), (b) anticuerpos aislados de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de humano de anticuerpo de combinación, recombinante, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que incluyen la división de secuencias de gen de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las cuales la estructura y regiones CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando un animal transgénico para secuencias de Ig humana se utiliza, en mutagénesis somática *vivo*) y de esta manera las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se derivan de y relacionan con secuencias V_H y V_L de línea germinal humana, pueden no existir de manera natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpo de humano *vivo*. Como se utiliza en el presente documento, “isotipo” se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que se codifica por los genes de región constante de cadena pesada genes.

Las frases “un anticuerpo que reconoce un antígeno” y “un anticuerpo específico para un antígeno” se utilizan de manera intercambiable en el presente documento con el término “un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno.”

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

El término “anticuerpo humanizado” se propone referirse a anticuerpos en los cuales las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamífero, como un ratón, se han injertado sobre secuencias de estructura humana. Las modificaciones de región de estructura adicionales pueden hacerse dentro de las secuencias de estructura humana.

El término “quimérico anticuerpo” se propone referirse a anticuerpos en los cuales las secuencias de región variable se derivan de una especie y las secuencias de región constante se derivan de otras especies, como un anticuerpo en el cual las secuencias de región variable se derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de región constante se derivan de un anticuerpo humano.

Como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo que “específicamente se enlaza a PD-L1 humano” se propone referirse a un anticuerpo que se enlaza a PD-L1 humano con un K_D de 1×10^{-7} M o menos, más preferentemente 5×10^{-8} M o menos, más preferentemente 1×10^{-8} M o menos, más preferentemente 5×10^{-9} M o menos, aún más preferentemente entre 1×10^{-8} M y 1×10^{-10} M o menos.

El término “ K_{asoc} ” o “ K_a ,” como se utiliza en el presente documento, se propone referirse a la velocidad de asociación de una interacción particular de anticuerpo-antígeno, mientras el término “ K_{dis} ” o “ K_d ,” como se utiliza en el presente documento, se propone referirse a la velocidad de disociación de una interacción particular de anticuerpo-antígeno. El término “ K_D ,” como se utiliza en el presente documento, se propone referirse a la velocidad de disociación, que se obtiene de la proporción de K_d a K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). Valores K_D para anticuerpos pueden determinarse utilizando métodos bien establecidos en la materia. Un método preferido para determinar K_D de un anticuerpo es al utilizar resonancia de plasmón en superficie, preferentemente utilizando un sistema biosensor tal como un sistema Biacore®.

Como se utiliza en el presente documento, el término “alta afinidad” para un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo que tiene K_D de 10^{-8} M o menos, más preferentemente 10^{-9} M o menos y aún más preferentemente 10^{-10} M o menos para un antígeno objetivo. Sin embargo, enlace de “alta afinidad” puede variar para otros isotipos de anticuerpo. Por ejemplo, enlace de “alta afinidad” para un isotipo IgM se refiere a un anticuerpo que tiene K_D de 10^{-7} M o menos, más preferentemente 10^{-8} M o menos, aún más preferentemente 10^{-9} M o menos.

Como se utiliza en el presente documento, el término “sujeto” incluye cualquier animal no humano o humano. El término “animal no humano” incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, como primates no humanos, oveja, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

Varios aspectos de la descripción se describen en más detalle en las siguientes subsecciones.

Anticuerpos anti-PD-L1

Los anticuerpos de la invención se caracterizan por propiedades o características funcionales particulares de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos se enlazan específicamente a PD-L1 humano. Preferentemente, un anticuerpo de la invención se enlaza a PD-L1 con alta afinidad, por ejemplo con un K_D de 1×10^{-7} M o menos. Los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención preferentemente muestran una o más de las siguientes características:

- (a) se enlaza a PD-L1 humano con un K_D de 1×10^{-7} M o menos;
- (b) incrementa la proliferación de células T en un ensayo de reacción de linfocitos mezclada (MLR);
- (c) incrementa la producción de interferón- γ en un ensayo MLR;
- 5 (d) incrementa la secreción de IL-2 en un ensayo MLR;
- (e) estimula las respuestas del anticuerpo; y/o
- (f) invierte el efecto de células reguladoras T sobre células efectoras de células T y/o células dendríticas.

10 Preferentemente, el anticuerpo se enlaza a PD-L1 humano con un K_D de 5×10^{-8} M o menos, se enlaza a PD-L1 humano con un K_D de 1×10^{-8} M o menos, se enlaza a PD-L1 humano con un K_D de 5×10^{-9} M o menos, se enlaza a PD-L1 humano con un K_D de 4×10^{-9} M o menos, se enlaza a PD-L1 humano con un K_D de 2×10^{-9} M o menos, o se enlaza a PD-L1 humano con un K_D de entre 1×10^{-9} M y 1×10^{-10} M o menos.

15 Los análisis estándar para evaluar la capacidad de enlace de los anticuerpos hacia PD-L1 se conocen en la materia, incluyendo por ejemplo, ELISA, transferencias Western y RIA. Los ensayos adecuados se describen en detalle en los Ejemplos. Las cinéticas de unión (por ejemplo, afinidad de unión) de los anticuerpos también pueden valorarse por ensayos estándar conocidos en la materia, como por análisis Biacore®.

20 Anticuerpos Monoclonales 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7HI, 11E6, 12B7, y 13G4.

25 Un anticuerpo preferido de la invención es el anticuerpo monoclonal humano 12A4. Dicho anticuerpo y los anticuerpos monoclonales humanos 3G10, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7HI, 11E6, 12B7, y 13G4, aislados y estructuralmente caracterizados como se describe en los Ejemplos 1 y 2. La secuencia de aminoácidos V_H de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7HI, 11E6, 12B7, y 13G4 se muestran en SEC ID N°s:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, y 10, respectivamente. Las secuencia de aminoácidos V_L de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7HI, 11E6, 12B7, y 13G4 se muestran en SEC ID N°s:11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, y 20, respectivamente. r.

30 Una combinación preferida de cadena ligera y pesada de la invención de un anticuerpo monoclonal, o porción de enlace a antígeno del mismo de la invención es a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:3; y b) una región variable de cadena ligera que comprende que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 12.

35 Por tanto, se describen anticuerpos que comprenden la cadena pesada y cadena ligera CDR1s, CDR2s y CDR3s de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7HI, 11E6, 12B7, y 13G4, o combinaciones de las mismas. La secuencia de aminoácidos de V_H CDR1s de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7HI, 11E6, 12B7, y 13G4 se muestran en SEC ID N°s:21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, y 30, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de V_H CDR2s de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7HI, 11E6, 12B7, y 13G4 se muestran en SEC ID N°s:31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, y 40, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de V_H CDR3s de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7HI, 11E6, 12B7, y 13G4 se muestran en SEC ID N°s:41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, y 50, respectivamente.

40 La secuencia de aminoácidos de V_k CDR1s de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7HI, 11E6, 12B7, y 13G4 se muestran en SEC ID N°s:51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, y 60, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de V_k CDR2s de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7HI, 11E6, 12B7, y 13G4 se muestran en SEC ID N°s:61, 62, 63, 64, 65, 66, 61, 68, 69, y 70, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de V_k CDR3s de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7HI, 11E6, 12B7, y 13G4 se muestran en SEC ID N°s:71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, y 80, respectivamente. CDR se delinear utilizando el sistema Kabat (Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publicación N° 91-3242).

Además de los anticuerpos de acuerdo con la invención, por tanto, se describen también anticuerpos que se unen específicamente a PD-L1, preferiblemente PD-L1 humano, y que comprenden:

- 50 (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende SEC ID N°:21;
- (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende SEC ID N°:31.;
- (c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende SEC ID N°:41;
- 55 (d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende SEC ID N°:51;
- (e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende SEC ID N°:61; y
- (f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende SEC ID N°:71;
- (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEC ID N°:23;
- 60 (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEC ID N°:33;
- (c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEC ID N°:43;
- (d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEC ID N°:53;
- (e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEC ID N°: 63; y
- 65 (f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEC ID N°:73.

- (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEC ID N°:24;
- (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEC ID N°:34;
- (c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEC ID N°:44;
- 5 (d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEC ID N°: 54;
- (e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEC ID N°:64; y
- (f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEC ID N°:74.
- (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEC ID N°:25;
- 10 (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEC ID N°:35;
- (c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEC ID N°:45;
- (d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEC ID N°:55;
- 15 (e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEC ID N°:65; y
- (f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEC ID N°:75.
- (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEC ID N°:26;
- (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEC ID N°:36;
- (c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEC ID N°:46;
- 20 (d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEC ID N°:56;
- (e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEC ID N°:66; y
- (f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEC ID N°:76.
- (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEC ID N°:27;
- 25 (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEC ID N°:37;
- (c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEC ID N°:47;
- (d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEC ID N°:57;
- 30 (e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEC ID N°:67; y
- (f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEC ID N°:77.
- (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEC ID N°:28;
- (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEC ID N°:38;
- (c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEC ID N°:48;
- 35 (d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEC ID N°:58;
- (e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEC ID N°:68; y
- (f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEC ID N°:78.
- (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEC ID N°:29;
- 40 (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEC ID N°:39;
- (c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEC ID N°:49;
- (d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEC ID N°:59;
- 45 (e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEC ID N°:69; y
- (f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEC ID N°:79.
- (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEC ID N°:30;
- 50 (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEC ID N°:40;
- (c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEC ID N°:50;
- (d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEC ID N°:60;
- (e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEC ID N°:70; y
- 55 (f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEC ID N°:80.

Anticuerpos que tienen secuencias de línea germinal particular

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención comprende una región variable de cadena pesada de un gen de inmunoglobulina de cadena pesada de línea germinal particular y/o una región variable de cadena ligera de un gen de inmunoglobulina de cadena ligera de línea germinal particular. Además, se describe en el presente documento un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de enlace a antígeno del mismo, que anticuerpo se enlaza específicamente a PD-L1 y que comprende una región variable de cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen V_H 1-18 humano; una región variable de cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen V_H 1-69 humano; una región variable de cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen V_H 1-3 humano; una región variable de cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen V_H 3-9 humano; una región variable de cadena ligera que es el producto o se deriva de un gen V_K L6 humano; una región variable de cadena ligera que

es el producto o se deriva de un gen V_K L15 humano; una región variable de cadena ligera que es el producto o se deriva de un gen V_K A27 humano, o una región variable de cadena ligera que es el producto o se deriva de un gen V_K L18 humano.

5 Se describe un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de enlace a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo:

(a) comprende una región variable de cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen V_H 1-18, 1-69, 1-3 o 3-9 humano (que codifica la secuencia de aminoácidos establecida en SEC ID N^{os}:101, 102, 103 y 104, respectivamente);

10 (b) comprende una región variable de cadena ligera que es el producto o se deriva de un gen V_K L6, L15, A27 o L18 humano (que codifica la secuencia de aminoácidos establecida en SEC ID N^{os}:105, 106, 107 y 108, respectivamente); y

(c) específicamente se enlaza a PD-L1, preferentemente PD-L1 humano.

15 Un ejemplo de un anticuerpo que tiene V_H y V_K de V_H 1 - 18 y V_K L6, respectivamente, es 3G10. Ejemplos de anticuerpos que tienen V_H y V_K de V_H 1-69 y V_K L6, respectivamente, 12A4, 1B12, 7H1, y 12B7. Un ejemplo de un anticuerpo que tiene V_H y V_K de V_H 1-3 y V_K L15, respectivamente, es 10A5. Ejemplos de anticuerpos que tienen V_H y V_K de V_H 1-69 y V_K A27, respectivamente, son 5F8, 11E6 y 11E6a. Un ejemplo de un anticuerpo que tiene V_H y V_K de V_H 3-9 y V_K L15, respectivamente, es 10H10. Un ejemplo de un anticuerpo que tiene V_H y V_K de V_H 1-3 y V_K L15, respectivamente, es 10A5. Un ejemplo de un anticuerpo que tiene V_H y V_K de V_H 3-9 y V_K L18, respectivamente, es 13G4.

25 Como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena pesada o ligera que es "el producto de o "deriva de" una secuencia de línea germinal particular si las regiones variables del anticuerpo se obtienen de un sistema que utiliza genes de inmunoglobulina de línea germinal humana. Tales sistemas incluyen inmunizar un ratón transgénico que lleva genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o seleccionar una biblioteca de gen de inmunoglobulina humana desplegada en fago con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de o "deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana puede identificarse como tal al comparar la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con la secuencia de aminoácidos de inmunoglobulinas de línea germinal humana y seleccionar la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana que está más cercana en secuencia (*es decir*, mayor % de identidad) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana particular puede contener diferencias de aminoácido en comparación con la secuencia de línea germinal, debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas que ocurren de manera natural o introducción de mutación dirigida en sitio. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado es generalmente al menos 90 % idéntico en secuencias de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal humana y contiene residuos de aminoácido que identifican el anticuerpo humano como siendo humano cuando se compara con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de línea germinal murino). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos 95 %, o aún al menos 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntico en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. En ciertas realizaciones, un anticuerpo humano derivado de una secuencia de línea germinal humana particular desplegará no más de 10 diferencias de aminoácido de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas otras realizaciones, el anticuerpo humano puede desplegar no más de 5, o aún no más de 4, 3, 2, o 1 diferencia de aminoácido de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal.

Anticuerpos homólogos

50 En todavía otra realización, un anticuerpo de la invención comprende regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden secuencia de aminoácidos que son homólogas a la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos preferidos descritos en el presente documento, y en donde los anticuerpos mantienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención.

55 Por ejemplo, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de enlace a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde:

(a) la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la SED ID N^o:2;

60 (b) la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % homóloga a la SED ID N^o:12;

(c) el anticuerpo se enlaza a PD-L1 humano con un K_D de 1×10^{-7} M o menos;

(d) el anticuerpo incrementa la proliferación de células T en un ensayo de reacción de linfocitos mezclada (MLR);

65 (e) el anticuerpo incrementa la producción de interferón- γ en un ensayo MLR;

(f) el anticuerpo incrementa la secreción de IL-2 en un ensayo MLR,

- (g) el anticuerpo estimula las respuestas del anticuerpo; y
 (h) invierte el efecto de células reguladoras T sobre células efectoras de células T y/o células dendríticas.

En otras realizaciones, la secuencia de aminoácidos V_H y/o V_L puede ser 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % homóloga a las secuencias establecidas arriba. Un anticuerpo que tiene regiones V_H y V_L que tienen alta (*es decir*, 80 % o más) homología a las regiones V_H y V_L de las secuencias establecidas arriba, puede obtenerse por mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis mediada por PCR o dirigida a sitio) de moléculas de ácido nucleico que codifican SEC ID N^{os}:25, 26, 27, 28, 29, y 30, seguido por la prueba del anticuerpo alterado codificado para función retenida (*es decir*, las funciones establecidas en (c) a (h) arriba) utilizando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

Como se utiliza en el presente documento, el porcentaje de homología entre dos secuencias de aminoácidos es equivalente al porcentaje de identidad entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (*es decir*, % homología = # de posiciones idénticas/total # de posiciones x 100), tomando en cuenta el número de espacios, y la longitud de cada espacio, que no necesita introducirse para alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede realizarse utilizando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes abajo.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuo de peso PAM120, una penalidad de longitud de espacio de 12 y una penalidad de espacio de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse utilizando el algoritmo Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com), utilizando ya sea una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

En ciertos casos, las secuencias de proteína de la invención pueden utilizarse además como una "secuencia de consulta" para realizar una consulta contra bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Tales búsquedas pueden realizarse utilizando el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Las búsquedas de proteína BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de anticuerpo de la invención. Para obtener alineaciones espaciadas para propósitos de comparación, Gapped BLAST espaciado puede utilizarse como se describe en Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, los parámetros de falla de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST) pueden utilizarse. Ver www.ncbi.nlm.nih.gov.

Anticuerpos Modificados y Formados

Un anticuerpo de la invención puede prepararse además utilizando un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias V_H y/o V_L descritas en el presente documento como material inicial para formar un anticuerpo modificado, tal anticuerpo modificado puede tener propiedades alteradas del anticuerpo inicial. Un anticuerpo puede formarse al modificar uno o más residuos dentro de una o ambas regiones variables (*es decir*, V_H y/o V_L), por ejemplo dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones de estructura. Adicional o alternativamente, un anticuerpo puede formarse al modificar residuos dentro de la(s) región(es) constante(s), por ejemplo para alterar la(s) función(es) efector(as) del anticuerpo.

Un tipo de formación de región variable que puede realizarse es injerto CDR. Los anticuerpos interactúan con antígenos objetivo predominantemente a través de residuos de aminoácido que se ubican en las seis regiones de determinación de complemento de cadena pesada y ligera (CDR). Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que secuencias fuera de CDR. Debido a que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las interacciones de anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos que ocurren de manera natural específicos al construir vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo que ocurre de manera natural específico injertado en secuencias de estructura de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades (ver, por ejemplo, Riechmann, L. *et al.* (1998) Nature 332:323-327; Jones, P. *et al.* (1986) Nature 321:522-525; Queen, C. *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Ver. U.S.A. 86:10029-10033; Patente de E.U. No. 5,225,539 para Winter, y Patentes de E.U. Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 para Queen *et al.*)

De acuerdo con lo anterior, otra realización de la invención pertenece a un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de enlace a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la SEC ID N^o 22 y la SEC ID N^o 32 y la SEC ID N^o 42 respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la SEC ID N^o 52, la SEC ID N^o 62, y la SEC ID N^o 72SEC, respectivamente. De esta manera, tales anticuerpos contienen las secuencias CDR V_H y V_L del anticuerpo monoclonal 12A4 pero que puede contener diferentes secuencias de estructura de estos anticuerpos.

Tales secuencias de estructura puede obtenerse de bases de datos de ADN públicas o referencias publicadas que incluyen secuencias de gen de anticuerpo de línea germinal. Por ejemplo, las secuencias de ADN de línea germinal para genes de región variable de cadena pesada y ligera humana pueden encontrarse en la base de datos de secuencia de línea germinal humana "VBase" (disponible en el Internet en www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), así como también en Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publicación N° 91-3242; Tomlinson, I. M., *et al.* (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hipervariable Loops" J. Mol. Biol. 227:776-798; y Cox, J. P. L. *et al.* (1994) "A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24:827-836.

Secuencias de proteína de anticuerpo se comparan contra una base de datos de secuencia de proteína compilada utilizando uno de los métodos de búsqueda de similitud de secuencia llamado Gapped BLAST (Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Research 25:3389-3402), que se conocen bien por aquellos expertos en la material. BLAST es un algoritmo heurístico en que una alineación estadísticamente significativa entre la secuencia de anticuerpos y la secuencia de bases de datos probablemente contiene pares de segmento de alta puntuación (HSP) de palabras alineadas. Los pares de segmento cuyas puntuaciones no pueden mejorarse por extensión o recorte se llaman un hit. Brevemente, las secuencias de nucleótidos de origen VBASE (vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase/list2.php) se traducen y la región entre y que incluye la región de trabajo FRI a FR3 se mantiene. Las secuencias de bases de datos tienen una longitud promedio de 98 residuos. Las secuencias duplicadas que son acoplamiento exactos sobre la longitud completa de la proteína se remueven. Una búsqueda BLAST para proteínas utilizando el programa blastp con falla, parámetros estándar excepto el filtro de baja complejidad que se apaga y la matriz de sustitución de BLOSUM62, filtros para 5 hits produciendo acoplamiento de secuencia. Las secuencias de nucleótidos se traducen en todas las seis estructuras y la estructura sin codón de detención en el segmento de acoplamiento de la secuencia de bases de datos se considera el hit potencial. Esto a su vez confirma el uso del programa BLAST tblastx. Esto traduce la secuencia de anticuerpo en todos los seis cuadros y compara aquellas traducciones con las secuencias de nucleótido VBASE traducidas dinámicamente en todos los seis cuadros.

Las identidades son acoplamiento de aminoácido exactos entre la secuencia de anticuerpos y la base de datos de proteína sobre la longitud completa de la secuencia. Los positivos (identidades+acoplamiento de sustitución) no son idénticos pero las sustituciones de aminoácido se guían por la matriz de sustitución BLOSUM62. Si la secuencia de anticuerpos acopla dos de las secuencias de base de datos con la misma identidad, el hit con más positivos decidiría ser el hit de secuencia de acoplamiento.

Las secuencias de estructura preferidas para utilizarse en los anticuerpos de la invención son aquellas que son estructuralmente similares a las secuencias de estructura utilizadas por los anticuerpos seleccionados de la invención, por ejemplo, similares a las secuencias de estructura V_H 1-18 (SEC ID N°:101) y/o las secuencias de estructura V_H 1-69 (SEC ID N°:102) y/o las secuencias de estructura V_H 1-3 (SEC ID N°:103) y/o las secuencias de estructura V_H 3-9 (SEC ID N°:104) y/o las secuencias de estructura V_K L6 (SEC ID N°:105) y/o las secuencias de estructura V_K L15 (SEC ID N°:106) y/o las secuencias de estructura V_K A27 (SEC ID N°:107) y/o las secuencias de estructura V_K L18 (SEC ID N°:107). Las secuencias V_H CDR1, CDR2, y CDR3, y las secuencias V_K CDR1, CDR2, y CDR3, pueden injertarse en regiones de estructura que tienen la secuencia idéntica que aquella encontrada en el gen de inmunoglobulina de línea germinal del cual se deriva la secuencia de estructura, o las secuencias CDR pueden injertarse en regiones de estructura que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de línea germinal. Por ejemplo, se ha encontrado que en ciertos casos es benéfico mutar residuos dentro de las regiones de estructura para mantener o mejorar la capacidad de enlace a antígeno del anticuerpo (ver por ejemplo, Patentes de E.U. Nos. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 para Queen *et al.*).

Los anticuerpos formados de la invención incluyen aquellos en los cuales se han hecho las modificaciones a los residuos de estructura dentro de V_H y/o V_K, por ejemplo para mejorar las propiedades del anticuerpo. Normalmente, tales modificaciones de estructura se hacen para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un planteamiento es "mutar de nuevo" uno o más residuos de estructura con la secuencia de línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha experimentado mutación somática puede contener residuos de estructura que difieren de la secuencia de línea germinal de la cual se deriva el anticuerpo. Tales residuos pueden identificarse al comparar las secuencias de estructura de anticuerpo con las secuencias de línea germinal de la cual se deriva el anticuerpo. Por ejemplo, como se describe abajo, un número de cambios de aminoácido en las regiones de estructura de los anticuerpos anti-PD-L1 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 y 13G4 que difieren de la secuencia de línea germinal de origen. Para regresar las secuencias de región de estructura a su configuración de línea germinal, las mutaciones somáticas pueden "mutarse de nuevo" a la secuencia de línea germinal mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis mediada por PCR. La alineación de la región V_H para 3G10 contra la secuencia V_H 1-18 de línea germinal de origen se muestra en la Figura 11. La alineación de la región V_H para 12A4 contra la secuencia V_H 1-69 de línea germinal de origen se muestra en la Figura 12. La alineación de la región V_H para 10A5 contra la secuencia V_H 1-3 de línea germinal de origen se muestra en la Figura 13. La alineación de la región V_H para 5F8 contra la secuencia V_H 1-69 de línea germinal de origen se muestra en la Figura 14. La alineación de la región V_H para 10H10 contra la secuencia V_H 3-9 de línea germinal de origen se muestra en la Figura 15. La alineación de la región V_H para 1B12 contra la secuencia

V_H 1-69 de línea germinal de origen se muestra en la Figura 16. La alineación de la región V_H para 7H1 contra la secuencia V_H 1-69 de línea germinal de origen se muestra en la Figura 17. La alineación de la región V_H para 11E6 contra la secuencia V_H 1-69 de línea germinal de origen se muestra en la Figura 18. La alineación de la región V_H para 12B7 contra la secuencia V_H 1-69 de línea germinal de origen se muestra en la Figura 19. La alineación de la región V_H para 13G4 contra la secuencia V_H 3-9 de línea germinal de origen se muestra en la Figura 20.

Por ejemplo, para 12A4, el residuo de aminoácido #24 (dentro de FRI) de V_H es una treonina mientras este residuo en la secuencia de línea germinal V_H 1-69 correspondiente es una alanina..

Para devolver las secuencias de región de estructura a su configuración de línea germinal, por ejemplo, el resto n°24 de V_H de 12A4 puede ser "mutado de nuevo" de treonina a alanina. También está previsto que estos anticuerpos "mutados de nuevo" están comprendidos en la invención.

Como otro ejemplo, para 12A4, el resto de aminoácido n°27 (dentro de FRI) de V_H es un ácido aspártico mientras este resto en la secuencia de línea germinal V_H 1-69 correspondiente es una glicina alanina. Para regresar las secuencias de región de estructura a su configuración de línea germinal, por ejemplo, el resto n° 27 de V_H de 12A4 puede ser "mutado de nuevo" de ácido aspártico a glicina. También está previsto que estos anticuerpos "mutados de nuevo" están comprendidos en la invención.

Otro tipo de modificación de estructura incluye mutar uno o más restos dentro de la región de estructura, para remover los epítomos de células T para reducir así la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Este planteamiento también se refiere a como "de inmunización" y se describe en más detalle en la Publicación de Patente de E.U. No. 20030153043 por Carr *et al.*

Además o alternativo a las modificaciones hechas dentro de la estructura o región CDR, anticuerpos de la invención pueden formarse para incluir modificaciones dentro de la región Fc, normalmente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, como vida media en suero, fijación complemento), enlace a receptor Fc, y/o citotoxicidad celular dependiente a antígeno. Además, un anticuerpo de la invención puede modificarse químicamente (por ejemplo, uno o más restos químicos pueden unirse al anticuerpo) o modificarse para alterar su glicosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe en más detalle abajo. La numeración de los restos en la región Fc es aquella del índice EU de Kabat.

En una realización, la región de articulación de CHI se modifica de manera que el número de restos de cisteína en la región de articulación se altera, por ejemplo, aumenta o disminuye. Este planteamiento se describe además en la Patente de Estados Unidos N° 5.677.425 por Bodmer *et al.* El número de restos de cisteína en la región de articulación de CHI se altera, por ejemplo, para facilitar el ensamble de las cadenas pesadas y ligeras o para incrementar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otra realización, la región de articulación Fc de un anticuerpo se muta para disminuir la vida media biológica del anticuerpo. Más específicamente, una o más mutaciones de aminoácido se introducen en la región de interfase de dominio CH2-CH3 del fragmento de articulación Fc de manera que el anticuerpo tiene enlace de proteína A estafilocócica (SpA) deteriorado relativo a dominio de articulación Fc nativo de enlace de SpA. Este planteamiento se describe en más detalle en la Patente de Estados Unidos N° 6.165.745 por Ward *et al.*

En otra realización, el anticuerpo se modifica para incrementar su vida media biológica. Varios planteamientos son posibles. Por ejemplo, una o más de las siguientes mutaciones pueden introducirse: T252L, T254S, T256F, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.277.375 para Ward. Alternativamente, para incrementar la vida media biológica, el anticuerpo puede alterarse dentro de la región CHI o CL para contener un epítomo de enlace al receptor silvestre tomado de dos ciclos de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las Patentes de Estados Unidos números 5.869.046 y 6.121.022 por Presta *et al.*

En todavía otras realizaciones, la región Fc se altera al reemplazar al menos un resto de aminoácido con un resto de aminoácido diferente para alterar la(s) función(es) efector(as) del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de restos de aminoácido 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 pueden reemplazarse con un resto de aminoácido diferente de manera que el anticuerpo tiene afinidad alterada para un ligando efector pero mantiene la capacidad de enlace a antígeno del anticuerpo de origen. El ligando efector al cual se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Este planteamiento se describe en más detalle en las Patentes de Estados Unidos números . 5.624.821 y 5.648.260, ambas para Winter *et al.*

En otro ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de restos de aminoácido 329, 331 y 322 pueden reemplazarse con un resto de aminoácido diferente de manera que el anticuerpo tiene enlace C1q alterado y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) eliminada o reducida. Este planteamiento se describe en más detalle en las Patentes de Estados Unidos números 6.194.551 de Idusogie *et al.*

En otro ejemplo, uno o más restos de aminoácido dentro de las posiciones de aminoácido 231 y 239 se alteran para alterar así la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este planteamiento se describe además en

Publicación PCT WO 94/29351 por Bodmer *et al.*

En todavía otro ejemplo, la región Fc se modifica para incrementar la capacidad del anticuerpo para mediar citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) y/o para incrementar la afinidad del anticuerpo para un receptor Fc γ al modificar uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Este planteamiento se describe además en Publicación PCT WO 00/42072 por Presta. Además, los sitios de enlace en IgG1 humana para Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII y FcRn se han trazado y se han descrito las variantes con enlace mejorado (ver Shields, R.L. *et al.* (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604). Se muestra que las mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 mejoran el enlace a Fc γ RIII. Adicionalmente, los siguientes mutantes de combinación se muestran para mejorar el enlace Fc γ RIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A.

En todavía otra realización, la glicosilación de un anticuerpo se modifica. Por ejemplo, puede hacerse un anticuerpo aglicosilado {es decir, el anticuerpo carece de glicosilación}. La glicosilación puede alterarse, por ejemplo, para incrementar la afinidad del anticuerpo para antígeno. Tales modificaciones de carbohidrato pueden realizarse, por ejemplo, al alterar uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia de anticuerpos. Por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácido pueden hacerse, lo que resulta en eliminación de uno o más sitios de glicosilación de estructura de región variable para eliminar así la glicosilación en ese sitio. Tal aglicosilación puede incrementar la afinidad del anticuerpo para antígeno. Tal planteamiento se describe en detalle adicional en las Patentes de Estados Unidos números 5.714.350 y 6.350.861 por Co *et al.*

En ciertas otras realizaciones, puede hacerse un anticuerpo que tiene un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de restos de fucosilo o un anticuerpo que tiene estructuras de GlcNac de bisección incrementada. Se ha demostrado que tales patrones de glicosilación alterados incrementan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de carbohidrato pueden realizarse, por ejemplo, al expresar el anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria de glicosilación alterada. Las células con maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la materia y pueden utilizarse como células hospedadoras en las cuales se expresan anticuerpos recombinantes de la invención para producir así un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, las líneas celulares Ms704, Ms705, y Ms709 carecen de gel de fucosiltransferasa, FUT8 (alfa (1,6) fucosiltransferasa), de manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares Ms704, Ms705, y Ms709 carecen de fucosa en sus carbohidratos. Las líneas celulares Ms704, Ms705, y Ms709 FUT8^{-/-} se crean por la interrupción objetivo del gen FUT8 en células CHO/DG44 utilizando dos vectores de reemplazamiento (ver Publicación de Patente de E.U. No.20040110704 por Yamane *et al.* y Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) Biotechnol Bioeng 87:614-22). Como otro ejemplo, el documento EP 1.176.195 por Hanai *et al.* describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente interrumpido, que codifica una transferasa de fucosilo, de manera que los anticuerpos expresados en tal línea celular muestran hipofucosilación al reducir o eliminar la enzima relacionada con alfa 1,6 enlace. Hanai *et al.* también describe líneas celulares las cuales tienen una baja actividad de enzima para agregar mucosa a la N-acetilglucosamina que se enlaza a la región Fc del anticuerpo y no tiene la actividad de enzima, por ejemplo la línea celular de mieloma de rata YB2/0 (ATCC CRL 1662). Publicación PCT WO 03/035835 por Presta describe una línea celular CHO variante, células Lec13, con capacidad reducida para unir mucosa a carbohidratos enlazados a Asn(297), lo que resulta también en hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (ver también Shields, R.L. *et al.* (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740). Publicación PCT WO 99/54342 por Umana *et al.* describe líneas celulares formadas para expresar transferasas de glicosilo que modifican la glicoproteína {por ejemplo, beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)} de manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares formadas muestran estructuras GlcNac de bisección incrementada lo que resulta en actividad ADCC incrementada de los anticuerpos (ver también Umana *et al.* (1999) Nat. Biotech. 17:176-180). Alternativamente, los restos de fucosa del anticuerpo puede separarse utilizando una enzima de fucosidasa. Por ejemplo, alfa-L-fucosidasa de fucosidasa remueve los restos de fucosilo de anticuerpos (Tarentino, A.L. *et al.* (1975) Biochem. 14:5516-23).

Otra modificación de los anticuerpos en el presente documento que se contempla por la invención es pegilación. Un anticuerpo puede pegilarse, por ejemplo, para incrementar la vida media biológica (por ejemplo, suero) del anticuerpo. Para pegilar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento del mismo, normalmente se reacciona con glicol de polietileno (PEG), tal como un éster reactivo o derivado de aldehído de PEG, bajo condiciones en las cuales uno o más grupos PEG se unen al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Preferentemente, la pegilación se lleva a cabo a través de una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Como se utiliza en el presente documento, el término "glicol de polietileno" se propone comprender cualquiera de las formas de PEG que se han utilizado para derivar otras proteínas, como glicol de polietileno de ariloxi o mono alcoxi (C1-C10) o glicol de polietileno-maleimida. En ciertas realizaciones, el anticuerpo a pegilarse es un anticuerpo aglicosilado. Los métodos para proteínas de pegilación se conocen en la materia y pueden aplicarse a los anticuerpos de la invención. Ver por ejemplo, EP 0 154 316 por Nishimura *et al.* y documento EP 0 401 384 por Ishikawa *et al.*

Métodos para Formar Anticuerpos

Como se trata arriba, los anticuerpos anti-PD-L1 que tienen secuencias V_H y V_K descritas en el presente documento pueden utilizarse para crear nuevos anticuerpos anti-PD-L1 al modificar las secuencias V_H y/o V_K , o la(s) región(es) constante(s) unida(s) a la misma. De esta manera, en otro aspecto de la invención, las características estructurales de un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención, por ejemplo 12A4, se utilizan para crear anticuerpos anti-PD-L1 estructuralmente relacionados que mantienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, como enlace a PD-L1 humano. Por ejemplo, una o más regiones CDR de, 12A4, pueden combinarse de manera recombinante con regiones de estructura conocidas y/u otras CDR para crear anticuerpos anti-PD-L1, recombinantemente formados, adicionales de la invención, como se trata arriba. Otros tipos de modificaciones incluyen aquellos descritos en la sección previa. El material inicial para el método de formación es una o más de las secuencias V_H y/o V_K proporcionadas en el presente documento, o una o más regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo formado, no es necesario preparar en realidad {es decir, expresar como una proteína} un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias V_H y/o V_K proporcionadas en el presente documento, o una o más regiones CDR de las mismas. Preferentemente, la información contenida en la(s) secuencia(s) se utiliza como el material inicial para crear una secuencia(s) de "segunda generación" derivada(s) de la(s) secuencia(s) original(es) y después la(s) secuencia(s) de "segunda generación" se prepara y expresa como una proteína.

Las técnicas de biología molecular estándar pueden utilizarse para preparar y expresar la secuencia de anticuerpos alterada.

Preferentemente, el anticuerpo codificado por la(s) secuencia(s) de anticuerpos alterada(s) es uno que mantiene una, algunas o todas de las propiedades funcionales de los anticuerpos anti-PD-L1 descritos en el presente documento, tales propiedades funcionales incluyen, pero no se limitan a:

- (i) se enlaza a PD-L1 humano con un K_D de 1×10^{-7} M o menos;
- (ii) incrementa la proliferación de células T en un ensayo de reacción de linfocitos mezclada (MLR);
- (iii) incrementa la producción de interferón- γ en un ensayo MLR;
- (iv) incrementa la secreción de IL-2 en un ensayo MLR;
- (v) estimula las respuestas del anticuerpo; y/o
- (vi) invierte el efecto de células reguladoras T sobre células efectoras de células T y/o células dendríticas.

Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados pueden valorarse utilizando ensayos estándar en la materia y/o descritos en el presente documento, tales como aquellos establecidos en los Ejemplos (por ejemplo, citometría de flujo, ensayos de enlace).

En ciertas realizaciones de los métodos para formar anticuerpos de la invención, las mutaciones pueden introducirse aleatoria o selectivamente a lo largo de toda o parte de una secuencia de codificación de anticuerpo anti-PD-L1 y los anticuerpos anti-PD-L1 modificados resultantes pueden seleccionarse para actividad de unión y/u otras propiedades funcionales como se describe en el presente documento. Los métodos de mutación se han descrito en la materia. Por ejemplo, la Publicación PCT WO 02/092780 por Short describe métodos para crear y seleccionar mutaciones de anticuerpo utilizando mutagénesis de saturación, ensamble de ligación sintética, o una combinación de los mismos. Alternativamente, Publicación PCT WO 03/074679 por Lazar *et al.* describe métodos para utilizar métodos de selección computacional para optimizar propiedades fisicoquímicas de anticuerpos.

Moléculas de Ácido Nucleico que Codifican Anticuerpos de la Descripción

Las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención pueden presentarse en células completas, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o substancialmente pura. Un ácido nucleico se "aisla" o "vuelve substancialmente puro" cuando se purifica lejos de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otras proteínas o ácidos nucleicos celulares, por técnicas estándar, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, banda CsCl, cromatografía de columna, electroforesis de gel de azarosa y otros bien conocidos en la materia. Ver, F. Ausubel, *et al.*, ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, AND o ARN y puede contener o no secuencias intrónicas. En una realización preferida, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden obtenerse utilizando técnicas de biología molecular estándar. Para anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparadas de ratones transgénicos que llevan genes de inmunoglobulina humana como se describe más abajo), los ADNc que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo hechas por el hibridoma pueden obtenerse por amplificación PCR estándar o técnicas de clonación de ADNc. Para anticuerpos obtenidos de una biblioteca de gen de inmunoglobulina (por ejemplo, utilizando técnicas de despliegue de fago), ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede recuperarse de la biblioteca.

Las moléculas de ácidos nucleicos preferidas de la invención son aquellas que codifican las secuencias V_H y V_L de 12A4. La secuencia de ADN que codifica la secuencia V_H de 12A4 se muestra en SEC ID N°: 82. La secuencia de ADN que codifica la secuencia V_L de 12A4 se muestra en SEC ID N°: 92.

- Una vez que los fragmentos de ADN que codifican los segmentos VH y VL se obtienen, estos fragmentos de ADN pueden manipularse por técnicas de ADN recombinante estándar, por ejemplo para convertir los genes de región variable en genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, para genes de fragmento Fab o un gen scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica VL o VH se enlaza operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. El término "operativamente enlazado" como se utiliza en este contexto, se propone significar que los dos fragmentos de ADN se unen de manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en estructura.
- El ADN aislado que codifica la región VH puede convertirse en un gen de cadena pesada de longitud completa al enlazar operativamente el ADN que codifica VH a otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de genes de región constante de cadena pesada humanos se conocen en la materia (ver por ejemplo, Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publicación N° 91-3242) y fragmentos de ADN que comprenden estas regiones pueden obtenerse por amplificación PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero más preferentemente es una región constante IgG1 o IgG4. Para un gen de cadena pesada de fragmento Fab, el ADN que codifica VH puede enlazarse operativamente a otra molécula de ADN que codifica solamente la región constante CH1 de cadena pesada.
- El ADN aislado que codifica la región VL puede convertirse en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como también un gen de cadena ligera Fab) al enlazar operativamente el ADN que codifica VL a otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de genes de región constante de cadena ligera humanos se conocen en la materia (ver por ejemplo, Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publicación N° 91-3242) y fragmentos de ADN que comprenden estas regiones pueden obtenerse por amplificación PCR estándar. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, pero más preferentemente es una región constante kappa.
- Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican VH y VL se enlazan operativamente a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃, de manera que las secuencias VH y VL pueden expresarse como una proteína de cadena única contigua, con las regiones VL y VH unidas por el enlazador flexible (ver por ejemplo, Bird *et al.* (1988) Science 242:423-426; Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty *et al.* (1990) Nature 348:552-5541).

Producción de Anticuerpos Monoclonales de la Invención

- Los anticuerpos monoclonales (mAb) de la presente invención pueden producirse por varias técnicas, incluyendo metodología de anticuerpo monoclonal convencional, por ejemplo, la técnica de hibridación de célula somática estándar de Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495. Aunque se prefieren los procedimientos de hibridación de célula somática, en principio, otras técnicas para producir anticuerpo monoclonal pueden emplearse, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B.
- El sistema de animal preferido para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridoma en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Los procedimientos de inmunización y técnicas para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión se conocen en la materia. Los socios de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y procedimientos de fusión también se conocen.
- Los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente invención pueden prepararse basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado como se describe arriba. ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera pueden obtenerse del hibridoma murino de interés y formarse para contener secuencias de inmunoglobulina no murina (por ejemplo, humana) utilizando técnicas de biología molecular estándar. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables de murino pueden enlazarse a regiones constantes de humano utilizando métodos conocidos en la materia (ver por ejemplo, Patente de Estados Unidos n° 4.816.567 para Cabilly *et al.*). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR de murino pueden insertarse en una estructura humana utilizando métodos conocidos en la materia (ver por ejemplo, Patente de Estados Unidos n° 5.225.539 para Winter, y Patentes de Estados Unidos números 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 para Queen *et al.*).
- En una realización preferida, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Tales anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra PD-L1 pueden generarse utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que llevan partes del sistema inmune humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos o transcromosómicos incluyen ratones referidos en el presente documento como ratones HuMAB y KM miceTM, respectivamente, y se refieren colectivamente en el presente documento como "ratones con Ig humana).
- El ratón HuMAB® (Medarex, Inc.) contiene minilugares de gel de inmunoglobulina humana que codifican las secuencias de inmunoglobulina de cadena ligera κ y pesada (μ y γ) humana, junto con mutaciones objetivo que

inactivan los lugares de cadena μ y κ (ver por ejemplo, Lonberg, *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856- 859). De acuerdo con lo anterior, los ratones muestran expresión reducida de IgM de ratón o κ , y en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera de humano introducidos experimentan cambio de clase y mutación somática para generar IgGk humana de alta afinidad monoclonal (Lonberg, N. *et al.* (1994), *supra*; revisado en Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93, y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) *Ann. NY. Acad. Sci.* 764:536-546). La preparación y uso de ratones HuMab, y las modificaciones genómicas llevadas por tales ratones, se describe además en Taylor, L. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. *et al.* (1993) *International Immunology* 5:647-656; Tuailon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. *et al.* (1993) *EMBO J. U:* 821-830; Tuailon *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. *et al.* (1994) *International Immunology* 6: 579-591; y Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851, los contenidos de todas de las cuales se incorporan específicamente aquí para referencia en su totalidad. Ver además, Patentes de E.U. Nos. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; y 5,770,429; todas para Lonberg y Kay; Patente de E.U. No. 5,545,807 para Surani *et al.*; Publicaciones PCT Nos. WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas para Lonberg y Kay; y Publicación PCT No. WO 01/14424 para Korman *et al.*

En otra realización, anticuerpo humanos de la invención pueden originarse utilizando un ratón que lleva secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, como un ratón que lleva un transgén de cadena pesada humano y un transcromosoma de cadena ligera humana. Tales ratones, referidos en el presente documento como "KM miceTM" se describen en detalle en la Publicación PCT WO 02/43478 para Ishida *et al.*

Además, los sistemas de animal transgénico alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la materia y pueden utilizarse para obtener anticuerpos anti-PD-L1 de la invención. Por ejemplo, un sistema transgénico alternativo referido como el Xenomouse (Abgenix, Inc.) puede utilizarse; tales ratones se describen en, por ejemplo, Patentes de E.U. Nos. 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6, 150,584 y 6,162,963 para Kucherlapati *et al.*

Además, los sistemas de animal transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la materia y pueden utilizarse para obtener anticuerpos anti-PD-L1 de la invención. Por ejemplo, los ratones que llevan tanto un transcromosoma de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana, referidos como "ratones TC" pueden utilizarse; tales ratones se describen en Tomizuka *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Además, las vacas que lleva transcromosomas de cadena pesada y ligera humana se han descrito en la materia (Kuroiwa *et al.* (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894) y pueden utilizarse para obtener anticuerpos anti-PD-L1 de la invención.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también pueden prepararse utilizando métodos de despliegue de fago para seleccionar bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana. Tales métodos de despliegue de fago para aislar anticuerpos humanos se establecen en la materia. Ver por ejemplo: Patentes de E.U. Nos. 5,223,409; 5,403,484; y 5,571,698 para Ladner *et al.*; Patentes de E.U. Nos. 5,427,908 y 5,580,717 para Dower *et al.*; Patentes de E.U. Nos. 5,969,108 y 6,172,197 para McCafferty *et al.*; y Patentes de E.U. Nos. 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 y 6,593,081 para Griffiths *et al.*

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también pueden prepararse utilizando ratones SCID en los cuales las células inmunes humanas se han reconstituido de manera que una respuesta de anticuerpo humano puede generarse en la inmunización. Tales ratones se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 5,476,996 y 5,698,767 para Wilson *et al.*

Inmunización de ratones con Ig humana

Cuando los ratones con Ig humana se utilizan para obtener anticuerpos humanos de la invención, tales ratones pueden inmunizarse con una preparación enriquecida o purificada de PD-L1 y/o PD-L1 recombinante, o una proteína de fusión PD-L1, como se describe por Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851; y Publicación PCT WO 98/24884 y WO 01/14424. Preferentemente, los ratones serán de 6-16 semanas de edad en la primera infusión. Por ejemplo, una preparación recombinante o purificada (5-50 μ g) de antígeno PD-L1 puede utilizarse para inmunizar los ratones con Ig humana de manera intraperitoneal.

Los procedimientos detallados para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos para PD-L1 se describen en el Ejemplo 1 abajo. La experiencia acumulativa con varios antígenos han mostrado que los ratones transgénicos responden cuando se inmunizan inicialmente de manera intraperitoneal (IP) con antígeno en adyuvante de Freund completo, seguido por cada otra inmunización IP semanal (hasta un total de 6) con antígeno en adyuvante de Freund incompleto. Sin embargo, también se encuentra que los adyuvantes diferentes a Freund son efectivos. Además, se encuentra que las células completas en la ausencia de adyuvante son altamente inmunogénicas. La respuesta inmune puede monitorearse sobre el curso del procedimiento de inmunización con muestras de plasma obteniéndose por sangrados retroorbitales. El plasma puede seleccionarse por ELISA (como se

describe abajo), y los ratones con suficientes concentraciones de inmunoglobulina humana anti-PD-L1 pueden utilizarse para fusiones. Los ratones pueden inyectarse con refuerzo de manera intravenosa con antígeno 3 días antes del sacrificio y el retiro del bazo. Se espera que pueda necesitarse que 2-3 fusiones para cada inmunización se realicen. Entre 6 y 24 ratones se inmunizan normalmente para cada antígeno. Usualmente se utilizan ambas cepas, HCo7 y HCo2. Además, tanto el transgén de HCo7 como HCo2 pueden dársele juntos al ratón único que tiene dos transgenes de cadena pesada humana diferentes (HCo7/HCo2). Alternativa o adicionalmente, la cepa KM mouse™ puede utilizarse, como se describe en el Ejemplo 1.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la descripción

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la invención, los esplenocitos y/o células de ganglio linfático de ratones inmunizados pueden aislarse y fusionarse a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden seleccionarse para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, las suspensiones celulares únicas de linfocitos de bazo de ratones inmunizados pueden fusionarse a un sexto el número de P3X63-Ag8.653 no secretando células de mieloma de ratón (ATCC, CRL1580) con 50 % PEG. Las células se colocan en aproximadamente 2×10^5 en placa de microconcentración de fondo plano, seguido por una incubación de dos semanas en medio selectivo conteniendo 20 % suero de Clon fetal, 18 % medio acondicionado "653", 5 % origen (IGEN), 4 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sodio, 5mM HEPES, 0.055 mM 2-mercaptoethanol, 50 unidades/ml penicilina, 50 mg/ml estreptomina, 50 mg/ml gentamicina y IX HAT (Sigma; HAT se agrega 24 horas después de la fusión). Después de aproximadamente dos semanas, las células pueden cultivarse en medio en el cual HAT se reemplaza con HT. Las cavidades individuales pueden seleccionarse por ELISA para anticuerpos IgG e IgM monoclonales humanos. Una vez que ocurre el crecimiento de hibridoma extensivo, el medio puede observarse usualmente después de 10-14 días. El anticuerpo que secreta hibridomas puede volverse a colocar en placas, seleccionar de nuevo, y si aún es positivo para IgG de humano, los anticuerpos monoclonales pueden subclonarse al menos dos veces al limitar la dilución. Los subclones estables pueden entonces cultivarse *in vitro* para generar cantidades pequeñas de anticuerpo en medio de cultivo de tejido para caracterización.

Para purificar los anticuerpos monoclonales humanos, los hibridomas seleccionados pueden desarrollarse en frascos giratorios de dos litros para purificación de anticuerpo monoclonal. Los sobrenadantes pueden filtrarse y concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con sefarsa A de proteína (Pharmacia, Piscataway, NJ.). IgG eluido puede verificarse por electroforesis de gel y cromatografía líquida de alto desempeño para asegurar la pureza. La solución reguladora puede intercambiarse en PBS, y la concentración puede determinarse por OD280 utilizando coeficiente de extinción 1.43. Los anticuerpos monoclonales pueden alicuotarse y almacenarse a -80 °C.

Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales de la descripción

Los anticuerpos de la invención también pueden producirse en un transfectoma de célula hospedadora utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección de gen como se sabe bien en la materia (por ejemplo, Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de los mismos, los ADN que codifican cadenas ligeras y pesadas de longitud completa o parcial, pueden obtenerse por técnicas de biología molecular estándar (por ejemplo, amplificación PCR o clonación de ADNc utilizando un hibridoma que expresa el anticuerpo de interés) y los ADN pueden insertarse en vectores de expresión de manera que los genes se enlazan de manera operativa a secuencias de control de traducción y transcripción. En este contexto, el término "operativamente enlazado" se propone significar que un gen de anticuerpo se liga en un vector de manera que las secuencias de control de traducción y transcripción dentro del vector sirven a su función propuesta de regular la transcripción y traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y secuencias de control de expresión se eligen para ser compatibles con la célula hospedadora de expresión utilizada. El gen de cadena ligera de anticuerpo y el gen de cadena pesada de anticuerpo pueden insertarse en vector separado o, más normalmente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpo se insertan en el vector de expresión por métodos estándar (por ejemplo, ligación de sitios de restricción de complemento en el vector y fragmento de gen de anticuerpo, o ligación de extremo sin punta si no están presentes sitios de restricción). Las regiones variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos descritos en el presente documento, pueden utilizarse para crear genes de anticuerpo de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo al insertarlos en vectores de expresión ya codificando las regiones constantes de cadena ligera y constantes de cadena pesada del isotipo deseado de manera que el segmento V_H se enlaza operativamente al(los) segmento(s) C_H dentro del vector y el segmento V_K se enlaza operativamente al segmento C_L dentro del vector. Adicional o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo de una célula hospedadora. El gen de cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector de manera que el péptido de señal se enlaza en estructura al extremo amino del gen de cadena de anticuerpo. El péptido de señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina o un péptido de señal heteróloga (es decir, un péptido de señal de una proteína de no inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinante de la invención llevan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula

hospedadora. El término “secuencia reguladora” se propone incluir promotores, mejoradores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Se apreciará por aquellos expertos en la material que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de tales factores como la elección de la célula hospedadora a transformarse, el nivel de expresión de proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para expresión de célula hospedadora de mamífero incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteína en células mamíferas, tales como promotores y/o mejoradores derivados de citomegalovirus (CMV), Virus de Simio 40 (SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor posterior principal de adenovirus (AdMLP) y polioma. Alternativamente, las secuencias reguladoras no virales pueden utilizarse, tal como el promotor de ubiquitina o promotor de β -globina. Además, los elementos reguladores compuestos de secuencias de diferentes fuentes, como el sistema promotor SR α , que contiene secuencias del promotor temprano SV40 y la repetición terminal larga de virus de leucemia de célula T humana tipo I (Takebe, Y. *et al.* (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472).

Además de los genes de cadena de anticuerpo y secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la réplica del vector en células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de réplica) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células hospedadoras en las cuales se ha introducido el vector (ver, por ejemplo, patentes de Estados Unidos números 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas por Axel *et al.*). Por ejemplo, normalmente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tal como G418, higromocina o metotrexato, en una célula hospedadora en la cual el vector se ha introducido. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de reductasa de dihidrofolato (DHFR) (para utilizarse en células hospedadoras dhfr con selección/amplificación de metotrexato) y el neo gen (para selección G418).

Para expresión de las cadenas ligeras y pesadas, el(los) vector(es) de expresión que codifican las cadenas pesadas y ligeras se transfectan en una célula hospedadora por técnicas estándar. Las diversas formas del término “transfección” se proponen comprender una amplia variedad de técnicas comúnmente utilizadas para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procarionta o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación de calcio-fosfato, transfección de DEAE-dextrano y lo similar. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la invención en ya sea células hospedadoras procariontas o eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucarióticas, y más preferentemente células hospedadoras de mamífero, es la más preferida debido a que tales células eucarióticas, y en particular células de mamífero particulares, son más probable que las células procariontas para ensamblarse y secretar un anticuerpo inmunológicamente activo y apropiadamente doblado. La expresión procarionta de genes de anticuerpo se ha reportado que es inefectiva para la producción de altas producciones de anticuerpo activo (Boss, M. A. and Wood, C. R. (1985) Immunology Today 6:12-13).

Las células hospedadoras de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen Ovario de Hámster Chino (células CHO) (incluyendo células dhfr-CHO, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci USA 77:4216-4220, utilizadas con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como se describe en R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) Mol Biol. 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. En particular, para utilizarse con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión de gen GS descrito en WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338,841. Cuando los vectores de expresión recombinante que codifican los genes de anticuerpo se introducen en las células hospedadoras de mamífero, los anticuerpos se producen al cultivar las células hospedadoras por un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o, más preferentemente, secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el cual las células hospedadoras se desarrollan. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo utilizando métodos de purificación estándar.

50 Caracterización del anticuerpo que se enlaza a antígeno

Los anticuerpos de la invención pueden probarse para el enlace a PD-L1, por ejemplo, mediante ELISA estándar. Brevemente, las placas de microconcentración se revisten con PD-L1 purificado a 0.25 μ g/ml en PBS, y después se bloquean con 5 % albúmina de suero de bovino en PBS. Las diluciones del anticuerpo (por ejemplo, diluciones de plasma de ratones inmunizados con PD-L1) se agregan a cada cavidad e incuban por 1-2 horas a 37°C. Las placas se enjuagan con PBS/Tween y después se incuban con reactivo secundario (por ejemplo, para anticuerpos humanos, un reactivo policlonal específico de Fc de IgG de cabra-anti-humana) se conjuga con fosfatasa alcalina por 1 hora a 37°C. Después de enjuagar, las placas se desarrollan con substrato pNPP (1 mg/ml), y se analizan a OD de 405-650. Preferentemente, los ratones que desarrollan las concentraciones más altas se utilizarán para fusiones.

Un ensayo ELISA como se describe arriba también puede utilizarse para seleccionar hibridomas que muestran reactividad positiva con el inmunogén PD-L1. Los hibridomas que se enlazan con alta avidéz a PD-L1 se subclonan y caracterizan además. Un clon de cada hibridoma, que retiene la reactividad de las células de origen (por ELISA), puede elegirse para hacer un banco celular de 5-10 frascos almacenado a -140°C, y para purificación de anticuerpo.

Para purificar los anticuerpos anti-PD-L1, los hibridomas seleccionados pueden desarrollarse en frascos giratorios de dos litros para purificación de anticuerpo monoclonal. Los sobrenadantes pueden filtrarse y concentrarse antes de cromatografía de afinidad con sefarosa A de proteína (Pharmacia, Piscataway, NJ). IgG eluido puede verificarse por electroforesis de gel y cromatografía líquida de alto desempeño para asegurar la pureza. La solución reguladora puede intercambiarse en PBS, y la concentración puede determinarse por OD₂₈₀ utilizando coeficiente de extinción 1.43. Los anticuerpos monoclonales pueden alicuotarse y almacenarse a -80°C.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 se enlazan a epítomos únicos, cada anticuerpo puede biotinizarse utilizando reactivos comercialmente disponibles (Pierce, Rockford, IL). Los estudios de competencia que utilizan anticuerpos monoclonales no marcados y anticuerpos monoclonales biotinilados pueden realizarse utilizando placas ELISA revestidas con PD-L1 como se describe arriba. El enlace de mAb biotinilado puede detectarse con una sonda de fosfatasa estreptavidina-avidina -alcalina.

Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, los ELISA de isotipo pueden realizarse utilizando reactivos específicos para los anticuerpos de un isotipo particular. Por ejemplo, para determinar el isotipo de un anticuerpo monoclonal humano, las cavidades de las placas de microconcentración pueden revestirse con 1 µg/ml de inmunoglobulina anti-humana durante la noche a 4°C. Después de bloquear con 1 % BSA, las placas se reaccionan con 1 µg/ml o menos de anticuerpos monoclonales prueba o controles de isotipo purificados, a temperatura ambiente por una a dos horas. Las cavidades pueden entonces reaccionarse con ya sea IgG1 humana o sondas conjugadas con fosfatasa alcalina específica de IgM humana. Las placas se desarrollan y analizan como se describe arriba.

Las IgG humanas anti-PD-L1 pueden probarse además para reactividad con antígeno PD-L1 por transferencia Western. Brevemente, PD-L1 puede prepararse y someterse a electroforesis de gel de poliacrilamida de sulfato dodecil de sodio. Después de la electroforesis, los antígenos separados se transfieren a membranas de nitrocelulosa, bloquean con 10 % suero de bovino fetal, y sondan con anticuerpos monoclonales a probarse. El enlace de IgG humana puede detectarse utilizando fosfatasa alcalina de IgG anti-humana y desarrollarse con tabletas de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.).

Propiedades físicas del anticuerpo

Los anticuerpos de la presente invención pueden caracterizarse además por las diversas propiedades físicas de los anticuerpos anti-PD-L1. Varios ensayos pueden utilizarse para detectar y/o diferenciar las clases diferentes de anticuerpos basándose en estas propiedades físicas.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención pueden contener uno o más sitios de glicosilación en ya sea la región variable de cadena ligera o pesada. La presencia de uno o más sitios de glicosilación en la región variable puede resultar en inmunogenicidad incrementada del anticuerpo o una alteración de pK del anticuerpo debido a enlace a antígeno alterado (Marshall *et al* (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala FA y Morrison SL (2004) *J Immunol* 172:5489-94; Wallick *et al* (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro RG (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh *et al* (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura *et al.* (2000) *Mol Immunol* 37:697-706). Se ha sabido que la glicosilación ocurre en motivos que contienen una secuencia N-X-S/T. La glicosilación de región variable puede probarse utilizando un ensayo Glycoblot, que divide el anticuerpo para producir Fab, y después prueba la glicosilación utilizando un ensayo que mide la oxidación de peróxido y formación base de Schiff. Alternativamente, la glicosilación de región variable puede probarse utilizando cromatografía de luz Dionex (Dionex-LC), que separa los sacáridos de Fab en monosacáridos y analiza el contenido de sacárido individual. En algunos casos, se prefiere tener un anticuerpo anti-PD-L1 que no contiene glicosilación de región variable. Esto puede lograrse ya sea al seleccionar anticuerpos que no contienen el motivo de glicosilación en la región variable o al mutar los restos dentro del motivo de glicosilación utilizando técnicas estándar bien conocidas en la materia.

En una realización preferida, los anticuerpos de la presente invención no contienen sitios de isomerismo de asparagina. Una desamidación o efecto de ácido aspártico puede ocurrir en secuencias N-G o D-G, respectivamente. La desamidación o efecto de ácido isoaspártico resulta en la creación de ácido isoaspártico que disminuye la estabilidad de un anticuerpo al crear una estructura con vueltas de un extremo carboxi de cadena lateral en lugar de la cadena principal. La creación de ácido isoaspártico puede medirse utilizando un ensayo isocuantico, que utiliza HPLC de fase inversa para ácido isoaspártico.

Cada anticuerpo tendrá un punto isoeléctrico único (pI), pero generalmente los anticuerpos caerán en el intervalo de pH de entre 6 y 9.5. El pI para un anticuerpo IgG1 normalmente cae dentro del intervalo de pH de 7-9.5 y el pI para un anticuerpo IgG4 normalmente cae dentro del intervalo de pH de 6-8. Los anticuerpos pueden tener un pI que está fuera de este intervalo. Aunque los efectos generalmente se desconocen, existe especulación que los anticuerpos con un pI fuera del intervalo normal pueden tener algún desdoblamiento e inestabilidad bajo condiciones *vivo*. El punto isoeléctrico puede probarse utilizando enfoque láser para exactitud incrementada (Janini *et al* (2002) *Electrophoresis* 23:1605-11; Ma *et al.* (2001) *Chromatographia* 53:S75-89; Hunt *et al* (1998) *J Chromatogr A* 800:355-67). En algunos casos, se prefiere tener un anticuerpo anti-PD-L1 que contiene un valor pI que cae en el intervalo normal. Esto puede lograrse ya sea al seleccionar anticuerpos con un pI en el intervalo normal, o al mutar

restos de superficie cargados utilizando técnicas estándar bien conocidas en la materia.

Cada anticuerpo tendrá una temperatura de fusión que es indicativa de la estabilidad térmica (Krishnamurthy R and Manning MC (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71). Una estabilidad térmica más alta indica estabilidad del anticuerpo total mayor *vivo*. El punto de fusión de un anticuerpo puede medirse utilizando técnicas tal como calorimetría de exploración diferencial (Chen *et al* (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando *et al* (1999) *Immunol Lett* 68:47-52). T_{M1} indica la temperatura del desdoblamiento inicial del anticuerpo. T_{M2} indica la temperatura del desdoblamiento completo del anticuerpo. Generalmente, se prefiere que T_{M1} de un anticuerpo de la presente invención sea mayor a 60°C, preferentemente mayor a 65°C, aún más preferentemente mayor a 70°C. Alternativamente, la estabilidad térmica de un anticuerpo puede medirse utilizando dicroísmo circular (Murray *et al*. (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9). La estabilidad térmica de anticuerpos anti-PD-L1 descritos en el presente documento se resume en la Tabla 1.

Tabla 1

mAb	Tm1(°C)	Tm2(°C)
3G10	70	75
5F8	72	74
11E6	64	73
1B12	69	72
12A4	68	72
10A5		71
12B7		70
13G4	66	69
10H10		69

En una realización preferida, se seleccionan los anticuerpos que no se degradan rápidamente. La fragmentación de un anticuerpo anti-PD-L1 puede medirse utilizando electroforesis capilar (CE) y MALDI-MS, como se entiende bien en la materia (Alexander AJ and Hughes DE (1995) *Anal Chem* 67:3626-32).

En otra realización preferida, se seleccionan los anticuerpos que tienen mínimos efectos de agregación. La agregación puede conducir a la activación de una respuesta inmune indeseada y/o propiedades farmacocinéticas desfavorables o alteradas. Generalmente, los anticuerpos son aceptables con agregación de 25 % o menos, preferentemente 20 % o menos, aún más preferentemente 15 % o menos, aún más preferentemente 10 % o menos y aún más preferentemente 5 % o menos. La agregación puede medirse por varias técnicas bien conocidas en la materia, incluyendo columna de exclusión de tamaño (SEC), cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC), y difusión de luz para identificar monómeros, dímeros, trímeros o multímeros.

Inmunconjugados

En otro aspecto, la presente invención comprende un anticuerpo anti-PD-L1, o un fragmento del mismo, conjugado con un resto terapéutico, como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina. Tales conjugados se refieren en el presente documento como "inmunconjugados". Los inmunconjugados que incluyen una o más citotoxinas se refieren como "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es dañino para las (por ejemplo, mata) células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colquicina, doxorubicina, daunorubicina, diona de antracita de dihidroxi, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes de alquilación (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalano, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramina (AMC)), y agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Otros ejemplos preferidos de citotoxinas terapéuticas que pueden conjugarse con un anticuerpo de la invención incluyen duocarmicinas, caliqueamicinas, maitansinas y auristatinas, y derivados de los mismos. Un ejemplo de un conjugado de anticuerpo de caliqueamicina está comercialmente disponible (Mylotarg™; Wyeth-Ayerst).

Las citotoxinas pueden conjugarse con anticuerpos de la invención utilizando tecnología enlazadora disponible en la materia. Los ejemplos de tipos de enlazador que se han utilizado para conjugar una citotoxina con un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y enlazadores que contienen péptido. Un enlazador puede elegirse que es, por ejemplo, susceptible de división por pH bajo dentro del compartimiento lisosomal o susceptible de separación por proteasas, tales proteasas preferentemente expresadas en tejido tumoral tales como catepsinas (por ejemplo, catepsinas B, C, D).

Para discusión adicional de tipos de citotoxinas, enlazadores y métodos para conjugar agentes terapéuticos con anticuerpos, ver también Saito, G. *et al.* (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**:199-215; Trail, P.A. *et al.* (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* **52**:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* **3**:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* **2**:750-763; Pastan, I. and Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* **3**:1089-1091; Senter, P.D. and Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* **53**:247-264.

Los anticuerpos de la presente invención también pueden conjugarse con un isótopo radioactivo para generar radiofarmacéuticos citotóxicos, también referidos como radioinmunoconjugados. Ejemplos de isotipos radioactivos que pueden conjugarse con anticuerpos para utilizarse a manera de diagnóstico o terapéutica incluyen, pero no se limitan a, yodo¹³¹, indio¹¹¹, itrio⁹⁰ y lutecio. Se establecen métodos para preparar radioinmunoconjugados en la materia. Ejemplos de radioinmunoconjugados están comercialmente disponibles, que incluyen ZevalinTM (IDEC Pharmaceuticals) y BexxarTM (Corixa Pharmaceuticals), y pueden utilizarse métodos similares para preparar radioinmunoconjugados utilizando los anticuerpos de la invención.

Los conjugados del anticuerpo de la invención pueden utilizarse para modificar una respuesta biológica dada, y el resto de fármaco no debe construirse como limitado a los agentes terapéuticos químicos, clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o fragmento activo de la misma, tales como abrina, ricina A, exotoxina pseudomonas, o toxina de difteria; una proteína tal como un factor de necrosis tumoral o interferón- γ ; o, modificadores de respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de la colonia de macrófagos de granulocitos ("GM-CSF"), factor estimulante de la colonia de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

Se conocen bien las técnicas para conjugar dicho resto terapéutico con anticuerpos, ver, por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery," en *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates," *Immunol. Rev.*, **62**:119-58 (1982).

35 Moléculas biespecíficas

En otro aspecto, la presente invención comprende moléculas biespecíficas que comprenden un anticuerpo anti-PD-L1, o un fragmento del mismo, de la invención. Un anticuerpo de la invención, o porciones de enlace a antígeno de los mismos, pueden derivarse o enlazarse a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que se enlaza a al menos dos sitios de enlace diferentes o moléculas objetivo. El anticuerpo de la invención puede de hecho derivarse o enlazarse a más de otra molécula funcional para generar moléculas multiespecíficas que se enlazan a más de dos sitios de unión diferentes y/o moléculas objetivo; tales moléculas multiespecíficas también se proponen para comprenderse por el término "molécula biespecífica" como se utiliza en el presente documento. Para crear una molécula biespecífica de la invención, un anticuerpo de la invención puede enlazarse funcionalmente {por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más otras moléculas de enlace, como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o imitación de enlace, de manera que resulta una molécula biespecífica.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención incluye moléculas biespecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de enlace para PD-L1 y una segunda especificidad de enlace para un segundo epítipo objetivo. En una realización particular de la invención, el segundo epítipo objetivo es un receptor Fc, por ejemplo, Fc γ RI de humano (CD64) o un receptor Fc α de humano (CD89). Por lo tanto, la invención incluye moléculas biespecíficas capaces de enlazarse tanto a células efectoras que expresan Fc γ R o Fc α R {por ejemplo, monocitos, macrófagos o células polimorfonucleares (PMN)}, y a células objetivo que expresan PD-L1. Estas moléculas biespecíficas tienen como objetivo células que expresan PD-L1 para célula efectora y activar actividades de la célula efectora mediada por el receptor Fc, como fagocitosis de una célula que expresa PD-L1, citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC), liberación de citoquina, o generación de anión de superóxido.

En una realización de la invención en la cual la molécula biespecífica es multiespecífica, la molécula puede incluir además una tercera especificidad de enlace, además de una especificidad de enlace anti-Fc y una especificidad de enlace anti-PD-L1. En una realización, la tercera especificidad de enlace es un factor anti-mejora (EF), por ejemplo, una molécula que se enlaza a una proteína de superficie incluida en actividad citotóxica e incrementa así la respuesta inmune contra la célula objetivo. La "porción del factor anti-mejora" puede ser un anticuerpo, fragmento de anticuerpo funcional o un ligando que se enlaza a una molécula dada, por ejemplo, un antígeno o un receptor, y resulta así en una mejora del efecto de los determinantes de enlace para el receptor Fc o antígeno de célula objetivo.

La "porción del factor anti-mejora" puede enlazarse a un receptor Fc o un antígeno de célula objetivo. Alternativamente, la porción de factor anti-mejora puede enlazarse a una entidad que es diferente de la entidad a la cual se enlazan las especificidades de enlace, primera y segunda. Por ejemplo, la porción de factor anti-mejora puede enlazarse a una célula T citotóxica (por ejemplo vía CD2, CD3, CD5, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 u otra célula inmune que resulta en una respuesta inmune incrementada contra la célula objetivo).

En una realización, las moléculas biespecíficas de la invención comprenden como una especificidad de enlace al menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, o Fv de cadena única. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadena pesada o cadena ligera, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como Fv o una construcción de cadena única como se describe en Ladner *et al.*, patente de Estados Unidos N° 4.946.778 los contenidos de la cual se incorporan de manera expresa para referencia.

En una realización, se proporciona la especificidad de enlace para un receptor Fcγ por un anticuerpo monoclonal, el enlace del cual no se bloquea por inmunoglobulina G humana (IgG). Como se utiliza en el presente documento, el término "receptor de IgG" se refiere a cualquiera de los ocho genes de cadena y ubicados en el cromosoma 1. Estos genes codifican un total de doce isoformas del receptor soluble o transmembrana que se agrupan en tres clases de receptor Fcγ: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), y FcγRIII (CD16). En una realización preferida, el receptor Fcγ es un FcγRI de alta afinidad de humano. FcγRI de humano es una molécula de 72 kDa, que muestra alta afinidad para IgG monomérica (10⁸ - 10⁹M⁻¹).

La producción y caracterización de ciertos anticuerpos monoclonales anti-Fcγ preferidos se describen por Fanger *et al* en Publicación PCT WO 88/00052 y en la patente de Estados Unidos N° 4.954.617, las enseñanzas de las cuales se incorporan completamente para referencia en el presente documento. Estos anticuerpos se enlazan a un epítipo de FcγRI, FcγRII o FcγRIII en un sitio que es distinto del sitio de enlace Fcγ del receptor y, de esta manera, su enlace no se bloquea de manera substancial por niveles fisiológicos de IgG. Los anticuerpos anti-FcγRI específicos útiles en esta invención son mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 y mAb 197. El hibridoma que produce mAb 32 está disponible de la Colección de Cultivo Tipo Americano, No. de Acceso ATCC HB9469. En otras realizaciones, el anticuerpo de receptor anti-Fcγ es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal 22 (H22). La producción y caracterización del anticuerpo H22 se describe en Graziano, R.F. *et al.* (1995.) J. Immunol 155(10): 4996-5002 y Publicación PCT WO 94/10332. El anticuerpo H22 que produce la línea celular se deposita en la Colección de Cultivo Tipo Americano bajo la designación HA022CL1 y tiene el no. de acceso CRL 11177.

En todavía otras realizaciones preferidas, la especificidad de unión para un receptor Fc se proporciona por un anticuerpo que se une a un receptor IgA de humano, por ejemplo, un receptor Fc-alfa (FcαRI (CD89)), el enlace del cual preferentemente no se bloquea por inmunoglobulina A humana (IgA). El término "receptor IgA" se propone incluir el producto genético de un gen α (FcαRI) ubicado en el cromosoma 19. Este gen se conoce por codificar varias isoformas de transmembrana alternativamente separadas de 55 a 110 kDa. FcαRI (CD89) se expresa de manera constitutiva en monocitos/macrófagos, granulocitos neutrófilos y eosinófilos, pero no en poblaciones celulares no efectoras. FcαRI tiene afinidad media (≈5×10⁷ M⁻¹) tanto para IgA1 como IgA2, que se incrementa en la exposición a citotoxinas como G-CSF o GM-CSF (Morton, H.C. *et al.* (1996) Critical Reviews in Immunology 16:423-440). Cuatro anticuerpos monoclonales específicos de FcαRI, identificados como A3, A59, A62 y A77, que enlazan FcαRI fuera del dominio de enlace de ligando IgA, se han descrito (Monteiro, R.C. *et al.* (1992) J. Immunol. 148:1764).

FcαRI y FcγRI son receptores de activación preferidos para utilizarse en las moléculas biespecíficas de la invención debido a que (1) se expresan principalmente en células efectoras inmunes, por ejemplo, monocitos, PMN, macrófagos y células dendríticas; (2) se expresan a altos niveles (por ejemplo, 5,000-100,000 por célula); (3) son mediadores de actividades citotóxicas (por ejemplo, ADCC, fagocitosis); (4) median la presentación de antígeno mejorada de antígenos, incluyendo auto-antígenos, objetivo de ellos.

Aunque los anticuerpos monoclonales humanos se prefieren, otros anticuerpos que pueden emplearse en las moléculas biespecíficas de la invención son anticuerpos monoclonales humanizados, quiméricos y de murino.

Las moléculas biespecíficas de la presente invención pueden prepararse al conjugar las especificidades de enlace constituyentes, por ejemplo, las especificidades de enlace anti-FcR y anti-PD-L1, utilizando métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, cada especificidad de enlace de la molécula biespecífica puede generarse por separado y después conjugarse con otra. Cuando las especificidades de enlace son proteínas o péptidos, varios acoplamientos o agentes degradantes puede utilizarse para conjugación covalente. Ejemplos de agentes degradantes incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilenedimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), y sulfosuccinimidilo 4-(N-maleimidometil) ciclohaxano-l-carboxilato (sulfo-SMCC) (ver por ejemplo, Karpovsky *et al.* (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA *et al* (1985) Proc. Natl. Acad. Sci USA 82:8648). Otros métodos incluyen aquellos descritos en Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan *et al.* (1985) Science 229:81-83, y Glennie *et al.* (1987) J. Immunol. 139:2367-2375). Los agentes de conjugación preferidos son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Quando las especificidades de enlace son anticuerpos, pueden conjugarse a través de enlace de sulfihidro de las regiones de articulación de término C de las dos cadenas pesadas. En una realización particularmente preferida, la región de articulación se modifica para contener un número impar de restos de sulfihidrido, preferentemente uno, antes de la conjugación.

5 Alternativamente, ambas especificidades de unión pueden codificarse en el mismo vector y expresarse y ensamblarse en la misma célula hospedadora. Este método es particularmente útil donde la molécula biespecífica es mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ o ligando x proteína de fusión Fab. Una molécula biespecífica de la invención puede ser una molécula de cadena única que comprende un anticuerpo de cadena única y un determinante de enlace, o una molécula biespecífica de cadena única que comprende dos determinantes de enlace. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas de cadena única. Los métodos para preparar moléculas biespecíficas se describen por ejemplo en la Patente de E.U. Número 5,260,203; Patente de E.U. Número 5,455,030; Patente de E.U. Número 4,881,175; Patente de E.U. Número 5,132,405; Patente de E.U. Número 5,091,513; Patente de E.U. Número 5,476,786; Patente de E.U. Número 5,013,653; Patente de E.U. Número 5,258,498; y Patente de E.U. Número 5,482,858.

El enlace de las moléculas biespecíficas a sus objetivos específicos puede confirmarse mediante, por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), análisis FACS, bioensayo (por ejemplo, inhibición de crecimiento), o ensayo mediante transferencia Western. Cada uno de estos ensayos generalmente detecta la presencia de complejos de proteína-anticuerpo de particular interés al emplear un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, los complejos de FcR-anticuerpo pueden detectarse utilizando por ejemplo, un anticuerpo enlazado a enzima o fragmento de anticuerpo que reconoce y enlaza específicamente a los complejos de anticuerpo-FcR. Alternativamente, los complejos pueden detectarse utilizando cualquiera de varios otros inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse de manera radioactiva y utilizarse en un radioinmunoensayo (RIA) (ver, por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course en Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, marzo, 1986, que se incorpora para referencia en el presente documento). El isótopo radioactivo puede detectarse por tales medios como el uso de un contador y o un contador de centelleo o por autorradiografía.

30 Composiciones Farmacéuticas

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos monoclonales, o porción de enlace a antígeno(s) de los mismos, de la presente invención, formulados juntos con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones pueden incluir uno o una combinación de (por ejemplo, dos o más diferentes) anticuerpos, o inmuoconjugados o moléculas biespecíficas de la invención. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmuoconjugados o biespecíficos) que se enlazan a diferentes epítomos en el antígeno objetivo o que tienen actividades complementarias.

40 Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinarse con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti-PD-L1 de la presente invención combinado con al menos otro agente anti-inflamatorio o inmunosupresor. Ejemplos de agentes terapéuticos que pueden utilizarse en terapia de combinación se describen en mayor detalle abajo en la sección en usos de los anticuerpos de la invención.

45 Como se utiliza en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacteriano y antifúngicos, agentes de retraso de absorción e isotónico, y lo similar que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, anticuerpo, inmuoconjugado, o molécula biespecífica, puede revestirse de un material para proteger al compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

50 Los compuestos farmacéuticos de la invención pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto de origen y no imparte ningún efecto toxicológico indeseado (ver por ejemplo, Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). Ejemplos de tales sales incluyen sales de adición ácida y sales de adición base. Las sales de adición ácida incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como hidroc্লórico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y lo similar, así como también de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos fenil-sustituidos, ácidos alcanóicos de hidroxilo, ácidos aromáticos, ácidos sulfínicos aromáticos y alifáticos y lo similar. Las sales de adición base incluyen aquellas derivadas de metales de tierra alcalina, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y lo similar, así como también de aminas orgánicas no tóxicas, como N,N'-dibenciletulenodiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, procaína y lo similar.

65 Una composición farmacéutica de la invención también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable.

Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y lo similar; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilada (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y lo similar; y (3) agentes quelantes de metal, tales como ácido cítrico, ácido tetraacético de etilendiamina (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y lo similar.

Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (como glicerol, glicol de propileno, glicol de polietileno, y lo similar), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de materiales de revestimiento, como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y por el uso de agentes tensoactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes como conservadores, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de presencia de microorganismos puede asegurarse tanto por procedimientos de esterilización, supra, y por la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido ascórbico de fenol, y lo similar. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, como azúcares, cloruro de sodio, y lo similar en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede originarse por la inclusión de agentes que retrasan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen dispersiones o soluciones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersión o soluciones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la materia. Excepto hasta ahora como cualquier medio convencional o agente es incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la invención. Los compuestos activos complementarios también pueden incorporarse en las composiciones.

Las composiciones terapéuticas normalmente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. Las composiciones pueden formularse como una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para altas concentraciones de fármaco. El vehículo puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, glicol de propileno, y glicol de polietileno líquido, y lo similar), y mezclas adecuadas del mismo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un revestimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de agentes tensoactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede originarse al incluir en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse al incorporar el compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados arriba, según se requiera, seguido por microfiltración por esterilización. Generalmente, las dispersiones se preparan al incorporar el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados arriba. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío o liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución filtrada previamente estéril del mismo.

La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del sujeto que se trata, y el modo de administración particular. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una forma de dosificación única generalmente será aquella cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, fuera de cien por ciento, esta cantidad variará de aproximadamente 0.01 por ciento a aproximadamente noventa y nueve por ciento de ingrediente activo, preferentemente de aproximadamente 0.1 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, más preferentemente de aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente 30 por ciento de ingrediente activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, un bolo único puede administrarse, varias dosis divididas pueden administrarse con el tiempo o la dosis puede reducirse o incrementarse de manera proporcional como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma unitaria de dosificación como se utiliza en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratarse, cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención se dicta por y directamente dependiente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a lograrse, y (b) las limitaciones

inherentes en la materia de composición como un compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

5 Para administración del anticuerpo, los intervalos de dosificación de aproximadamente 0.0001 a 100 mg/kg, y más usualmente 0.01 a 5 mg/kg, del peso corporal del hospedador. Por ejemplo las dosificaciones pueden ser 0.3 mg/kg peso corporal, 1 mg/kg peso corporal, 3 mg/kg peso corporal, 5 mg/kg peso corporal o 10 mg/kg peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ejemplificativo comprende la administración una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, 10 una vez cada 3 meses o una vez cada tres a 6 meses. Los regímenes de dosificación preferidos para un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención incluyen 1 mg/kg peso corporal o 3 mg/kg peso corporal a través de la administración intravenosa, dándose el anticuerpo utilizando uno de los siguientes programas de dosificación: (i) cada cuatro semanas para seis dosificaciones, después cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg peso corporal una vez seguido por 1 mg/kg peso corporal cada tres semanas.

15 En algunos métodos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de enlace se administran de manera simultánea, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado cae dentro de los intervalos indicados. El anticuerpo se administra usualmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosificaciones únicas pueden ser, por ejemplo, semanalmente, mensualmente, cada tres meses o cada año. Los intervalos también pueden ser irregulares como se identifica al medir los niveles en la sangre de anticuerpos para el antígeno objetivo 20 en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para lograr una concentración de anticuerpo de plasma de aproximadamente 1-1000 µg/ml y en algunos métodos aproximadamente 25-300 µg/ml.

25 Alternativamente, el anticuerpo puede administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia varía dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la vida media más larga, seguidos por los anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, y anticuerpos no humanos. La dosificación y frecuencia de administración puede variar dependiendo si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, una dosificación relativamente baja se administra a intervalos relativamente infrecuentes durante un periodo de tiempo largo. Algunos pacientes continúan recibiendo el tratamiento para el resto de sus vidas. En aplicaciones 30 terapéuticas, una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos algunas veces se requiere, hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o termina, y preferentemente hasta que el paciente muestra mejora parcial o completa de síntomas de enfermedad. Después, el paciente puede administrarse a un régimen profiláctico.

35 Los niveles de dosificación actuales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad del ingrediente activo que es efectiva para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición, y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de varios factores farmacocinéticas que incluyen la actividad de composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster, sal o amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se 40 emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con la composición particular empleada, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historia médica anterior del paciente que se trata, y los factores similares bien conocidos en las materias médicas.

45 Una "dosificación terapéuticamente efectiva" de un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención preferentemente resulta en una disminución en la severidad de síntomas de enfermedad, un incremento en frecuencia y duración de periodos libres de síntoma de enfermedad, o una prevención de deterioro o incapacidad debido a la aflicción de la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de PD-L1 + tumores, una "dosificación terapéuticamente efectiva" preferentemente inhibe el crecimiento celular o crecimiento tumoral por al menos aproximadamente 20 %, más preferentemente por al menos aproximadamente 40 %, aún más preferentemente por al menos aproximadamente 60 %, y aún más preferentemente por al menos aproximadamente 80 % relativo a sujetos sin tratar. La capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento tumoral puede evaluarse en un sistema de modelo animal predictivo de 50 eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición puede evaluarse al examinar la capacidad del compuesto para inhibirse, tal inhibición *in vitro*, por ensayos conocidos por el practicante experto. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño tumoral, o de otra manera mejorar los síntomas en un sujeto. Uno de experiencia ordinaria en la materia sería capaz de determinar tales cantidades basándose en tales factores como el tamaño del sujeto, la severidad de los síntomas del sujeto, y la composición particular o vía de administración seleccionada. 55

60 Una composición de la presente invención puede administrarse a través de una o más vías de administración utilizando uno o más de varios métodos conocidos en la materia. Como se apreciará por el experto en la materia, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Las vías de administración preferidas para anticuerpos de la invención incluyen intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal y otras vías de administración parenteral, por ejemplo, por inyección o infusión. La frase "administración parenteral" como se utiliza en el presente documento significa modos de administración diferente a la 65 administración entérica y tópica, usualmente por inyección, e incluye, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías de administración parenteral, por ejemplo, por

inyección o infusión. La frase "administración parenteral" como se utiliza en el presente documento significa modos de administración diferentes a la administración entérica y tópica, usualmente por inyección, e incluye, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural e infusión e inyección intraesternal.

Alternativamente, un anticuerpo de la invención puede administrarse a través de una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosal, por ejemplo, intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópicamente.

Los compuestos activos pueden prepararse con vehículos que protegerán el compuesto contra liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro microencapsulados. Los polímeros biodegradables, biocompatibles pueden utilizarse, tales como acetato de vinil de etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones se patentan o generalmente se conocen por aquellos expertos en la materia. Ver, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la materia. Por ejemplo, en una realización preferida, una composición terapéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, como los dispositivos descritos en las Patentes de E.U. Nos. 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; o 4,596,556. Ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en el presente documento invención incluyen: Patente de E.U. No. 4,487,603, la cual describe una bomba de micro-infusión implantable para distribuir medicación a una velocidad controlada; Patente de E.U. No. 4,486, 194, la cual describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos por la piel; Patente de E.U. No. 4,447,233, la cual describe una bomba de infusión de medicación para suministrar medicación a una velocidad de infusión precisa; Patente de E.U. No. 4,447,224, la cual describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para suministro de fármaco continuo; Patente de E.U. No. 4,439,196, la cual describe un sistema de suministro de fármaco osmótico que tiene compartimientos de múltiples cámaras; y Patente de E.U. No. 4,475,196, la cual describe un sistema de suministro de fármaco osmótico. Estas patentes se incorporan en el presente documento para referencia. Muchos otros de tales implantes, sistemas de suministro, y módulos se conocen por aquellos expertos en la materia.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención pueden formularse para asegurar distribución apropiada *vivo*. Por ejemplo, la barrera de sangre-cerebro (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrofílicos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención cruzan la BBB (si se desea), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para métodos de fabricación de liposomas, ver, por ejemplo, patentes de Estados Unidos 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que se transportan selectivamente en órganos y células específicas, que mejoran el suministro de fármaco objetivo (ver, por ejemplo, V. V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685). Los restos objetivo ejemplificativos incluyen folato o biotina (ver, por ejemplo, patentes de Estados Unidos 5.416.016 para Low *et al*); manosidos (Umezawa *et al.*, (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman *et al.* (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais *et al.* (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); receptor de proteína A de agente tensioactivo (Briscoe *et al.* (1995) Am. J. Physiol. 1233:134); p120 (Schreier *et al.* (1994) J Biol. Chem. 269:9090); ver también K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; Jj. Killion; LJ. Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

Usos y Métodos de la Invención

Los anticuerpos, composiciones de anticuerpo y métodos de la presente invención tienen numerosas utilidades *in vitro* e *vivo* que incluyen, por ejemplo, detección de PD-L1 o mejora de respuesta inmune por bloqueo de PD-L1. En una realización preferida, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos humanos. Por ejemplo, estas moléculas pueden administrarse a células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, por ejemplo, *vivo*, para mejorar la inmunidad en varias situaciones. De acuerdo con lo anterior, la respuesta inmune de un sujeto se puede modificar mediante la administración del anticuerpo, o porción de enlace a antígeno del mismo, de la invención de manera que la respuesta inmune en el sujeto se modifica. Preferentemente, la respuesta se mejora, estimula o actualiza.

Como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" se propone incluir humano y animal no humano. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, como primates no humanos, oveja, perros, gatos, vacas, caballos, pollos, anfibios, y reptiles, aunque se prefieren los mamíferos, como primates no humanos, oveja, perros, gatos, vacas y caballos. Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos en necesidad de mejora de una respuesta inmune. Especialmente, los pacientes humanos que tienen un trastorno que puede tratarse al aumentar la respuesta inmune mediada por célula T. Se pueden tratar las células cancerosas *vivo*. Para lograr la mejora de inmunidad específica de antígeno, los anticuerpos anti-PD-L1 pueden administrarse junto con un antígeno de interés. Cuando anticuerpos a PD-L1 se administran junto con otro agente, los dos pueden administrarse en cualquier orden o simultáneamente.

Además, la presencia de antígeno PD-L1 en una muestra, o medir la cantidad de antígeno PD-L1 humano, que comprende contactar la muestra, y una muestra de control, con un anticuerpo monoclonal humano, o una porción de enlace a antígeno del mismo, que específicamente se enlaza a PD-L1 humano, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo o porción del mismo y PD-L1 humano. La formación de un complejo se detecta entonces, en donde una formación de complejo de diferencia entre la muestra en comparación con la muestra de control es indicativa de la presencia de antígeno PD-L1 humano en la muestra.

Cáncer

El bloqueo de PD-L1 por anticuerpos puede mejorar la respuesta inmune a células cancerígenas en el paciente. PD-L1 no se expresa en células humanas normales, pero es abundante en varios cánceres de humano (Dong *et al.* (2002) *Nat Med* **8**:787-9). La interacción entre PD-1 y PD-L1 resulta en una disminución en linfocitos infiltrando el tumor, una disminución en la proliferación mediada por el receptor de célula T, y evasión inmune por las células cancerígenas (Dong *et al.* (2003) *J Mol Med* **81**:281-7; Blank *et al.* (2004) *Cancer Immunol. Immunother.* [epub]; Konishi *et al.* (2004) *Clin. Cancer Res.* **10**:5094-100). La supresión inmune puede invertirse al inhibir la interacción local de PD-L1 a PD-1 y el efecto es aditivo cuando la interacción de PD-L2 con PD-1 también se bloquea (Iwai *et al.* (2002) *PNAS* **99**:12293-7; Brown *et al.* (2003) *J. Immunol.* **JTO**:1257-66). Un anticuerpo anti-PD-L1 pueden utilizarse solo para inhibir los crecimientos tumorales cancerosos. Alternativamente, un anticuerpo anti-PD-L1 puede utilizarse en conjunción con otros agentes inmunogénicos, tratamientos de cáncer estándar, u otros anticuerpos, como se describe abajo.

De acuerdo con lo anterior, el crecimiento de células tumorales en un sujeto se puede inhibir mediante la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-PD-L1, o porción de enlace a antígeno del mismo de la invención. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo humano anti-PD-L1 (como cualquiera de los anticuerpos PD-L1 anti-humano de humano descritos en el presente documento). Adicional o alternativamente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado o quimérico anti-PD-L1.

Los cánceres preferidos cuyo crecimiento puede inhibirse utilizando los anticuerpos de la invención incluyen cánceres normalmente en respuesta a inmunoterapia. Los ejemplos no limitantes de cánceres preferidos para tratamiento incluyen melanoma (por ejemplo, melanoma maligno metastásico), cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de pulmón. Ejemplos de otros cánceres que pueden tratarse incluyen cáncer óseo, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de la cabeza o cuello, melanoma maligno intraocular o cutáneo, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer estomacal, cáncer testicular, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello del útero, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, Enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endócrino, cáncer de la glándula tiroideas, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de la uretra, cáncer del pene, leucemias, crónica o aguda que incluyen leucemia mieloide aguda leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasia del sistema nervioso central (SNC), linfoma SNC primario, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma pituitario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de célula escamosa, linfoma de células T, cánceres inducidos por el medio ambiente incluyendo aquellos inducidos por amianto, y combinaciones de dichos cánceres. Especialmente, también se pueden tratar cánceres metastásicos, especialmente cánceres metastásicos que expresan PD-L1 (Iwai *et al.* (2005) *Int. Immunol.* **17**:133-144).

Opcionalmente, los anticuerpos para PD-L1 pueden combinarse con un agente inmunogénico, tales como células cancerosas, antígenos tumoral purificados (incluyendo proteínas recombinantes, péptidos, y moléculas de carbohidrato), células, y células transfectadas con genes que codifican citoquinas estimulantes inmunes (He *et al.* (2004) *J. Immunol.* **173**:4919-28). Los ejemplos no limitantes de vacunas tumorales que pueden utilizarse incluyen péptidos de antígenos de melanoma, tales como péptidos de gp100, antígenos MAGE, Trp-2, MART1 y/o tirosinasa, o células tumorales transfectadas para expresar GM-CSF de citoquina (tratados más abajo).

En humanos, se ha demostrado que algunos tumores son inmunogénicos tales como melanomas. Se anticipa que al elevar el umbral de la activación de célula T por bloqueo de PD-L1, esperaremos activar las respuestas del tumor en el hospedador.

El bloqueo de PD-L1 probablemente es el más efectivo cuando se combina con un procedimiento de vacunación. Muchas estrategias experimentales para vacunación contra tumores se han contemplado (ver Rosenberg, S., 2000, *Development of Cancer Vaccinas*, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C, 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 300-302; Khayat, D. 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 414-428; Foon, K. 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 730-738; ver también Restifo, N. y Sznol, M., *Cancer Vaccinas*, Ch. 61, pp. 3023-3043 en DeVita, V. *et al.* (eds.), 1997, *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Quinta Edición). En una de estas estrategias, se prepara una vacuna utilizando células tumorales alogénicas y antólogas. Estas vacunas celulares se han mostrado ser más efectivas cuando las células tumorales se traducen para expresar GM-CSF. GM-CSF ha

demostrado ser un activador potente de presentación de antígeno para vacunación tumoral (Dranoff *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 90: 3539-43).

5 El estudio de expresión genética y patrones de expresión genética a gran escala en varios tumores ha conducido a la definición de los así llamados antígenos específicos tumoral (Rosenberg, SA (1999) Immunity 10: 281-7). En cualquier caso, estos antígenos específicos tumoral son antígenos de diferenciación expresados en los tumores y en la célula de los cuales el tumor se origina, por ejemplo antígenos de melanocito gp100, antígenos MAGE, y Trp-2. De manera más importante, muchos de estos antígenos pueden mostrarse ser los objetivos de células T específicas tumoral encontradas en el hospedador. El bloqueo de PD-L1 puede utilizarse junto con una colección de proteínas recombinantes y/o péptidos expresados en un tumor para generar una respuesta inmune a estas proteínas. Estas proteínas se observan normalmente por el sistema inmune de autoantígenos y por lo tanto son tolerantes a ellos. El antígeno tumoral también puede incluir la telomerasa de proteína, que se requiere para la síntesis de telómeros de cromosomas y que se expresa en más del 85 % de cánceres humanos y en solamente un número limitado de tejidos somáticos (Kim, N *et al.* (1994) Science 266: 2011-2013). (Estos tejidos somáticos pueden protegerse de ataque inmune por varios medios). El antígeno tumoral también pueden ser "neo-antígenos" expresados en células cancerígenas debido a las mutaciones somáticas que alteran la secuencia de proteínas o crean proteínas de fusión entre dos secuencias no relacionadas (*es decir* bcr-abl en el cromosoma Filadelfia), o idiotipo tumorales de célula B.

20 Otras vacunas tumoral pueden incluir las proteínas de virus implicadas en cánceres humanos tales como Virus de Papiloma Humano (HPV), Virus de Hepatitis (HBV y HCV) y Virus de Sarcoma de Herpes de Kaposi (KHSV). Otra forma de antígeno específico tumoral que puede utilizarse junto con el bloqueo de PD-L1 es proteína de choque térmico purificada (HSP) aislada del tejido tumoral por sí misma. Estas proteínas de choque térmico contienen fragmentos de proteínas de las células tumorales y estas HSP son altamente eficientes en el suministro a células que presentan antígeno para producir inmunidad tumoral (Suot, R & Srivastava, P (1995) Science 269:1585-1588; Tamura, Y. *et al.* (1997) Science 278:117-120).

30 Las células dendríticas (DC) células que presentan antígeno potente que pueden utilizarse para cebar respuestas específicas de antígeno. DC pueden producirse *ex in vivo* y cargarse con varios antígenos de péptido y proteína así como también extractos de célula tumoral (Nestle, F. *et al.* (1998) Nature Medicine 4:328-332). DC también pueden traducirse por medios genéticos para expresar estos antígenos tumorales también. DC también se han fusionado directamente a células tumorales para los propósitos de inmunización (Kugler, A. *et al.* (2000) Nature Medicine 6:332-336). Como un método para vacunación, la inmunización DC puede combinarse de manera efectiva con bloqueo de PD-L1 para activar respuestas anti-tumor más potentes.

35 El bloqueo de PD-L1 también puede combinarse con tratamientos de cáncer estándar. El bloque de PD-L1 puede combinarse de manera efectiva con regímenes terapéuticos. En estos casos, puede ser posible reducir la dosis de reactivo quimioterapéutico administrado (Mokyr, M. *et al.* (1998) Cancer Research 58: 5301-5304). Un ejemplo de tal combinación es un anticuerpo anti-PD-L1 en combinación con decarbazina para el tratamiento de melanoma. Otro ejemplo de tal una combinación es un anticuerpo anti-PD-L1 en combinación con interleucina-2 (IL-2) para el tratamiento de melanoma. El racional científico detrás del uso combinado de bloqueo de PD-L1 y quimioterapia es que la muerte celular, que es consecuencia de la acción citotóxica de la mayoría de los compuestos quimioterapéuticos, debe resultar en niveles incrementados de antígeno tumoral en la trayectoria de presentación de antígeno. Otras terapias de combinación que pueden resultar en sinergia con bloqueo de PD-L1 a través de la muerte celular son radiación, cirugía y privación de hormona. Cada uno de estos procedimientos crea una fuente de antígeno tumoral en el hospedador. Los inhibidores de angiogénesis también pueden combinarse con bloqueo de PD-L1. La inhibición de angiogénesis conduce a muerte de la célula tumoral que puede alimentar antígeno tumoral hacia las trayectorias de presentación del antígeno hospedador.

50 Los anticuerpos de bloqueo de PD-L1 también pueden utilizarse en combinación con anticuerpos biespecíficos que tienen como células efectoras que expresan el receptor Fcγ o Fc alfa a células tumorales (ver, por ejemplo, patentes de Estados Unidos 5.922.845 y 5.837.243). Los anticuerpos biespecíficos pueden utilizarse para tener como objetivo dos antígenos separados. Por ejemplo, anticuerpos biespecíficos de receptor anti-Fc/anti tumor (por ejemplo, Her-2/neu) se han utilizado para tener como objetivo macrófagos sitios tumorales. Este objetivo puede activar más efectivamente respuestas específicas tumorales. El brazo de células T de estas respuestas se aumentaría por el uso de bloqueo de PD-L1. Alternativamente, el antígeno puede suministrarse directamente con DC por el uso de anticuerpos biespecíficos que se enlazan a antígeno tumoral y una célula dendrítica específica del marcador de superficie celular.

60 Los tumores evaden la supervivencia inmune hospedadora por una gran variedad de mecanismos. Muchos de estos mecanismos pueden superar por la inactivación de proteínas que se expresan por los tumores y que son inmunosupresores. Estos incluyen entre otros TGF-beta (Kehrl, J. *et al.* (1986) J. Exp. Med. 163:1037-1050), IL-10 (Howard, M. & O'Garra, A. (1992) Immunology Today 13:198-200), y ligando Fas (Hahne, M. *et al.* (1996) Science 274:1363-1365). Los anticuerpos para cada una de estas entidades pueden utilizarse en combinación con anti-PD-L1 para contrarrestar los efectos del agente inmunosupresor y favorecer las respuestas inmunes tumoral por el hospedador.

65

Otros anticuerpos que pueden utilizarse para activar la capacidad de respuesta inmune del hospedador pueden utilizarse en combinación con anti-PD-L1. Estos incluyen moléculas en la superficie de células dendríticas que activan la función de DC y presentación de antígeno. Los anticuerpos Anti-CD40 son capaces de substituir efectivamente la actividad auxiliar de células T (Ridge, J. *et al* (1998) *Nature* 393:474-478) y pueden utilizarse en conjunción con anticuerpos PD-L1 (Ito, N. *et al* (2000) *Immunobiology* 201 (5) 527-40). Los anticuerpos de avivación a las moléculas coestimuladoras de células T tales como OX-40 (Weinberg, A. *et al.* (2000) *Immunol* 164:2160-2169), 4-1BB (Melero, I. *et al.* (1997) *Nature Medicine* 3:682-685 (1997), e ICOS (Hutloff, A. *et al* (1999) *Nature* 397:262-266) así como también anticuerpos los cuales bloquean la actividad de moléculas coestimuladoras negativas como CTLA-4 (por ejemplo, patentes de Estados Unidos 5.811.097) o BTLA (Watanabe, N. *et al.* (2003) *Nat Immunol* 4:670-9), B7-H4 (Sica, GL *et al* (2003) *Immunity* 18:849-61) también puede probarse para niveles incrementados de activación de célula T.

El trasplante de médula ósea se utiliza actualmente para tratar una variedad tumoral de origen hematopoyético. Aunque la enfermedad de injerto contra hospedador es una consecuencia de este tratamiento, beneficio terapéutico puede obtenerse de injerto vs. respuesta tumoral. El bloqueo de PD-L1 puede utilizarse para incrementar la efectividad de las células T específicas tumoral injertadas en el donador.

También existen varios procedimientos de tratamiento experimentales que incluyen activación ex in vivo y expansión de células T específicas de antígeno y transferencia adoptiva de estas células en recipientes para células T específicas de antígeno contra tumor (Greenberg, R. & Riddell, S. (1999) *Science* 285: 546-51). Estos métodos también pueden utilizarse para activar las respuestas de células T para agentes infecciones tales como CMV. La activación ex in vivo en la presencia de anticuerpos anti-PD-L1 puede esperarse que incremente la frecuencia y actividad de las células T transferidas de manera adoptiva.

Enfermedades Infecciosas

Los anticuerpos de la invención se pueden utilizar para tratar pacientes que se han expuesto a toxinas particulares o patógenos. De acuerdo con lo anterior, se puede tratar una enfermedad infecciosa en un sujeto que comprende administrar al sujeto un anticuerpo anti-PD-L1, o porción de enlace a antígeno del mismo de la invención, de manera que el sujeto se trata para la enfermedad infecciosa. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo anti-PD-L1 humano de humano (tal como cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 de humano descritos en el presente documento). Adicional o alternativamente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado o quimérico.

De manera similar a su aplicación a tumores como se trata arriba, el bloqueo de PD-L1 mediado por anticuerpo puede utilizarse solo, o como un adyuvante, en combinación con vacunas, para estimular la respuesta inmune para patógenos, toxinas, y auto-antígenos. Ejemplos de patógenos para los cuales este planteamiento terapéutico puede ser particularmente útil, incluyendo patógenos para los cuales no existe actualmente una vacuna efectiva, o patógenos para los cuales las vacunas convencionales son menos que completamente efectivas. Estas incluyen, pero no se limitan a VIH, Hepatitis (A, B y C), Influenza, Herpes, Giardia, Malaria, Leishmania, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. El bloque de PD-L1 es particularmente útil contra infecciones establecidas por agentes tales como VIH que presentan antígenos alterados sobre el curso de las infecciones. Estos nuevos epítopos se reconocen como externos al momento de la administración de anti-PD L1 humano, provocando así una fuerte respuesta de célula T que no se humecta por señales negativas a través de PD-L1.

Algunos ejemplos de virus patogénicos causando las infecciones tratables por los métodos de la invención incluyen VIH, hepatitis (A, B, o C), virus del herpes (por ejemplo, VZV, HSV-I, HAV-6, HSV-II, y CMV, virus Epstein Barr), adenovirus, virus de influenza, flavivirus, ecovirus, rinovirus, virus Coxsackie, coronavirus, virus sincitial respiratorio, virus de paperas, rotavirus, virus de sarampión, virus de rubéola, parvovirus, virus vaccinia, virus HTLV, virus del dengue, virus de papiloma, virus molluscum, poliovirus, virus de rabia, virus JC y virus de encefalitis arboviral.

Algunos ejemplos de bacterias patogénicas causando infecciones tratables por métodos de la invención incluyen clamidia, bacteria rickettsia, micobacteria, estafilococos, estreptococos, neumococos, meningococos y conococos, klebsiella, proteus, serratia, pseudomonas, legionella, difteria, salmonella, bacilli, cólera, tétanos, botulismo, ántrax, plaga, leptospirosis, y bacteria de enfermedad de Lyme.

Algunos ejemplos de hongos patogénicos causando infecciones tratables por métodos de la invención incluyen *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis*, etc.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger*, etc.), género Mucorales (mucor, absidia, rhizophus), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*.

Algunos ejemplos de parásitos patogénicos causando infecciones tratables por métodos de la invención incluyen *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondi*, *Nippostrongylus brasiliensis*.

En todos los métodos anteriores, el bloqueo de PD-L1 puede combinarse con otras formas de inmunoterapia como

tratamiento de citoquina (por ejemplo, interferones, GM-CSF, G-CSF, IL-2), o terapia de anticuerpo biespecífico, que proporciona presentación mejorada de antígenos tumoral (ver, por ejemplo, Holliger (1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90:6444-6448; Poljak (1994) Structure 2:1121-1123).

5 Reacciones autoinmunes

Los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden provocar y amplificar las respuestas inmunes. Sin embargo, la inducción de respuestas anti-tumor utilizando célula tumoral y vacunas de péptido revela que muchas respuestas anti-tumor incluyen anti-auto reactividades (despigmentación observada en anti-CTLA-4 + GM-CSF-melanoma B16 modificado en van Elsas *et al* supra; la despigmentación en ratones vacunados con Trp-2 (Overwijk, W. *et al* (1999) Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 96: 2982-2987); prostatitis autoinmune evocada por vacunas de célula tumoral TRAMP (Hurwitz, A. (2000) supra), vacunación de antígeno de péptido de melanoma y vitíligo observados en pruebas clínicas en humanos (Rosenberg, SA and White, DE (1996) J. Immunother Emphasis Tumor Immunol 19(1): 81-4).

15 Por lo tanto, es posible considerar utilizando bloqueo anti-PD-L1 junto con varias auto proteínas para divisar procedimientos de vacunación para generar de manera eficiente respuestas inmunes contra estas auto proteínas para tratamiento de enfermedad. Por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer incluye acumulación inapropiada de péptido Aβ en depósitos amiloides en el cerebro; respuestas de anticuerpo contra amiloide son capaces de despejar los depósitos amiloide (Schenk *et al*, (1999) Nature 400:173-177).

20 Otras auto proteínas también pueden utilizarse como objetivos tales como IgE para el tratamiento de alergia y asma, y TNFα para artritis reumatoide. Finalmente, las respuestas de anticuerpo a varias hormonas pueden inducirse por el uso de anticuerpo anti-PD-L1. Las respuestas de anticuerpo neutralizantes a hormonas reproductivas pueden utilizarse para contracepción. La respuesta de anticuerpo neutralizante a hormonas y otros factores solubles que se requieren para el crecimiento tumorales particulares también puede considerarse como objetivos de vacunación posibles.

30 Los métodos análogos como se describen arriba para el uso de anticuerpo anti-PD-L1 pueden utilizarse para utilizarse para inducción de respuestas autoinmunes terapéuticas para tratar pacientes que tienen una acumulación inapropiada de otros auto-antígenos, tales como depósitos amiloide, incluyendo Aβ en enfermedad de Alzheimer, citoquinas como TNFα, e IgE.

Vacunas

35 Anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden utilizarse para estimular respuestas inmunes específicas de antígeno por coadministración de dicho anticuerpo anti-PD-L1 con un antígeno de interés (por ejemplo, una vacuna). De acuerdo con lo anterior, se puede potenciar una respuesta inmune a un antígeno de la invención en un sujeto, que comprende administrar al sujeto: (i) el antígeno; y (ii) un anticuerpo anti-PD-L1, o porción de enlace a antígeno del mismo, de manera que una respuesta inmune al antígeno en el sujeto se mejora. Preferentemente, el anticuerpo es un anti-PD-L1 humano anticuerpo de humano (como cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 de humano descritos en el presente documento). Adicional o alternativamente, el anticuerpo puede ser quimérico o anticuerpo humanizado. El antígeno puede ser, por ejemplo, un antígeno tumoral, un antígeno viral, un antígeno bacteriano o un antígeno de un patógeno. Los ejemplos no limitantes de tales antígenos incluyen aquellos tratados en las secciones de arriba, como los antígenos tumoral (o vacunas tumoral) tratado arriba, o antígenos de los virus, bacterias u otros patógenos descritos arriba.

50 Anticuerpos anti-PD-L1 también pueden utilizarse para revocar los efectos secundarios asociados con enfermedades tal como enfermedad consuntiva suprimida de célula T con colitis (Kanai *et al*. (2003) J. Immunol. 171:4156-63). De acuerdo con lo anterior, los anticuerpos de la invención se pueden utilizar para revocar la infiltración de leucocito, disminuir la producción de IFN-γ, IL-2, e IFN-α por células T. Preferentemente, el anticuerpo es una anticuerpo anti-humano PD-L1 de humano (como cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 de humano descritos en el presente documento). Adicional o alternativamente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado o quimérico.

55 Anticuerpos anti-PD-L1 también pueden utilizarse para tratar enfermedades tales como enfermedades inflamatorias crónicas, como liquen plano, una enfermedad mucocutánea inflamatoria crónica mediada por célula T (Youngnak-Piboonratanakit *et al*. (2004) Immunol Letters 94:215-22). De acuerdo con lo anterior, en otro aspecto la invención proporciona un método para revocar la enfermedad inflamatoria crónica por células T. Preferentemente, el anticuerpo es una anticuerpo anti-humano PD-L1 de humano (como cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 de humano descritos en el presente documento). Adicional o alternativamente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado o quimérico.

65 Las vías adecuadas para administrar las composiciones de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanos, inmunoconjugados y moléculas multiespecíficas o biespecíficas) de la invención *vivo* e *in vitro* se conocen también en la materia y pueden seleccionarse por aquellos de experiencia ordinaria. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpo pueden administrarse por inyección (por ejemplo, intravenosa o subcutánea). Las dosificaciones

adecuadas de las moléculas utilizadas dependerán de la edad y peso del sujeto y la concentración y/o formulación de la composición de anticuerpo.

5 Como se describe previamente, los anticuerpos anti-PD-L1 de humano de la invención pueden co-administrarse con uno u otros agentes terapéuticos, por ejemplo, un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor. El anticuerpo puede enlazarse al agente (como un inmunocomplejo) o puede administrarse separado del agente. En el último caso (administración separada), el anticuerpo puede administrarse antes, después o concurrentemente con el agente o puede co-administrarse con otras terapias conocidas, por ejemplo, una terapia anti-cáncer, por ejemplo, radiación. Tales agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes anti-neoplásicos tales
10 como doxorubicina (adriamicina), sulfato de bleomicina de cisplatina, carmustina, clorambucilo, e hidroxiurea de ciclofosfamida, por sí mismo, que pueden por sí mismo ser solamente efectivos en niveles que son tóxicos o subtóxicos a un paciente. La cisplatina se administra intravenosamente como un 100 mg/dosis una vez cada cuatro semanas y adriamicina se administra intravenosamente como una dosis de 60-75 mg/ml una vez cada 21 días. La co-administración de los anticuerpos anti-PD-L1 de humano, o fragmentos de antígeno de enlace del mismo, de la presente invención con quimioagentes terapéuticos proporciona dos agentes anti-cáncer que operan a través de diferentes mecanismos que producen un efecto citotóxico a células tumorales humanas. Tal co-administración puede resolver los problemas debido al desarrollo de resistencia a fármacos o un cambio en la antigenicidad de las células tumorales que las volverían no reactivas con el anticuerpo.

20 También se describen en el presente documento kits que comprenden las composiciones de anticuerpo de la invención (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas biespecíficas o multiespecíficas, o inmunoconjugados) e instrucciones para uso. El kit puede contener además al menos un reactivo adicional, o uno o más anticuerpos humanos adicionales de la invención (por ejemplo, un anticuerpo humano que tiene una actividad complementaria que se enlaza a un epítipo en antígeno PD-L1 distinto del primer anticuerpo humano). Los kits normalmente incluyen una etiqueta que indica el uso propuesto de los contenidos del kit. El término etiqueta incluye cualquier
25 escritura, o material grabado suministrado en o con el kit, o que de otra manera acompaña el kit.

La presente invención se ilustra además por los siguientes ejemplos que no deberían construirse como limitantes adicionales. El anticuerpo 12A4 es un anticuerpo de acuerdo con la presente invención.

30

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de Anticuerpos Monoclonales Humanos Contra PD-L1

Antígeno

Los procedimientos de inmunización utilizaron como antígeno tanto (i) una proteína de fusión recombinante que comprende la porción extracelular de PD-L1, como (ii) PD-L1 de longitud completa enlazada a membrana. Ambos antígenos se generan por métodos de transfección recombinante en una línea celular CHO.

40

Ratones transgénicos (colonia KM-Mouse®)

Los anticuerpos monoclonales completamente humanos para PD-L1 se preparan utilizando la cepa KM de ratones transcromosómicos transgénicos, que expresa genes de anticuerpo humano. En esta cepa de ratón, el gen de cadena ligera kappa de ratón endógeno se ha interrumpido de manera homogénea como se describe en Chen *et al.* (1993) EMBO J. 12:811-820 y el gen de cadena pesada de ratón endógeno se ha interrumpido de manera homogénea como se describe en el Ejemplo 1 de la Publicación PCT WO 01/09187. Además, esta cepa de ratón lleva un transgén de cadena ligera kappa humana, KCo5, como se describe en Fishwild *et al.* (1996) Nature Biotechnology 14:845-851, y un transcromosoma SC20 como se describe en la Publicación PCT WO 02/43478.

50

Inmunizaciones KM-Mouse®

Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos para PD-L1, un cohorte de ratones de la cepa KM-Mouse® se inmunizan con células CHO transfectadas con PD-L1 e PD-L1-Ig recombinantes, purificadas como antígeno. Los esquemas de inmunización general para ratones HuMab se describen en Lonberg, N. *et al.* (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. *et al.* (1996) Nature Biotechnology 14:845-851 y Publicación PCT WO 98/24884. Los ratones fueron 6-16 semanas de edad en la primera infusión de antígeno. Una preparación recombinante purificada (5-50 µg) de antígeno PD-L1-Ig y 5-10x10⁶ células se utilizan para inmunizar los ratones HuMab intraperitonealmente (IP), subcutáneamente (Sc) o a través de inyección en la base del pie.

60

Los ratones transgénicos se inmunizan doce veces con antígeno en adyuvante de Freund completo o adyuvante Ribi IP, seguido por 3-21 días IP (hasta un total de 11 inmunizaciones) con el antígeno en adyuvante Ribi o de Freund incompleto. La respuesta inmune se monitorea por sangrados retroorbitales. El plasma se selecciona por ELISA (como se describe abajo), y ratones con suficientes concentraciones de una inmunoglobulina anti-PD-L1 humana se utilizan para fusiones. Los ratones se refuerzan intravenosamente con antígeno 3 días antes del sacrificio y el retiro del bazo. Normalmente, 10-35 fusiones para cada antígeno se realizan. Varias docenas de ratones se inmunizan

65

para cada antígeno.

Selección de KM-Mouse® que Producen Anticuerpos Anti-PD-L1:

- 5 Para seleccionar ratones HuMab que producen anticuerpos que enlazan PD-L1, sueros de ratones inmunizados se prueban por ELISA como se describe por Fishwild, D. *et al.* (1996). Brevemente, las placas de microconcentración se revisten con proteína de fusión PD-L1 recombinante purificada de células CHO transfectadas a 1-2 µg/ml en PBS, 100 µl/cavidades incubadas 4°C durante la noche después se bloquean con 200 µl/cavidad de 5 % suero de bovino fetal en PBS/Tween (0.05 %). Las diluciones de sueros de ratones inmunizados con PD-L1 se agregan a cada
10 cavidad e incuban por 1-2 horas a temperatura ambiente. Las placas se enjuagan con PBS/Tween y después se incuban con un anticuerpo policlonal de IgG anti-humano de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) por 1 hora a temperatura ambiente. Después de enjuagar, las placas se desarrollan con substrato ABTS (Sigma, A-1888, 0.22 mg/ml) y se analizan por espectrofotómetro a OD 415-495. Los ratones que desarrollan las concentraciones más altas de anticuerpos anti-PD-L1 se utilizan para fusiones. Las fusiones se realizan como se describe abajo y los sobrenadantes de hibridoma se prueban para actividad anti-PD-L1 por ELISA.
15

Generación de Hibridomas que Producen Anticuerpos Monoclonales Humanos a PD-L1:

- 20 Los esplenocitos de ratón, aislados de un ratón KM, se fusionan con PEG a una línea celular de mieloma de ratón basándose en los procedimientos estándar. Los hibridomas resultantes se seleccionan entonces para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Las suspensiones de célula única de esplenocitos de ratones inmunizados se fusionan a un cuarto del número de células de mieloma de ratón no secretoras SP2/0 (ATCC, CRL1581) con 50 % PEG (Sigma). Las células se colocan a aproximadamente 1×10^5 /cavidad en placa de microconcentración de fondo plano, seguido por aproximadamente dos semanas de incubación en medio selectivo que contiene 10 % suero de bovino fetal, 10 % medio acondicionado con P388D1 (ATCC, CRL TIB-63), 3-5 % origen (IGEN) en DMEM (Mediatech, CRL 10013, con alta glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio) más 5 mM HEPES, 0.055 mM 2-mercaptoetanol, 50 mg/ml gentamicina y 1x HAT (Sigma, CRL P-7185). Después de 1-2 semanas, las células se cultivan en medio en el cual HAT se reemplaza con HT. Las cavidades individuales se seleccionan entonces por
25 ELISA (descrito arriba) para anticuerpos de IgG monoclonales anti-PD-L1 de humano. Una vez que el crecimiento de hibridoma extensivo, el medio se monitorea usualmente después de 10-14 días. Los hibridomas que secretan anticuerpo se vuelven a colocar en placas, se seleccionan de nuevo y, si aún son positivas para IgG humana, los anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 se subclonan al menos dos veces por dilución limitante. Los subclones estables se cultivan entonces *in vitro* para generar cantidades pequeñas de anticuerpo en medio de cultivo de tejido para caracterización adicional.
30

- 35 Los clones de hibridoma 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, y 13G4 se seleccionan para análisis adicional.

Ejemplo 2: Caracterización Estructural de Anticuerpos Monoclonales Humanos 3G10, 12A4, y 10A5

- 40 Las secuencias de ADNc que codifican las regiones variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, y 13G4 se obtienen de los hibridomas 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, y 13G4, respectivamente, utilizando técnicas PCR estándar y se secuencian utilizando técnicas de secuenciación de ADN estándar.

- 45 Las secuencia de aminoácidos y nucleótidos de la región variable de cadena pesada de 3G10 se muestran en la Figura 1A y en SEC ID N°:81 y 1, respectivamente.

- 50 Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la región variable de cadena ligera de 3G10 se muestran en la Figura 1B y en SEC ID N°:91 y 11, respectivamente.

- 55 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada 3G10 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostraron que la cadena pesada 3G10 utiliza un segmento VH de VH 1-18 de línea germinal humana, un segmento D no determinado, y un segmento JH de JH 6b de línea germinal humana. La alineación de la secuencia VH 3G10 con la secuencia de VH 1-18 de línea germinal se muestra en la Figura 11. Análisis adicional de la secuencia VH 3G10 utilizando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena pesada como se muestra en las Figuras 1A y 11, y en SEC ID N°s:21, 31 y 41, respectivamente.

- 60 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera 3G10 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera 3G10 utiliza un segmento VL de VK L6 de línea germinal humana y un segmento JK de JK 1 de línea germinal humana. La alineación de la secuencia VL 3G10 con la secuencia VK L6 de línea germinal se muestra en la Figura 21. Análisis adicional de la secuencia VL 3G10 utilizando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena ligera como se muestra en las Figuras 1B y 21, y en SEC ID N°s:51, 61 y
65 71, respectivamente.

Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la región variable de cadena pesada de 12A4 se muestran en la Figura 2A y en SEC ID N°: 82 y 2, respectivamente.

5 Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la región variable de cadena ligera de 12A4 se muestran en la Figura 2B y en SEC ID N°:92 y 12, respectivamente.

10 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada 12A4 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que la cadena pesada 12A4 utiliza un segmento VH de VH 1-69 de línea germinal humana, un segmento D de 3-10 de línea germinal humana, y un segmento JH de JH 6b de línea germinal humana. La alineación de la secuencia VH 12A4 con la secuencia VH 1-69 de línea germinal se muestra en la Figura 12. Análisis adicional de la secuencia VH 12A4 utilizando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena pesada como se muestra en las Figuras 2A y 12, y en SEC ID N°s:22, 32 y 42, respectivamente.

15 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera 12A4 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera 12A4 utiliza un segmento VL de VK L6 de línea germinal humana y un segmento JK de JK 1 de línea germinal humana. La alineación de la secuencia VL 12A4 con la secuencia VK L6 de línea germinal se muestra en la Figura 22. Análisis adicional de la secuencia VL 12A4 utilizando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena ligera como se muestra en las Figuras 2B y 22, y en SEC ID N°s:52, 62 y 72, respectivamente.

25 Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la región variable de cadena pesada de 10A5 se muestran en la Figura 3A y en SEC ID N°:83 y 3, respectivamente.

Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la región variable de cadena ligera de 10A5 se muestran en la Figura 3B y en SEC ID N°:93 y 13, respectivamente.

30 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada 10A5 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que la cadena pesada 10A5 utiliza un segmento VH de VH 1-3 de línea germinal humana, un segmento D de 5-5 de línea germinal humana, y un segmento JH de JH 4b de línea germinal humana. La alineación de la secuencia VH 10A5 con la secuencia VH 1-3 de línea germinal se muestra en la Figura 13. Análisis adicional de la secuencia VH 10A5 utilizando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena pesada como se muestra en las Figuras 3A y 13, y en SEC ID N°s:23, 33, y 43, respectivamente.

35 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera 10A5 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera 10A5 utiliza un segmento VL de VK L15 de línea germinal humana y un segmento JK de JK 2 de línea germinal humana. La alineación de la secuencia VL 10A5 con la secuencia VK L15 de línea germinal se muestra en la Figura 23. Análisis adicional de la secuencia VL 10A5 utilizando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena ligera como se muestra en las Figuras 3B y 23, y en SEC ID N°s:53, 63, y 73, respectivamente.

45 Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la región variable de cadena pesada de 5F8 se muestran en la Figura 4A y en SEC ID N°: 84 y 4, respectivamente.

50 Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la región variable de cadena ligera de 5F8 se muestran en la Figura 4B y en SEC ID N°:94 y 14, respectivamente.

55 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada 5F8 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que la cadena pesada 5F8 utiliza un segmento VH de VH 1-69 de línea germinal humana, un segmento D de 6-13 de línea germinal humana, y un segmento JH de JH 4b de línea germinal humana. La alineación de la secuencia VH 5F8 con la secuencia VH 1-69 de línea germinal se muestra en la Figura 14. Análisis adicional de la secuencia VH 5F8 utilizando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena pesada como se muestra en las Figuras 4A y 14, y en SEC ID N°s:24, 34, y 44, respectivamente.

60 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera 5F8 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera 5F8 utiliza un segmento VL de VK A27 de línea germinal humana y un segmento JK de JK 1 de línea germinal humana. La alineación de la secuencia VL 5F8 con la secuencia VK A27 de línea germinal se muestra en la Figura 24. Análisis adicional de la secuencia VL 5F8 utilizando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena ligera como se muestra en las Figuras 4B y 24, y en SEC ID N°s:54, 64, y 74, respectivamente.

65

Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la región variable de cadena pesada de 10H10 se muestran en la Figura 5A y en SEC ID N°:85 y 5, respectivamente.

5 Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la región variable de cadena ligera de 10H10 se muestran en la Figura 5B y en SEC ID N°:95 y 15, respectivamente.

10 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada 10H10 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que la cadena pesada 10H10 utiliza un segmento VH de VH 3-9 de línea germinal humana, un segmento D de 4-17 de línea germinal humana, y un segmento JH de JH 4b de línea germinal humana. La alineación de la secuencia VH 10H10 con la secuencia VH 3-9 de línea germinal se muestra en la Figura 15. Análisis adicional de la secuencia VH 10H10 utilizando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena pesada como se muestra en las Figuras 5A y 15, y en SEC ID N°s:25, 35, y 45, respectivamente.

15 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera 10H10 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera 10H10 utiliza un segmento VL de VK L15 de línea germinal humana y un segmento JK de JK 2 de línea germinal humana. La alineación de la secuencia VL 10H10 con la secuencia VK L15 de línea germinal se muestra en la Figura 25. Análisis adicional de la secuencia VL 10H10 utilizando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena ligera como se muestra en las Figuras 5B y 25, y en SEC ID N°s:55, 65, y 75, respectivamente.

25 Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la región variable de cadena pesada de 1B12 se muestran en la Figura 6A y en SEC ID N°:86 y 6, respectivamente.

Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la región variable de cadena ligera de 1B12 se muestran en la Figura 6B y en SEC ID N°:96 y 16, respectivamente.

30 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada 1B12 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que la cadena pesada 1B12 utiliza un segmento VH de VH 1-69 de línea germinal humana, un segmento D de 3-10 de línea germinal humana, y un segmento JH de JH 6b de línea germinal humana. La alineación de la secuencia VH 1B12 con la secuencia VH 1-69 de línea germinal se muestra en la Figura 16. Análisis adicional de la secuencia VH 1B12 utilizando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena pesada como se muestra en las Figuras 6A y 16, y en SEC ID N°s:26, 36, y 46, respectivamente.

35 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera 1B12 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera 1B12 utiliza un segmento VL de VK L6 de línea germinal humana y un segmento JK de JK 1 de línea germinal humana. La alineación de la secuencia VL 1B12 con la secuencia VK L6 de línea germinal se muestra en la Figura 26. Análisis adicional de la secuencia VL 1B12 utilizando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena ligera como se muestra en las Figuras 6B y 26, y en SEC ID N°s:56, 66, y 76, respectivamente.

45 Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la región variable de cadena pesada de 7H1 se muestran en la Figura 7A y en SEC ID N°:87 y 7, respectivamente.

50 Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la región variable de cadena ligera de 7H1 se muestran en la Figura 7B y en SEC ID N°:97 y 17, respectivamente.

55 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada 7H1 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que la cadena pesada 7H1 utiliza un segmento VH de VH 1-69 de línea germinal humana, un segmento D de 3-10 de línea germinal humana, y un segmento JH de JH 6b de línea germinal humana. La alineación de la secuencia VH 7H1 con la secuencia VH 1-69 de línea germinal se muestra en la Figura 17. Análisis adicional de la secuencia VH 7H1 utilizando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena pesada como se muestra en las Figuras 7A y 17, y en SEC ID N°s:27, 37, y 47, respectivamente.

60 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera 7H1 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera 7H1 utiliza un segmento VL de VK L6 de línea germinal humana y un segmento JK de JK 1 de línea germinal humana. La alineación de la secuencia VL 7H1 con la secuencia VK L6 de línea germinal se muestra en la Figura 27. Análisis adicional de la secuencia VL 7H1 utilizando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena ligera como se muestra en las Figuras 7B y 27, y en SEC ID N°s:57, 67, y 77, respectivamente.

65

Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la región variable de cadena pesada de 11E6 se muestran en la Figura 4A y en SEC ID N°:84 y 4, respectivamente.

5 Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la región variable de cadena ligera de 11E6 se muestran en la Figura 4B y en SEC ID N°: 94 y 14, respectivamente.

10 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada 11E6 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que la cadena pesada 11E6 utiliza un segmento VH de VH 1-69 de línea germinal humana, un segmento D de 6-19 de línea germinal humana, y un segmento JH de JH 6c de línea germinal humana. La alineación de la secuencia VH 11E6 con la secuencia VH 1-69 de línea germinal se muestra en la Figura 18. Análisis adicional de la secuencia VH 11E6 utilizando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena pesada como se muestra en las Figuras 8A y 18, y en SEC ID N°s:28, 38, y 48, respectivamente.

15 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera 11E6 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera 11E6 utiliza un segmento VL de línea germinal humana VK A27 y un segmento JK de JK 4 de línea germinal humana. La alineación de la secuencia VL 11E6 con la secuencia VK A27 de línea germinal se muestra en la Figura 27. Análisis adicional de la secuencia VL 11E6 utilizando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena ligera como se muestra en las Figuras 8B y 28, y en SEC ID N°s:58, 68, y 78, respectivamente. Además, un segundo clon relacionado incluyó la secuencia VK como se muestra en SEC ID N°:109. Este anticuerpo se denota en el presente documento como 11E6a.

25 Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la región variable de cadena pesada de 12B7 se muestran en la Figura 9A y en SEC ID N°:89 y 9, respectivamente.

Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la región variable de cadena ligera de 12B7 se muestran en la Figura 9B y en SEC ID N°:99 y 19, respectivamente.

30 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada 12B7 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que la cadena pesada 12B7 utiliza un segmento VH de VH 1-69 de línea germinal humana, un segmento D de 3-10 de línea germinal humana, y un segmento JH de JH 6b de línea germinal humana. La alineación de la secuencia VH 12B7 con la secuencia VH 1-69 de línea germinal se muestra en la Figura 19. Análisis adicional de la secuencia VH 12B7 utilizando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena pesada como se muestra en las Figuras 9A y 19, y en SEC ID N°s:29, 39, y 49, respectivamente.

40 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera 12B7 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera 12B7 utiliza un segmento VL de VK L6 de línea germinal humana y un segmento JK de JK 5 de línea germinal humana. La alineación de la secuencia VL 12B7 con la secuencia VK L6 de línea germinal se muestra en la Figura 29. Análisis adicional de la secuencia VL 12B7 utilizando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena ligera como se muestra en las Figuras 9B y 29, y en SEC ID N°s:59, 69, y 79, respectivamente.

45 Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la región variable de cadena pesada de 13G4 se muestran en la Figura 10A y en SEC ID N°:90 y 10, respectivamente.

50 Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la región variable de cadena ligera de 13G4 se muestran en la Figura 10B y en SEC ID N°:100 y 20, respectivamente.

55 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada 13G4 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que la cadena pesada 13G4 utiliza un segmento VH de VH 3-9 de línea germinal humana, un segmento D de 3-9 de línea germinal humana, y un segmento JH de JH 4b de línea germinal humana. La alineación de la secuencia VH 13G4 con la secuencia VH 3-9 de línea germinal se muestra en la Figura 20. Análisis adicional de la secuencia VH 13G4 utilizando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena pesada como se muestra en las Figuras 10A y 20, y en SEC ID N°s:30, 40, y 50, respectivamente.

60 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera 13G4 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera 13G4 utiliza un segmento VL de VK L18 de línea germinal humana y un segmento JK de JK 3 de línea germinal humana. La alineación de la secuencia VL 13G4 con la secuencia VK L18 de línea germinal se muestra en la Figura 30. Análisis adicional de la secuencia VL 13G4 utilizando el sistema Kabat de determinación de región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena ligera como se muestra en las Figuras 10B y 30, y en SEC ID N°s:60, 70, y 80, respectivamente.

65

Ejemplo 3: Caracterización de Especificidad de Unión y Cinéticas de Unión de Anticuerpos Monoclonales Humanos Anti-PD-L1

- 5 En este ejemplo, la afinidad de unión y cinéticas de unión de anticuerpos anti-PD-L1 se examinan por análisis Biacore. La especificidad de unión, y competición cruzada se examinan por citometría de flujo.

Afinidad de unión y cinéticas

- 10 Los anticuerpos anti-PD-L1 se caracterizan por cinéticas de enlace y afinidades por análisis Biacore (Biacore AB, Uppsala, Suecia). La proteína de fusión PD-L1 humana recombinante purificada se enlaza covalentemente a un chip CM5 (chip revestido con dextrano de metil carboxilo) a través de aminas primarias, utilizando química de acoplamiento de amina estándar y kit proporcionado por Biacore, a una densidad de 562 RUs. La unión se mide al
- 15 fluir los anticuerpos en regulador HBS EP (proporcionado por Biacore AB) a una concentración de 133 nM a una velocidad de flujo de 50 µl/min. Las cinéticas de asociación de antígeno-anticuerpo se siguen por 1 minuto y las cinéticas de disociación se siguen por 1 minuto. Las curvas de asociación y disociación se ajustan a un modelo de enlace Langmuir 1:1 utilizando software BIAevaluation (Biacore AB). Para minimizar los efectos de avididad en la estimación de las constantes de enlace, solamente el segmento inicial de datos correspondientes a las fases de asociación y disociación se utilizan para ajuste. Los valores K_D , $K_{encendido}$, $K_{apagado}$, que se determinan se muestran en
- 20 la Tabla 2.

Tabla 2. Datos de enlace Biacore para anticuerpos monoclonales humanos PD-L1

Muestra #	Muestra ID	Afinidad $K_D \times 10^{-9}$ (M)	En tasa $K_{encendido} \times 10^5$ (1/Ms)	En tasa $K_{apagado} \times 10^{-4}$ (1/s)
1	3G10	3.39	5.25	17.8
3	10A5	1.45	2.58	3.72

- 25 Los datos de enlace adicionales obtenidos por método de enlace de equilibrio y analizados en GraphPad Prism se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Datos de enlace de equilibrio Biacore para anticuerpos monoclonales humanos PD-L1

Clon ID	K_D (nM) 37C	K_D (nM) 25C
12A4	1.94	0.76
7H1	2.15	nd
1B12	1.38	0.61
12B7	0.83	0.53
10A5	2.41	0.57
10H10	5.93	5.48
13G4	1.87	3.3
11E6	0.53	2.9
5F8	2.17	0.75

- 30 Especificidad de unión por citometría de flujo
- Las líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO) que expresan PD-L1 humano recombinante en la superficie celular se desarrollan y utilizan para determinar la especificidad de anticuerpos monoclonales humanos PD-L1 por
- 35 citometría de flujo. Las células CHO se transfectan con plásmidos de expresión que contienen formas de transmembrana que codifican ADNc de longitud completa de PD-L1. La unión de los anticuerpos monoclonales humanos anti-PD-L1 3G10, 10A5 y 12A4 se valora al incubar las células transfectadas con el anticuerpo monoclonal humano anti-PD-L1. Las células se enjuagan y el enlace se detecta con un Ab IgG anti-humano marcado con FITC. Los análisis citométricos de flujo se realizan utilizando una citometría de flujo FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). La unión se compara con la línea celular CHO de origen. Los resultados se muestran en las Figuras 32A (HuMAb 3G10), 32B (HuMAb 10A5) y 32C (HuMAb 12A4). El enlace también se prueba utilizando concentraciones variables de un anticuerpo anti-PD-L1. Los resultados se muestran en la Figura 33. Los anticuerpos monoclonales humanos anti-PD-L1 3G10, 10A5 y 12A4 se unen a las células CHO transfectadas con PD-L1 en una manera dependiente de concentración. Estos datos demuestran que los anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 humanos
- 45 específicamente se unen a PD-L1 de superficie celular.

Especificidad de unión por ELISA

- 50 La especificidad de los anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 se determina utilizando ensayo ELISA estándar para enlace a una fusión de PD-L1 humano con una región Fc de inmunoglobulina.

Una proteína de fusión Fc de PD-L1 humano se prueba para enlace contra los anticuerpos monoclonales humanos anti-PD-L1 3G10, 12A4 y 10A5. Los procedimientos ELISA estándar se realizan. Los anticuerpos monoclonales humanos anti-PD-L1 se agregan a diferentes concentraciones. El anticuerpo policlonal de IgG anti-humana de cabra (específica de cadena kappa) conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) se utiliza como anticuerpo secundario. Los resultados se muestran en la Figura 34. Cada uno de los anticuerpos monoclonales humanos anti-PD-L1 3G10, 12A4 y 10A5 se enlazan con alta especificidad a PD-L1.

Ejemplo 4: Caracterización de un anticuerpo anti-PD-L1 enlazándose a PD-L1 expresado en la superficie celular de células T de mono y humano

Los anticuerpos anti-PD-L1 se prueban por citometría de flujo para enlace a células T de mono cinomolgo o humano activadas que expresan PD-L1 en su superficie.

Las células T de mono o humano se activan por anticuerpo anti-CD3 para inducir la expresión PD-L1 antes del enlace con un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 humano. El enlace de los anticuerpos monoclonales humanos 3G10, 1B12, 13G4 y 12A4 se valora al incubar las células activadas con diluciones eriales de los anticuerpos monoclonales humanos anti-PD-L1. Un anticuerpo de control de isotipo se utiliza como un control negativo. Las células se enjuagan y el enlace se detecta con un Ab de cadena ligera kappa de Ig anti-humano marcado con FITC. Los análisis citométricos de flujo se realizan utilizando un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Estos resultados se muestran en la Figura 35 y 36. Los anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 3G10, 1B12, 13G4 y 12A4 se unen a células T de mono y humano activadas. Estos datos demuestran que los anticuerpos monoclonales humanos anti-PD-L1 se enlazan a PD-L1 de superficie celular de mono cinomolgo y humano.

Ejemplo 5: Caracterización de anticuerpo anti-PD-L1 que se une a PD-L1 expresado en la superficie celular de células T humanas

Los anticuerpos anti-PD-L1 se prueban para enlace a células T humanas activadas que expresan PD-L1 en su superficie celular por citometría de flujo.

Las células T humanas se activan por anticuerpo anti-CD3 para inducir la expresión de PD-L1 en células T antes de enlazarse con un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 humano. El enlace de los anticuerpos monoclonales humanos anti-PD-L1 3G10, 10A5 y 12A4 a una concentración de 20 µg/ml. Un anticuerpo de control de isotipo se utiliza como un control negativo. Las células se enjuagan y el enlace se detecta con un Ab de IgG anti-humana marcada con FITC. Los análisis citométricos de flujo se realizan utilizando una citometría de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los resultados se muestran en las Figuras 37A (HuMab 3G10), 37B (HuMab 10A5) y 37C (HuMab 12A4). Los anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 3G10, 10A5 y 12A4 se unen a las células T humanas activadas (línea negrita), como se muestra en los diagramas de histograma en comparación con el control (línea delgada). Estos datos demuestran que los anticuerpos monoclonales humanos anti-PD-L1 se enlazan a PD-L1 de superficie celular humana.

Ejemplo 6: Especificidad de enlace por citometría de flujo

La línea celular de carcinoma ovárico de humano ES-2 que expresa PD-L1 en la superficie celular se utiliza para determinar la especificidad de anticuerpos monoclonales humanos PD-L1 por citometría de flujo. Las células ES-2 se tratan durante la noche con 500 IU/ml de hIFN-γ para incrementar la expresión de PD-L1 sobre el nivel basal. El enlace de los anticuerpos monoclonales humanos anti-PD-L1 12A4, 1B12, 3G10, 10A5, 12B7, 13G4, 11E6 y 5F8 se valora al incubar las células inducidas con diluciones seriales del anticuerpo monoclonal humano anti-PD-L1. Las células se enjuagan y el enlace se detecta con un Ab de IgG anti-humano marcado con PE. Los análisis citométricos de flujo se realizan utilizando un citómetro de flujo FACScalibur (Becon Dickinson, San José, CA). El enlace se compara con anticuerpo de control de isotipo. Los resultados se muestran en las Figuras 38. Los anticuerpos monoclonales humanos anti-PD-L1 12A4, 1B12, 3G10, 10A5, 12B7, 13G4, 11E6 y 5F8 se enlazan a células ES-2 inducidas por hIFN-γ en una manera dependiente de la concentración. Estos datos demuestran que los anticuerpos monoclonales humanos anti-PD-L1 específicamente se enlazan a PD-L1 de superficie celular.

Ejemplo 7: Efecto de anticuerpos anti-PD-L1 humanos en la proliferación celular y producción de citoquina en una Reacción de linfocitos Mezclada

Una reacción de linfocitos mezclada se emplea para demostrar el efecto de bloqueo de trayectoria PD-L1/PD-1 a células efectoras de linfocito. Las células T en el ensayo se prueban para proliferación, secreción de IFN-γ y secreción de IL-2 en la presencia o ausencia de un anticuerpo monoclonal humano anti-PD-L1.

Las células T CD4+ humanas se purifican de PBMC utilizando un kit de selección positiva CD4+ (Dynal Biotech). Las células dendríticas se derivan de monocitos purificados cultivados con 1000 U/ml de IL-4 y 500 U/ml de GM-CSF (R&D Biosystems) para siete días. Los monolitos se preparan utilizando un kit de selección negativa de monolito (Mitenyi Biotech). Cada cultivo contuvo 10⁵ células T purificadas y 10⁴ células dendríticas alogénicas en un volumen total de 200 µl. Anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 10A5, 12A4, o 3G10 se agrega a cada cultivo a diferentes

concentraciones de anticuerpo. Ni el anticuerpo o anticuerpo de control de isotipo se utilizan como un control negativo. Las células se cultivan por 5 días a 37°C. Después de 5 días, 100 µl de medio se toma de cada cultivo para medición de citoquina. Los niveles de IFN-γ y IL-2 se miden utilizando kits OptEIA ELISA (BD Biosciences). Las células se marcan con ³H-timidina, cultivan por otras 18 horas, y analizan para proliferación celular. Los resultados se muestran en las Figuras 39A (proliferación de célula T), 39B (secreción de IFN-γ utilizando HuMAb 10A5), 39C (secreción de IFN-γ utilizando HuMAb 12A4 o 3G10) y 39D (secreción de IL-2). El anticuerpo monoclonal humano anti-PD-L1 10A5 promueve la proliferación de célula T, secreción de IFN-γ y secreción de IL-2 en una manera dependiente de concentración. Los anticuerpos monoclonales humanos anti-PD-L1 12A4 y 3G10 también muestran un incremento en secreción de IFN-γ. En contraste, los cultivos que contienen el anticuerpo de control no muestran un incremento en proliferación de célula T, IFN-γ o secreción de IL-2.

En un experimento separado, una reacción de linfocitos mezclada alogénica (MLR) se emplea para demostrar el efecto de bloquear la trayectoria PD-L1/PD-1 en células efectoras de linfocito. Las células T en el ensayo se prueban para proliferación y secreción de IFN-γ en la presencia o ausencia de un anticuerpo monoclonal humano anti-PD-L1 o anticuerpo de control de isotipo.

Las células T CD4+ de humano se purifican de PBMC utilizando un kit de selección negativa CD4+ (Miltenyi). Los monocitos se preparan utilizando un kit de selección negativo de monolito (Miltenyi Biotech). Las células dendríticas se derivan de monocitos purificados cultivados con 1000 U/ml de IL-4 y 500 U/ml de GM-CSF (R&D Biosystems) por siete días. Cada cultivo MLR contuvo 10⁵ células T purificadas y 10⁴ células dendríticas alogénicas en un volumen total de 200 µl. El anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 12A4, 11E6, 3G10, 13G4, 1B12, 10A5, y 12B7 se agrega a cada cultivo a diferentes concentraciones de anticuerpo. Ni el anticuerpo o un anticuerpo de control de isotipo se utilizan como un control negativo. Las células se cultivan por 5 días a 37°C. El día 5, 50 µl de medio se toma de cada cultivo para medición de citoquina y reemplaza con un volumen igual de medio de cultivo que contiene 1 µCi de ³H-timidina. Las células se cultivan por otras 18 horas, recolectan, y analizan para proliferación celular. Los niveles de IFN-γ en el fluido de cultivo se miden utilizando un kit ELISA hIFN-γ OptEIA (BD Biosciences). Los resultados se muestran en la Figura 40. Los anticuerpos monoclonales humanos anti-PD-L1 promueven la proliferación de célula T y secreción de IFN-γ en una manera dependiente de concentración. En contraste, los cultivos que contienen el anticuerpo de control no muestran un incremento en proliferación de célula T o secreción de INF-γ.

Ejemplo 8: Efecto de anticuerpo anti-PD-L1 humano en función de células reguladoras T

Las células reguladoras T (CD4+, CD25+) son linfocitos que suprimen la respuesta inmune. El efecto de la adición de células reguladoras T en proliferación y secreción de IFN-γ en la célula dendrítica alogénica y MLR de célula T en la presencia o ausencia de un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 humano se prueba.

Las células reguladoras T se purifican de PBMC utilizando un kit de aislamiento de célula T reguladora CD4+CD25+ (Miltenyi Bistec). Las células reguladoras T se agregan en una reacción de linfocitos mezclada (ver arriba) que contiene células T CD24+CD25 purificadas y células dendríticas alogénicas en una proporción 2:1 de células reguladoras T CD4+CD25. Anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 10A5 se agrega a cada cultivo a una concentración de 10 µg/ml. Ni un anticuerpo o un anticuerpo de control de isotipo se utilizan como un control negativo. Las células se cultivan por 5 días a 37°C tiempo al cual los sobrenadantes se analizan para secreción de IFN-γ utilizando un sistema de detección de citoquina Beadlyte (Upstate). Las células se marcan con ³H-timidina, cultivan por otras 18 horas, y analizan para proliferación celular. Los resultados se muestran en las Figuras 41A (proliferación de célula T) y 41B (secreción de IFN-γ). La adición de anticuerpo monoclonal humano anti-PD-L1 10A5 promueve tanto la proliferación de células T como la secreción de IFN-γ en cultivos celulares de células dendríticas alogénicas, las células T y células reguladoras T, indicando que los anticuerpos anti-PD-L1 pueden invertir el efecto de células reguladoras T en células T DC alogénica-MLR.

En un experimento separado, los anticuerpos anti-PD-L1 humanos 12A4 y 13G4, y un anticuerpo de control ID12, se prueban en el ensayo MLR con células reguladoras T. Los resultados se muestran en las Figuras 42 (proliferación de célula T) y 43 (secreción de IFN-γ). La adición de anticuerpos monoclonales humanos anti-PD-L1 12A4 y 13G4 invierte parcialmente la supresión de tanto proliferación de célula T como secreción de IFN-γ en cultivos celulares de células dendríticas alogénicas y células T que contienen células reguladoras T, indicando que los anticuerpos anti-PD-L1 pueden tener un efecto en células reguladoras T.

Ejemplo 9: Efecto de anticuerpos anti-PD-1 en secreción de citoquina por células PBMC estimuladas por antígeno viral de un donador responsivo de CMV positivo

PBMC de humano responsivo de antígeno CMV (Astarte Biologics, Redmond, WA) se cultivan a 2e5 células/cavidad en placas de 96 cavidades tratadas con TC de fondo plano, en la presencia de 0.5 ug/ml lisado CMV (Astarte Biologics) +/- anticuerpos anti-PD-L1 concentrados. Medio AIM-V (Invitrogen) complementado con FBS inactivado por calor (10 % final) se utiliza a un volumen total de 200 ul/cavidad. Las células se cultivan por 4 días a 37°C, 5 % CO₂ tiempo en el cual el sobrenadante de cultivo se recolecta para determinación de interferón-γ secretado por ELISA (OptEIA kit ELISA hIFN-γ - BD Biosciences). Los resultados se muestran en la Figura 44. Los anticuerpos monoclonales humanos anti-PD-L1 promueven la secreción de IFN-γ por células T específicas de CMV en una manera dependiente de la dosis. La respuesta más robusta se genera por los anticuerpos 13G4, 1B12 y 12A4 en

comparación con el control de isotipo. Estos resultados muestran que los HuMAb anti-PD-L1 pueden estimular la liberación de IFN- γ en la respuesta de célula T de memoria de células PBMC previamente estimulada contra un antígeno.

5 **Ejemplo 10: Bloqueo de ligando de PD-L1 que se enlaza a PD-1 por anticuerpos anti-PD-L1 humanos**

Los anticuerpos monoclonales humanos anti-PD-L1 se prueban por la habilidad para bloquear en enlace del ligando PD-L1 a PD-1 expresado en células CHO transfectadas al utilizar un ensayo de citometría celular.

10 Las células CHO que expresan PD-1 se suspenden en regulador FACS (PBS con 4 % suero de bovino fetal). Varias concentraciones de los HuMAb anti-PD-L1 3G10, 10A5 o 12A4 se agregan a los tubos de suspensión celular a 4°C por 30 minutos, seguido por la adición de PD-L1 marcado con FITC fusionado a la región Fc de inmunoglobulina. Los análisis citométricos de flujo se realizan utilizando un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, San José, CA). Los resultados se representan en la Figura 45. Los anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 3G10, 10A5, y
15 12A4 bloquearon el enlace de PD-L1 a células CHO transfectadas con PD-1 humano, según se mide por la intensidad fluorescente promedio (MFI) de coloración. Estos datos demuestran que los HuMAb anti-PD-L1 bloquean el enlace de ligando de PD-L1 a PD-1 de superficie celular.

20 **Ejemplo 11: Inhibición del enlace de PD-1 soluble a PD-L1 de superficie celular por anticuerpos anti-PD-L1 de humano**

Anticuerpos monoclonales humanos anti-PD-L1 se prueban para la habilidad de bloquear el enlace de una versión dimérica soluble del receptor PD-1 (PD-1-hFc) a PD-L1 expresado en células de carcinoma ovárico de humano ES-2 inducido por hIFN- γ utilizando un ensayo de citometría de flujo. El bloqueo se compara con el anticuerpo de control de isotipo.
25

Las células ES-2 se inducen durante la noche con 500 IU/ml de hIFN- γ para suprarregular la expresión de superficie celular hPD-L1. Las células inducidas se suspenden en regulador FACS. Las diluciones seriales de los HuMAb anti-PD-L1 12A4, 1B12, 3G10, 10A5, 12B7, 13G4, 11E6 y 5F8 se agregan a los tubos de suspensión celular a 4°C por
30 30 minutos, seguido por dos enjuagues para remover el anticuerpo no enlazado. Después la proteína PD-1-hFc se agrega a una constante de 2 μ g/ml a todas las cavidades a 4°C por 30 minutos, seguido por dos enjuagues para remover PD-1-hFc no enlazado. Después el PD-1-hFc enlazado se detecta en las células ES-2 por la adición de HuMAb 26D5 anti-PD-1 sin bloqueo, biotinilado, que se enlaza a PD-1 cuando se enlaza a PD-L1, a 4°C por 30 minutos, seguido por dos enjuagues para remover anticuerpo no enlazado. Finalmente, el anticuerpo 26D5 enlazado
35 se detecta por la adición de conjugado de estreptavidina-PE a 4°C por 30 minutos, seguido por dos enjuagues para remover el conjugado no enlazado. El análisis citométrico de flujo se realiza utilizando un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, San José, CA). Los resultados se representan en la Figura 46. Los anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 12A4, 1B12, 3G10, 10A5, 12B7, 13G4, 11E6 y 5F8 bloquearon el enlace de PD-1 a células ES-2 que expresan PD-L1 humano, según se mide por la intensidad fluorescente promedio geométrica (GMFI) de coloración. Estos datos demuestran que los HuMAb anti-PD-L1 bloquean el enlace de receptor de PD-1 soluble a PD-L1 de superficie celular.
40

Ejemplo 12: Tratamiento de modelo tumoral vivo utilizando anticuerpos anti-PD-L1

45 Los ratones implantados con un tumor canceroso se tratan *vivo* con anticuerpos anti-PD-L1 para examinar el efecto *vivo* de los anticuerpos en crecimiento tumoral. Para los estudios tumoral, los ratones AJ hembra entre 6-8 semanas de edad (Harlan Laboratorios) se aleatorizan al pesar en 6 grupos. Los ratones se implantan de manera subcutánea en el flanco derecho con 2×10^6 SA1/N células de fibrosarcoma disueltas en 200 μ l de medio DMEM el día 0. Los ratones se tratan con vehículo PBS, o anticuerpos anti-PD-L1 a 10 mg/kg. Los animales se dosifican por inyección intraperitoneal con aproximadamente 200 μ l de PBS conteniendo anticuerpo o vehículo los días 1, 4, 8 y 11. Cada grupo contiene 10 animales y los grupos consisten de: (i) un grupo vehicular, (ii) una IgG de ratón de control, y (iii) un anticuerpo anti-PD-L1. Los ratones se monitorean dos veces de manera semanal para crecimiento tumoral por
50 aproximadamente 6 semanas. Utilizando un calibre electrónico, los tumores se miden tridimensionalmente (altura x ancho x longitud) y el volumen tumoral se calcula. Los ratones se eutanizan cuando los tumores alcanzaron un punto final tumoral (1500 mm³) o muestran más de 15 % de pérdida de peso.
55

Ejemplo 13: Eficacia vivo de Terapia de Combinación (Anticuerpos anti-PD-L1 y anti-CTLA-4) en Establecimiento tumoral y Crecimiento

60 Las células de cáncer colorrectal MC38 (disponible de Dr. N. Restito, National Cancer Institute, Bethesda, MD; o Jeffrey Schlom, National Institutes of Health, Bethesda, MD) se implantan en ratones C57BL/6 (2×10^6 células/ratón) y seleccionan para tratamiento cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 100-200 mm³. El día 0 (*es decir*, el primer día de tratamiento), cada uno de cuatro grupos de 10 ratones se inyecta de manera intraperitoneal (IP) con uno de los siguientes: (1) 10 mg/kg IgG de ratón y 10 mg/kg de IgG de rata (control); (2) 10 mg/kg anticuerpo 9D9 monoclonal de anti-CTLA-4 (CTLA-4 anti-ratón de ratón), obtenido de J. Allison, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY) y 10 mg/kg IgG de rata, (3) anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 MIH15 (PD-L1 anti-ratón,
65

eBioscience) y 10 mg/kg IgG de ratón, o (4) 10 mg/kg anticuerpo 9D9 anti-CTLA-4 y 10 mg/kg anticuerpo anti-PD-L1 MIH5. Las inyecciones de anticuerpo se administran además los días 3 y 6 utilizando un calibre electrónico, los tumores se miden tridimensionalmente (altura x ancho x longitud) y el volumen tumoral se calcula. A los ratones se les aplica eutanasia cuando los tumores alcanzaron un punto final tumoral designado. Los resultados se muestran en la Figura 47.

Este estudio indica que, en el modelo tumoral murino MC38, el tratamiento de anticuerpo anti-PD-L1 solo tiene un efecto modesto en crecimiento tumoral resultando en un retraso de crecimiento tumoral mientras anti-CTLA-4 tiene poco efecto en este modelo. Sin embargo, el tratamiento de combinación de anticuerpo CTLA-4 y anticuerpo PD-L1 tuvo un efecto significativamente mayor en el crecimiento tumoral y resulta en ratones libres tumoral.

Ejemplo 14: Inmunohistoquímica Utilizando Anticuerpos Anti-PD-L1

Para valorar los perfiles de enlace de tejido de anti-PD-L1 HuMAb, 12A4, 13G4, 3G10 y 12B7 sin modificar se examinan en un panel de tejidos humanos normales (no neoplásicos), incluyendo bazo, amígdala, cerebro, cerebelo, corazón, hígado, pulmón, riñón, páncreas, pituitaria, piel e intestino delgado, así como también tejidos de carcinoma de pulmón (1 muestra/cada una). Las células ES-2 se utilizan como control positivo, Hu-IgG₁ y Hu-IgG₄ se utilizan como anticuerpos de control de isotipo.

Los tejidos tumorales y normales incrustados con OCT y congelados se compran de Cooperative Human Tissue Network (Filadelfia, PA) o el National Disease Research Institute (Filadelfia, PA). Las secciones del criostato a 5 µm se fijan con acetona por 10 min a temperatura ambiente, y almacenan a -80°C hasta uso. Un procedimiento de inmunohistoquímica desarrollado Medarex se realiza utilizando anti-PD-L1 HuMAb sin modificar por pre-complejo de los anticuerpos primarios (12A4, 13G4, 3G10 y 12B7) y anticuerpo secundario (fragmento Fab conjugado con FITC de anti-Hu-IgG de cabra. Jackson ImmunoResearch Laboratorios, West Grove, PA) antes de aplicar sobre las secciones. Brevemente, 1 µg/ml o 5 µg/ml de los anticuerpos primarios no conjugados se mezclan con exceso de 3 veces el anticuerpo secundario respectivamente y se incuban por 30 min a temperatura ambiente, y después el exceso de globulina gamma humana se agrega por otros 30 min para bloquear el anticuerpo secundario no enlazado. En paralelo, los Hu-IgG₁ o Hu-IgG₄ de anticuerpos de control de isotipo se pre-componen en la misma manera. Los portaobjetos se enjuagan con PBS (Sigma, St. Louis, MO) dos veces, y después se incuban con bloque de peróxido suministrado en Dako EnVision+System (Dako, Carpintería, CA) por 10 minutos. Después de dos enjuagues con PBS, los portaobjetos se incuban con bloque de proteína Dako para bloquear los sitios de unión no específicos. Subsiguientemente, el pre-complejo de anticuerpos primarios o controles de isotipo se aplican sobre secciones e incuban por 1 h. Después de tres enjuagues con PBS, los portaobjetos se incuban con anticuerpo anti-FITC de ratón (20 µg/ml Sigma) por 30 min. Después de otros tres enjuagues con PBS, los portaobjetos se incuban con el polímero IgG anti-ratpin conjugado con peroxidasa suministrado en Dako EnVision+System por 30 min. Finalmente, los portaobjetos se enjuagan como arriba y reaccionan con solución de cromógeno substrato DAB aplicada en Dako EnVision+System por 6 min. Los portaobjetos se enjuagan entonces con agua desionizada, contracolorean con hematoxilina de Mayer (Dako), deshidrata, despeja y cubre con permount (Fischer Científico, Fair Lawn, NJ) siguiendo el procedimiento histológico de rutina.

Se observa la coloración débil a moderada en células ES-2, así como también en células tumorales de tejidos de carcinoma de pulmón. En secciones de la amígdala, la coloración fuerte se observa en epitelio cript que se infiltra de manera pesada por células linfocíticas, pero no en las células epiteliales escamosas estratificadas mucosas. La coloración moderada se observa en algunas células en la región inter-folicular, y la coloración muy débil se observa en células grandes dispersas (células similares a retículo dendrítico) en el centro germinal. En el pulmón, la coloración débil se encuentra en macrófagos de alveolos. Los patrones de coloración en amígdalas y tejidos de pulmón se observan de manera similar en secciones de inmunohistoquímica utilizando mAb anti-PD-L1 comercial (eBiosciences, San Diego, CA). En total hubo menos coloración intensa por los HuMAb, especialmente para la coloración en los centros germinales. En bazo, la inmunoreactividad débil difusa en pulpa roja estuvo ligeramente arriba de la coloración antecedente. Además, coloración débil a moderada se despliega en células como Kupffer en células difusas e hígado en parche de Peyer, así como también en células como macrófagos esparcidas y fibroblastos principalmente en región focal de los externos musculares de intestino delgado.

En cerebelo, cerebro, corazón, riñón, páncreas, pituitaria y tejidos de la piel, sin coloración significativa se observa cuando se colorean con todos los cuatro HuMAbs anti-PD-L1. Ninguna diferencia evidente en coloración se observa entre estos cuatro anticuerpos excepto 12B7 y/o 3G10 desplegaron ligeramente coloración más fuerte en células ES-2 e hígado.

Sumario del Anticuerpo PD-L1

NO. ID DE SEC.	SECUENCIA	NO. ID DE SEC.	SECUENCIA
1	VH a.a 3G10	26	VH CDR1 a.a 1B12

ES 2 546 333 T3

2	VH a.a 12A4	27	VH CDR1 a.a 7H1
3	VH a.a 10A5	28	VH CDR1 a.a 11E6
4	VH a.a 5F8	29	VH CDR1 a.a 12B7
5	VH a.a 10H10	30	VH CDR1 a.a 13G4
6	VH a.a 1B12		
7	VH a.a 7H1	31	VH CDR2 a.a 3G10
8	VH a.a 11E6	32	VH CDR2 a.a 12A4
9	VH a.a 12B7	33	VH CDR2 a.a 10A5
10	VH a.a 13G4	34	VH CDR2 a.a 5F8
		35	VH CDR2 a.a. 10H10
11	VK a.a. 3G10	36	VH CDR2 a.a. 1B12
12	VK a.a. 12A4	37	VH CDR2 a.a. 7H1
13	VK a.a. 10A5	38	VH CDR2 a.a. 11E6
14	VK a.a. 5F8	39	VH CDR2 a.a. 12B7
15	VK a.a. 10H10	40	VH CDR2 a.a. 13G4
16	VK a.a. 1B12		
17	VK a.a. 7H1	41	VH CDR3 a.a. 3G10
18	VK a.a. 11E6	42	VH CDR3 a.a. 12A4
19	VK a.a. 12B7	43	VH CDR3 a.a. 10A5
20	VK a.a. 13G4	44	VH CDR3 a.a. 5F8
		45	VH CDR3 a.a. 10H10
21	VH CDR1 a.a. 3G10	46	VH CDR3 a.a. 1B12
22	VH CDR1 a.a. 12A4	47	VH CDR3 a.a. 7H1
23	VH CDR1 a.a. 10A5	48	VH CDR3 a.a. 11E6
24	VH CDR1 a.a. 5F8	49	VH CDR3 a.a. 12B7
25	VH CDR1 a.a. 10H10	50	VH CDR3 a.a. 13G4
51	VH CDR1 a.a. 3G10	79	VK CDR3 a.a. 12B7
52	VH CDR1 a.a. 12A4	80	VK CDR3 a.a. 13G4
53	VH CDR1 a.a. 10A5		
54	VH CDR1 a.a. 5F8	81	VH n.t. 3G10
55	VH CDR1 a.a. 10H10	82	VH n.t. 12A4
56	VH CDR1 a.a. 1B12	83	VH n.t. 10A5
57	VH CDR1 a.a. 7H1	84	VH n.t. 5F8
58	VH CDR1 a.a. 11E6	85	VH n.t. 10H10
59	VH CDR1 a.a. 12B7	86	VH n.t. 1B12
60	VH CDR1 a.a. 13G4	87	VH n.t. 7H1
		88	VH n.t. 11E6
61	VK CDR2 a.a. 3G10	89	VH n.t. 12B7
62	VK CDR2 a.a. 12A4	90	VH n.t. 13G4
63	VK CDR2 a.a. 10A5		
64	VK CDR2 a.a. 5F8	91	VK n.t. 3G10
65	VK CDR2 a.a. 10H10	92	VK n.t. 12A4
66	VK CDR2 a.a. 1B12	93	VK n.t. 10A5

ES 2 546 333 T3

67	VK CDR2 a.a. 7H1	94	VK n.t. 5F8
68	VK CDR2 a.a. 11E6	95	VK n.t. 10H10
69	VK CDR2 a.a. 12B7	96	VK n.t. 1B12
70	VK CDR2 a.a. 13G4	97	VK n.t. 7H1
		98	VK n.t. 11E6
71	VK CDR3 a.a. 3G10	99	VK n.t. 12B7
72	VK CDR3 a.a. 12A4	100	VK n.t. 13G4
73	VK CDR3 a.a. 10A5		
74	VK CDR3 a.a. 5F8	101	VH 1-18 línea germinal a.a.
75	VK CDR3 a.a. 10H10	102	VH 1-69 línea germinal a.a.
76	VK CDR3 a.a. 1B12	103	VH 1-3 línea germinal a.a.
77	VK CDR3 a.a. 7H1	104	VH 3-9 línea germinal a.a.
78	VK CDR3 a.a. 11E6		
79	VK CDR3 a.a. 12B7		
80	VK CDR3 a.a. 13G4		
105	VK L6 línea germinal a.a.		
106	VK L15 línea germinal a.a.		
107	VK A27 línea germinal a.a.		
108	VK L18 línea germinal a.a.		
109	VK a.a. 11E6a		

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humano aislado o una porción de enlace a antígeno del mismo que se enlazan específicamente a PD-L1, que comprende:
 - (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEC ID nº 22;
 - (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEC ID nº 32;
 - (c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEC ID nº 42;
 - (d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEC ID nº 52;
 - (e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEC ID nº 62
 - y
 - (f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEC ID nº 72.
2. El anticuerpo monoclonal o una porción de enlace a antígeno del mismo de la reivindicación 1, que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos un 80 % con la secuencia definida en la SEC ID Nº 2 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos un 80 % con la secuencia definida en la SEC ID Nº 12.
3. El anticuerpo monoclonal o una porción de enlace a antígeno del mismo de la reivindicación 1, que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEC ID Nº 2 y una región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEC ID Nº 12.
4. El anticuerpo monoclonal o una porción de enlace a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un anticuerpo de un isotipo IgG1, IgG2 o IgG4, o una porción de enlace a antígeno del mismo.
5. El anticuerpo monoclonal o una porción de enlace a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un anticuerpo de un isotipo IgG4, o una porción de enlace a antígeno del mismo.
6. El anticuerpo monoclonal o una porción de enlace a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo monocatenario.
7. El anticuerpo monoclonal o una porción de enlace a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo se enlaza a PD-L1 con una K_d de 5×10^{-9} M o menos.
8. El anticuerpo monoclonal o una porción de enlace a antígeno del mismo de la reivindicación 7, en donde el anticuerpo se enlaza a PD-1 con una K_D de 2×10^{-9} M o menos.
9. El anticuerpo monoclonal o una porción de enlace a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que aumenta:
 - (a) la proliferación de células T en un ensayo de reacción de linfocitos mezclada (MLR);
 - (b) la producción de interferón- γ en un ensayo MLR; y
 - (c) la secreción de IL-2 en un ensayo MLR.
10. El anticuerpo monoclonal o una porción de enlace a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, siendo el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
11. El anticuerpo monoclonal o una porción de enlace a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, siendo el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
12. El anticuerpo monoclonal o una porción de enlace a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, siendo anticuerpo es un anticuerpo humano.
13. Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo monoclonal o una porción de enlace a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores unidos a un agente terapéutico.
14. El inmunoconjugado de la reivindicación 13, en el que el agente terapéutico es una citotoxina o un isótopo radioactivo.

- 5 15. Una molécula biespecífica que comprende el anticuerpo monoclonal o una porción de enlace a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 unidas a un segundo resto funcional que tiene una especificidad de enlace diferente que dichos anticuerpo o porción de enlace a antígeno del mismo.
16. Una composición que comprende (a) el anticuerpo monoclonal o una porción de enlace a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, (b) el inmunoconjugado de las reivindicaciones 13 o 14 o (c) la molécula biespecífica de la reivindicación 15 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 17. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo monoclonal o una porción de enlace a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
18. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 17.
- 15 19. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la reivindicación 18.
20. Un ratón transgénico que comprende transgenes de cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina humana, en donde el ratón expresa el anticuerpo monoclonal o una porción de enlace a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
- 20 21. Un hibridoma preparado del ratón de la reivindicación 20, en donde el hibridoma produce dichos anticuerpo o porción de enlace a antígeno del mismo.
- 25 22. El anticuerpo monoclonal o una porción de enlace a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para utilizarse en un método para modular una respuesta inmune en un sujeto.
23. El anticuerpo monoclonal o una porción de enlace a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para utilizarse en un método para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto.
- 30 24. El anticuerpo monoclonal o una porción de enlace a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para utilizarse de acuerdo con la reivindicación 23, en donde las células tumorales son células de un cáncer seleccionado entre melanoma, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer ovárico y cáncer de pulmón.
- 35 25. El anticuerpo monoclonal o una porción de enlace a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para utilizarse de acuerdo con la reivindicación 23, en donde las células tumorales son de un cáncer seleccionado de cáncer óseo, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de la cabeza o el cuello, melanoma maligno intraocular o cutáneo, cáncer uterino, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer estomacal, cáncer testicular, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello del útero, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de la uretra, cáncer del pene, leucemias crónica o aguda incluyendo leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o del uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasia del sistema nervioso central (SNC), linfoma del SNC primario, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma pituitario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de célula escamosa, linfoma de células T, cánceres inducidos por el medio ambiente, incluyendo aquellos inducidos por amianto, y combinaciones de dichos cánceres.
- 40 26. El anticuerpo monoclonal o una porción de enlace a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para utilizarse en un método para tratar una enfermedad infecciosa en un sujeto.
- 45 27. El anticuerpo monoclonal o una porción de enlace a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para utilizarse de acuerdo con la reivindicación 26, en donde la enfermedad infecciosa es:
- 50 (a) una enfermedad seleccionada entre gripe, herpes, giardia, malaria y leishmania;
- 55 (b) una infección patogénica por un virus seleccionado entre el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis, virus del herpes, adenovirus, virus de la gripe, flavivirus, ecovirus, rinovirus, virus Coxsackie, cornovirus, virus sincitial respiratorio, virus de paperas, rotavirus, virus de sarampión, virus de rubéola, parvovirus, virus vaccinia, virus HTLV, virus del dengue, virus de papiloma, virus molluscum, poliovirus, virus de rabia, virus JC y virus de encefalitis arboviral;
- 60 (c) una infección patogénica por bacterias seleccionadas entre clamidia, bacteria rickettsia, micobacteria, estafilococos, estreptococos, neumococos, meningococos y conococos, klebsiella, proteus, serratia, pseudomonas, legionella, difteria, salmonella, bacilo, cólera, tétanos, botulismo, ántrax, peste, leptospirosis y bacteria de enfermedad de Lyme,
- 65 (d) una infección patogénica por hongos seleccionada entre Candida, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus*,

género Mucorales , *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*; o

- 5 (e) una infección patogénica por parásitos seleccionados entre *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* y *Nippostrongylus brasiliensis*.

28. El anticuerpo monoclonal o una porción de enlace a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para utilizarse de acuerdo con la reivindicación 27, en donde:

10

- (a) el virus de la hepatitis es Hepatitis A, Hepatitis B o Hepatitis C;
(b) el virus del herpes es VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II y CMV, o virus de Epstein Barr;
(c) el hongo *Candida* es *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* o *Candida tropicalis*;
(d) el hongo *Aspergillus* es *Aspergillus fumigatus* o *Aspergillus niger*; y
15 (e) el hongo Mucorales es mucor, absidia o rhizopus.

29. El anticuerpo monoclonal o una porción de enlace a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y un antígeno para utilizarse en un método para potenciar una respuesta inmune frente al antígeno en un sujeto

20

30. El anticuerpo monoclonal o una porción de enlace a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para utilizarse de acuerdo con la reivindicación 29 en el que el antígeno es un antígeno tumoral, un antígeno viral, un antígeno bacteriano o un antígeno de un patógeno.

25

31. El anticuerpo monoclonal o una porción de enlace a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para utilizarse en un método para tratar o prevenir una enfermedad inflamatoria en un sujeto.

30

32. El anticuerpo monoclonal o una porción de enlace a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para utilizarse de acuerdo con la reivindicación 31, en donde la enfermedad inflamatoria es liquen plano (LP).

Anti-PD-L1 3G10 VH

segmento V: 1-18
 segmento D: indeterminado
 segmento J: JH6b

```

1   Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V
    CAG GTT CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG

                                CDR1
                                -----
55  K V S C K A S G Y T F T D Y G F S W
    AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAC ACC TTT ACC GAC TAT GGT TTC AGC TGG

                                CDR2
                                -----
109 V R Q A P G Q G L E W M G W I T A Y
    GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA TGG ATC ACC GCT TAC

                                CDR2
                                -----
163 N G N T N Y A Q K L Q G R V T M T T
    AAT GGT AAC ACA AAC TAT GCA CAG AAG CTC CAG GGC AGA GTC ACC ATG ACC ACA

217 D T S T S T V Y M E L R S L R S D D
    GAC ACA TCC ACG AGC ACA GTC TAC ATG GAG CTG AGG AGC CTG AGA TCT GAC GAC

                                CDR3
                                -----
271 T A V Y Y C A R D Y F Y G M D V W G
    ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAC TAC TTC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC

325 Q G T T V T V S S
    CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

Figura 1a

Anti-PD-L1 3G10 VK

segmento V: L6
 segmento J: JK1

```

      E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
1   GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                -----
      A T L S C R A S Q S V S S Y L V W Y
55  GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GTC TGG TAC

                                CDR2
                                -----
      Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR2
      -----
      A T G I P A R F S G S G S G T D F T
163 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
                                -----
      L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR3
      -----
      R S N W P R T F G Q G T K V E I K
271 CGT AGC AAC TGG CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
    
```

Figura 1b

Anti-PD-L1 12A4 VH

segmento V: 1-69
 segmento D: 3-10
 segmento J: JH6b

```

1   Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V
    CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCG GTG

                                CDR1
                                -----
55  K V S C K T S G D T F S T Y A I S W
    AAG GTC TCC TGC AAG ACT TCT GGA GAC ACC TTC AGC ACC TAT GCT ATC AGC TGG

                                CDR2
                                -----
109 V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I
    GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATC CCT ATA

                                CDR2
                                -----
163 F G K A H Y A Q K F Q G R V T I T A
    TTT GGT AAA GCA CAC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACG ATT ACC GCG

217 D E S T S T A Y M E L S S L R S E D
    GAC GAA TCC ACG AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC

                                CDR3
                                -----
271 T A V Y F C A R K F H F V S G S P F
    ACG GCC GTG TAT TTT TGT GCG AGA AAG TTT CAC TTT GTT TCG GGG AGC CCC TTC

                                CDR3
                                -----
325 G M D V W G Q G T T V T V S S
    GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

Figura 2a

Anti-PD-L1 12A4 VK

segmento V: L6
 segmento J: JK1

```

1   E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
    GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                -----
55  A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
    GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                CDR2
                                -----
109 Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
    CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

    CDR2
    -----
163 A T G I P A R F S G S G S G T D F T
    GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
                                -----
217 L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
    CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

    CDR3
    -----
271 R S N W P T F G Q G T X V E I K
    CGT AGC AAC TGG CCG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
    
```

Figura 2b

Anti-PD-L1 10A5 VH

segmento V: 1-3
 segmento D: 5-5
 segmento J: JH4b

```

      Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V
1  CAG GTC CAA CTT GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG

                                CDR1
                                -----
      K V S C K A S G Y T F T S Y D V H W
55 AAG GTT TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACC TTC ACT AGC TAT GAT GTA CAT TGG

                                CDR2
                                -----
      V R Q A P G Q R L E W M G W L H A D
109 GTG CGC CAG GCC CCC GGA CAA AGG CTT GAG TGG ATG GGA TGG CTC CAC GCT GAC

                                CDR2
                                -----
      T G I T K F S Q K F Q G R V T I T R
163 ACT GGT ATC ACA AAA TTT TCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACC ATT ACC AGG

      D T S A S T A Y M E L S S L R S E D
217 GAC ACA TCC GCG AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAA GAC

                                CDR3
                                -----
      T A V Y Y C A R E R I Q L W F D Y W
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGG GAG AGG ATA CAG CTA TGG TTT GAC TAC TGG

      G Q G T L V T V S S
325 GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

Figura 3a

Anti-PD-L1 10A5 VK

segmento V: L15
 segmento J: JK2

```

        D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
    1 GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
        -----
        V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y
    55 GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
        -----
        Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
    109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

        CDR2
        -----
        Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
    163 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
        -----
        L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
    217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

        CDR3
        -----
        Y N S Y P Y T F G Q G T K L E I K
    271 TAT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA
    
```

Figura 3b

Anti-PD-L1 5F8 VH

segmento V: 1-69
 segmento D: 6-13
 segmento J: JH4b

```

1      Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V
      CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCG GTG

                                CDR1
                                -----
55     K V S C K V S G G I F S T Y A I N W
      AAG GTC TCC TGC AAG GTT TCT GGA GGC ATC TTC AGC ACC TAT GCT ATC AAC TGG

                                CDR2
                                -----
109    V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I
      GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATC CCT ATC

                                CDR2
                                -----
163    F G T A N H A Q K F Q G R V T I T A
      TTT GGT ACA GCA AAC CAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACG ATT ACC GCG

217    D E S T S T A Y M E L S S L R S E D
      GAC GAA TCC ACG AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC

                                CDR3
                                -----
271    T A V Y Y C A R D Q G I A A A L F D
      ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT CAG GGT ATA GCA GCA GCC CTT TTT GAC

                                CDR3
                                -----
325    Y W G Q G T L V T V S S
      TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

Figura 4a

Anti-PD-L1 5F8 VK1

segmento V: A27
 segmento J: JK1

```

1      E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
      GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                -----
55     A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
      GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

                                CDR2
                                -----
109    Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
      TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

      CDR2
      -----
163    R A T G I P D R F S G S G S G T D F
      AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                CDR3
                                -----
217    T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
      ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

      CDR3
      -----
271    Q Y G S S P W T F G Q G T K V E I K
      CAG TAT GGT AGC TCA CCG TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
    
```

Figura 4b

Anti-PD-L1 10H10 VH

segmento V: 3-9
 segmento D: 4-17
 segmento J: JH4b

```

1      E V Q L V E S G G G L V Q P G R S L
      GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGC AGG TCC CTG

                                CDR1
                                -----
55     R L S C A V S G F T F D D Y V V H W
      AGA CTC TCC TGT GCA GTC TCT GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT GTC GTG CAC TGG

                                CDR2
                                -----
109    V R Q A P G K G L E W V S G I S G N
      GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC TCA GGT ATT AGT GGG AAT

                                CDR2
                                -----
163    S G N I G Y A D S V K G R F T I S R
      AGT GGT AAC ATA GGC TAT GCG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

217    D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D
      GAC AAC GCC AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT CTG AGA GCT GAG GAC

                                CDR3
                                -----
271    T A L Y Y C A V P F D Y W G Q G T L
      ACG GCC TTG TAT TAC TGT GCG GTC CCC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG

325    V T V S S
      GTC ACC GTC TCC TCA
    
```


Anti-PD-L1 10H10 VK

segmento V: L15
 segmento J: JK2

```

1      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
      GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

      CDR1
      -----
55     V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y
      GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

      CDR2
      -----
109    Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
      CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

      CDR2
      -----
163    Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
      CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

      CDR3
      -----
217    L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
      CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

      CDR3
      -----
271    Y N S Y P Y T F G Q G G T K L E I K
      TAT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA
    
```

Figura 5b

Anti-PD-L1 1B12 VH

segmento V: 1-69
 segmento D: 3-10
 segmento J: JH6b

```

1      Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V
      CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCG GTG

                                CDR1
                                -----
55     K V S C K T S G D T F S S Y A I S W
      AAG GTC TCC TGC AAG ACT TCT GGA GAC ACC TTC AGC AGC TAT GCT ATC AGC TGG

                                CDR2
                                -----
109    V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I
      GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATC CCT ATC

                                CDR2
                                -----
163    F G R A H Y A Q K F Q G R V T I T A
      TTT GGT AGA GCA CAC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACG ATT ACC GCG

217    D E S T S T A Y M E L S S L R S E D
      GAC GAA TCC ACG AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC

                                CDR3
                                -----
271    T A V Y F C A R K F H F V S G S P F
      ACG GCC GTG TAT TTT TGT GCG AGA AAG TTT CAC TTT GTT TCG GGG AGC CCC TTC

                                CDR3
                                -----
325    G M D V W G Q G T T V T V S S
      GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

Figura 6a

Anti-PD-L1 1B12 VK

segmento V: L6
segmento J: JK1

```

1      E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
      GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                -----
55     A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
      GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                CDR2
                                -----
109    Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
      CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR2
      -----
163    A T G I P A R F S G S G S G T D F T
      GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
                                -----
217    L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
      CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR3
      -----
271    R S N W P T F G Q G T K V E I K
      CGT AGC AAC TGG CCG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
  
```

Figura 6b

Anti-PD-L1 7H1 VH

segmento V: 1-69
 segmento D: 3-10
 segmento J: JH6b

```

1      Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V
      CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCG GTG

                                CDR1
                                -----
55     K V S C K T S G G T F S S Y A I S W
      AAG GTC TCC TGC AAG ACT TCT GGA GGC ACC TTC AGC AGC TAT GCT ATC AGC TGG

                                CDR2
                                -----
109    V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I
      GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATC CCT ATC

                                CDR2
                                -----
163    F G K A H Y A Q K F Q G R V T I T A
      TTT GGT AAA GCA CAC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACG ATT ACC GCG

217    D E S T T T A Y M E L S S L R S E D
      GAC GAA TCC ACG ACC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC

                                CDR3
                                -----
271    T A V Y Y C A R K Y D Y V S G S P F
      ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA AAG TAT GAC TAT GTT TCG GGG AGC CCC TTC

                                CDR3
                                -----
325    G M D V W G Q G T T V T V S S
      GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

Figura 7a

Anti-PD-L1 7H1 VK

segmento V: L6
 segmento J: JK1

```

1      E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
      GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
-----
55     A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
      GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                CDR2
-----
109    Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
      CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR2
-----
163    A T G I P A R F S G S G S G T D F T
      GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
-----
217    L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
      CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR3
-----
271    R S N W P T F G Q G T K V E I K
      CGT AGC AAC TGG CCG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
    
```

Figura 7b

Anti-PD-L1 11E6 VH

segmento V: 1-69
 segmento D: 6-19
 segmento J: JH6c

```

1      Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V
      CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCG GTG

                                CDR1
                                -----
55     K V S C K A S G G T F S S Y A I N W
      AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGA GGC ACC TTC AGC AGC TAT GCT ATC AAC TGG

                                CDR2
                                -----
109    V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I
      GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATC CCT ATC

                                CDR2
                                -----
163    F G S A N Y A Q K F Q D R V T I T A
      TTT GGT TCA GCA AAC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GAC AGA GTC ACG ATT ACC GCG

217    D E S T S A A Y M E L S S L R S E D
      GAC GAA TCC ACG AGC GCA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC

                                CDR3
                                -----
271    T A V Y Y C A R D S S G W S R Y Y M
      ACG GCC GTA TAT TAC TGT GCG AGA GAC AGC AGT GGC TGG TCT CGG TAC TAT ATG

                                CDR3
                                -----
325    D V W G Q G T T V T V S S
      GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

Figura 8a

Anti-PD-L1 11E6 VK1

segmento V: A27
 segmento J: JK4

```

1      E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
      GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                -----
55     A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
      GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

                                CDR2
                                -----
109    Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
      TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

      CDR2
      -----
163    R A T G I P D R F S G S G S G T D F
      AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                CDR3
                                -----
217    T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
      ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

      CDR3
      -----
271    Q Y G S S P F G G G T K V E I K
      CAG TAT GGT AGC TCA CCT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
    
```

Figura 8b

Anti-PD-L1 12B7 VH

segmento V: 1-69
 segmento D: 3-10
 segmento J: JH6b

```

1      Q V Q L V Q S G A E V K E P G S S V
      CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG GAG CCT GGG TCC TCG GTG

                                CDR1
                                -----
55     K V S C K A S G G T F N S Y A I S W
      AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGA GGC ACC TTC AAC AGC TAT GCT ATC AGC TGG

                                CDR2
                                -----
109    V R Q A P G Q G L E W M G G I I P L
      GTG CGA CAG GCQ CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATC CCT CTT

                                CDR2
                                -----
163    F G I A H Y A Q K F Q G R V T I T A
      TTC GGT ATA GCA CAC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACG ATT ACC GCG

217    D E S T N T A Y M D L S S L R S E D
      GAC GAA TCC ACG AAC ACA GCC TAT ATG GAC CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC

                                CDR3
                                -----
271    T A V Y Y C A R K Y S Y V S G S P F
      ACG GCC GTA TAT TAT TGT GCG AGA AAG TAT TCC TAT GTT TCG GGG AGC CCC TTC

                                CDR3
                                -----
325    G M D V W G Q G T T V T V S S
      GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

Figura 9a

Anti-PD-L1 12B7 VK

segmento V: L6
 segmento J: JK5

```

1   E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
    GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                -----
55  A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
    GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                CDR2
                                -----
109 Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
    CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

    CDR2
    -----
163 A T G I P A R F S G S G S G T D F T
    GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
                                -----
217 L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
    CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

    CDR3
    -----
271 R S N W P T F G Q G T R L E I K
    CGT AGC AAC TGG CCC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA
    
```

Figura 9b

Anti-PD-L1 13G4 VH

segmento V: 3-9
 segmento D: 3-9
 segmento J: JH4b

```

1      E V Q L V E S G G G L V Q P G R S L
      GAA GTG CAG TTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGC AGG TCC CTG

                                CDR1
                                -----
55     R L S C A A S G I T F D D Y G M H W
      AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA ATC ACC TTT GAT GAT TAT GGC ATG CAC TGG

                                CDR2
                                -----
109    V R Q A P G K G L E W V S G I S W N
      GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC TCA GGT ATT AGC TGG AAT

                                CDR2
                                -----
163    R G R I E Y A D S V K G R F T I S R
      AGA GGT AGA ATA GAG TAT GCG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

217    D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D
      GAC AAC GCC AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT CTG AGA GCT GAG GAC

                                CDR3
                                -----
271    T A L Y Y C A K G R F R Y F D W F L
      ACG GCC TTG TAT TAC TGT GCA AAA GGG CGG TTC CGA TAT TTT GAC TGG TTT CTT

                                CDR3
                                -----
325    D Y W G Q G T L V T V S S
      GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

Figura 10a

Anti-PD-L1 13G4 VK

segmento V: L18
 segmento J: JK3

```

1      A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R
      GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
                                -----
55     V T I T C R A S Q G I S S A L A W Y
      GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                -----
109    Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L
      CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG

      CDR2
      -----
163    E S G V P S R F S G S G S G T D F T
      GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                -----
217    L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
      CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG

      CDR3
      -----
271    F N S Y P F T F G P G T K V D I K
      TTT AAT AGT TAC CCA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA
    
```

Figura 10b

Región VH anti-PD-L1 3G10

línea germinal 1-18: Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T S ^{CDR1} Y G I S W V R Q
 3G10 VH: - - - - - D - - - - - F - - - - -

línea germinal 1-18: A P G Q G L E W M G W I S A Y N G N T N Y A Q K L Q G R V T M T T D T S T S T
 3G10 VH: - - - - - T -

línea germinal 1-18: A Y M E L R S L R S D D T A V Y Y C A R ^{CDR3} - - - - -
 3G10 VH: V - - - - - D Y F Y G M D V W G Q G T T V T V S S
 (JH6b)

Figura 11

Región VH anti-PD-L1 12A4

línea germinal 1-69: Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A
 12A4 VH: - T

línea germinal 1-69: S G G T F S S Y A I S W V R Q A P G Q G L E W M
 12A4 VH: - - D - - T -
 CDR1

línea germinal 1-69: G G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G R V T I T A
 12A4 VH: - - - - - - - - - - K - H - - - - - - - - - - - - - - -
 CDR2

línea germinal 1-69: D E S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C
 12A4 VH: - F

línea germinal 1-69: A R
 línea germinal JH6b: Y G M D V W G Q G T T V T
 12A4 VH: - - K F H F V S G S P F - - - - - - - - - - - - - - -
 CDR3

línea germinal JH6b: V S S
 12A4 VH: - - -

Figura 12

Región VH anti-PD-L1 10A5

línea germinal 1-3: Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T S Y A M H W
 10A5 VH CDR1
-----D V - -

línea germinal 1-3: V R Q A P G Q R L E W M G W I N A G N G N T K Y S Q K F Q G R V T I T R
 10A5 VH CDR2
-----F - - - -

línea germinal 1-3: D T S A S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R CDR3

 línea germinal JH4b: F D Y W
 10A5 VH -----E R I Q L W - - - -

línea germinal JH4b: G Q G T L V T V S S
 10A5 VH ----- (JH4b)

Figura 13

Región VH anti-PD-L1 10A5

línea germinal 1-69 Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S S Y A I S W
 5F8 VH - - - - - CDR1 - - - - - T - - - - - N -

línea germinal 1-3: V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G R V T I T A
 5F8 VH - - - - - CDR2 - - - - - H - - - - -

línea germinal 1-69 D E S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R
 línea germinal JH4b - - - - - CDR3 - - - - -
 5F8 VH - - - - - D Q G I A A A L - -

línea germinal JH4b Y W G Q G T L V T V S S
 5F8 VH - - - - - (JH4b)

Figura 14

Región VH anti-PD-L1 10H10

línea germinal 3-9 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDYAMHWVR
10H10 VH ^{CDR1} V V - - -

línea germinal 1-3: QAPGKGLEWVSGISWNSSIGYADSVKGRFTISRDNK
10H10 VH ^{CDR2} G - - - N - - -

línea germinal 3-9 NSLYLQMNSLR A E D T A L Y Y C A ^{CDR3}
línea germinal JH4b F D Y W G Q G T L V T V S S
10H10 VH V P - - -
(JH4b)

Figura 15

Región VH anti-PD-L1 1B12

línea germinal 1-69 Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S S Y A I S W
 1B12 VH -----^{CDR1}-----D-----

línea germinal 1-69 V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G R V T I T A
 1B12 VH -----^{CDR2}-----R-----H-----

línea germinal 1-69 D E S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R
 línea germinal JH6b -----^{CDR3}-----Y
 1B12 VH -----F-----K F H F V S G S P F

línea germinal JH6b G M D V W G Q G T V T V S S
 1B12 VH -----^(JH6b)-----

Figura 16

Región VH anti-PD-L1 7H1

línea germinal 1-69 Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S S Y A I S W
 7H1 VH -----T-----^{CDR1}-----

línea germinal 1-69 V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G R V T I T A
 7H1 VH -----K-----^{CDR2}-----

línea germinal 1-69 D E S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R -----^{CDR3}-----
 línea germinal JH6b -----K Y D Y V S G S P F
 7H1 VH -----T-----Y

línea germinal JH6b G M D V W G Q G T T V T V S S ----- (JH6b)
 7H1 VH -----

Figura 17

Región VH anti-PD-L1 11E6

línea germinal 1-69 Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S S Y A I S W
 11E6 VH CDR1

línea germinal 1-69 V R Q A P G Q G L E W M G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G R V T I T A
 11E6 VH CDR2

línea germinal 1-69 D E S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R CDR3
 línea germinal JH6c
 11E6 VH Y Y M

línea germinal JH6c D V W G Q G T T V T V S S
 11E6 VH (JH6c)

Figura 18

Región VH anti-PD-L1 12B7

línea germinal 1-69 Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S S Y A I S W
 12B7 VH -----E-----N-----^{CDR1}

línea germinal 1-69 V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G R V T I T A
 12B7 VH -----L--I--H-----^{CDR2}

línea germinal 1-69 D E S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R -----^{CDR3}
 línea germinal JH6b -----K Y S Y V S G S P F
 12B7 VH -----D-----Y

línea germinal JH6b G M D V W G Q G T T V T V S S -----
 12B7 VH ----- (JH6b)

Figura 19

Región VH anti-PD-L1 13G4

línea germinal 3-9 E V Q L V E S G G G L V Q P G R S L R L S C A A S G F T F D D Y A M H W
13G4 VH CDR1 I - - - - - G - - -

línea germinal 3-9 V R Q A P G K G L E W V S G I S W N S G S I G Y A D S V K G R F T I S R
13G4 VH CDR2 R - R - E - - - - -

línea germinal 3-9 D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A L Y Y C A K
13G4 VH CDR3 - - - - - G R F R Y F D W F L

línea germinal JH4b D Y W G Q G T L V T V S S
13G4 VH (JH4b) - - - - -

Figura 20

Región VH anti-PD-L1 3G10

línea germinal L6: E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A
 3G10 VK#1: - - - - - CDR1 - - - - -

línea germinal L6: W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G S G
 3G10 VK#1: - - - - - CDR2 - - - - -

L6 germline: T D F T L T I S S L E P E D F A V Y C Q Q R S N W P
 línea germinal JK1: - - - - - CDR3 - - - - - W T F G Q G T
 3G10 VK#1: - - - - - R - - - - -

línea germinal JK1: K V E I K
 3G10 VK#1: - - - - - (JK1)

Figura 21

Región VK PD-L1 12A4

línea germinal L6: E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
 12A4 VK: - - - - - CDR1 - - - - -

línea germinal L6: Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G S G T D F T
 12A4 VK: - - - - - CDR2 - - - - -

línea germinal L6: L T I S S L E P E D F A V Y C Q Q R S N W P
 línea germinal JK1: - - - - - CDR3 - - - - -
 12A4 VK: - - - - - T F G Q G T K V E I K - - - - -

Figura 22

Región VK anti-PD-L1 10A5

línea germinal L15: D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S
 10A5 VK CDR1

línea germinal L15: W L A W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L Q S G V P S R F
 10A5 VK CDR2

línea germinal L15: S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N S
 10A5 VK CDR3

línea germinal L15 Y P
 línea germinal JK2 Y T F G Q G T K L E I K
 10A5 VK (JK2)

Figura 23

Región VK1 anti-PD-L1 5F8

línea germinal A27 E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
5F8 VK1 - - - - - ^{CDR1} - - - - -

línea germinal A27 Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P D R F S G S G S G T D F
5F8 VK1 - - - - - ^{CDR2} - - - - -

línea germinal A27 T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Y G S S P
línea germinal JK1 - - - - - ^{CDR3} - - - - - W T F G Q G T K V E I K
5F8 VK1 - - - - -
(JK1)

Figura 24

Región VK anti-PD-L1 10H10

línea germinal L15 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S
10H10 VK CDR1

línea germinal L15 W L A W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L Q S G V P S R F
10H10 VK CDR2

línea germinal L15 S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N S
10H10 VK CDR3

línea germinal L15 Y P
línea germinal JK2 Y T F G Q G T K L E I K (JK2)
10H10 VK

Figura 25

Región VK anti-PD-L1 1B12

línea germinal L6
1B12 VK
 E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S
 CDR1

línea germinal L6
1B12 VK
 Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F
 CDR2

línea germinal L6
1B12 VK
 S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y C Q Q R S N
 CDR3

línea germinal L6
 línea germinal JK1
1B12 VK
 W P T F G Q G T K V E I K (JK1)

Figura 26

Región VK anti-PD-L1 7H1

línea germinal L6
7H1 VK

E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S

CDR1

línea germinal L6
7H1 VK

Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F

CDR2

línea germinal L6
7H1 VK

S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N

CDR3

línea germinal L6
línea germinal JK1
7H1 VK

W P T F G Q G T K V E I K (JK1)

Figura 27

Región VK1 anti-PD-L1 11E6

línea germinal A27
11E6 VK1
 E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
 CDR1

línea germinal A27
11E6 VK1
 Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P D R F S G S G S G T D F
 CDR2

línea germinal A27
 línea germinal JK4
11E6 VK1
 T L T I S R L E P E D F A V Y C Q Q Y G S S P
 F G G G T K V E I K
 CDR3
 (JK4)

Figura 28

Región VK2 anti-PD-L1 11E6

línea germinal A27
 11E6 VK2
 E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
CDR1

línea germinal A27
 11E6 VK2
 Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P D R F S G S G S G T D F
CDR2

línea germinal A27
 línea germinal JK4
 11E6 VK2
 T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P
CDR3
 T F G G G T K V E I K
 (JK4)

Figura 29

Región VK anti-PD-L1 12B7

línea germinal L6
12B7 VK
 E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S
 CDR1

línea germinal L6
12B7 VK
 Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F
 CDR2

línea germinal L6
12B7 VK
 S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y C Q Q R S N
 CDR3

línea germinal L6
 W P
 línea germinal JK5
12B7 VK
 T F G Q G T R L E I K (JK5)

Figura 30

Región VK anti-PD-L1 13G4

línea germinal L18
13G4 VK
 A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S
CDR1

línea germinal L18
13G4 VK
 A L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L E S G V P S R F
CDR2

línea germinal L18
13G4 VK
 S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q F N S
CDR3

línea germinal L18
 Y P
 línea germinal JK36
 F T F G P G T K V D I K (JK3)

Figura 31

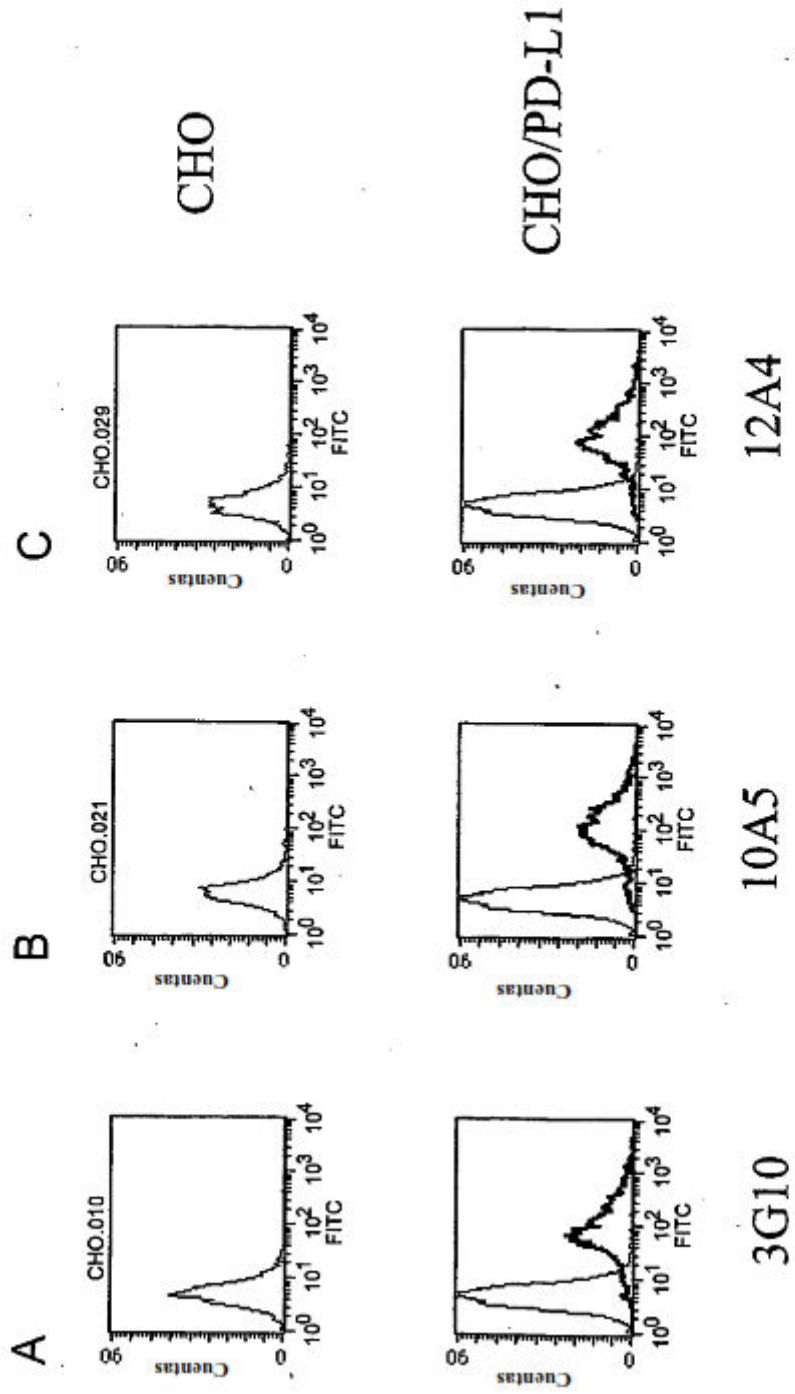


Figura 32

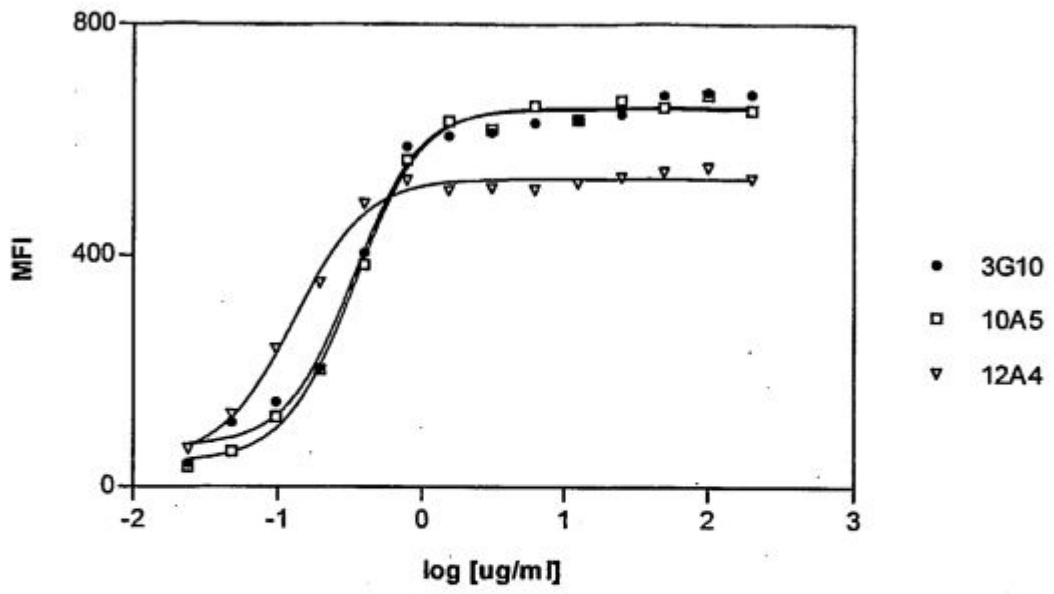


Figura 33

Enlace de los anticuerpos anti PD-L1 HuMab con hPD-L1/Fc (mediante ELISA)

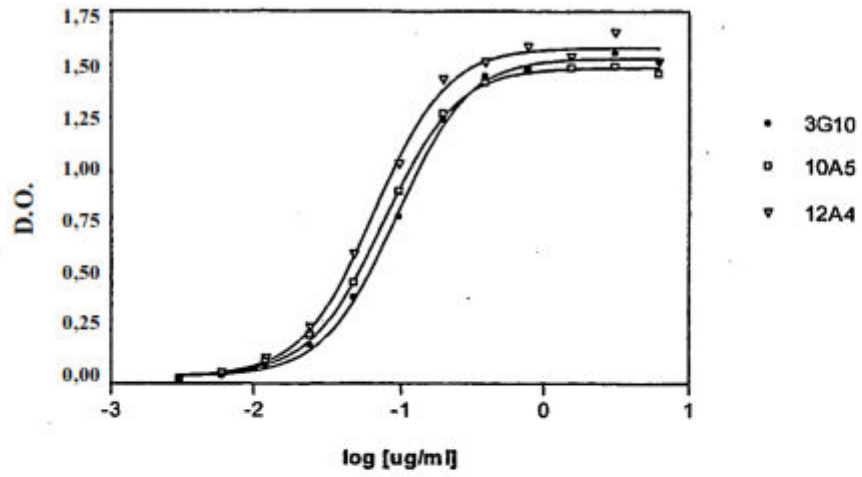


Figura 34

Titulación de HuMab PDL1 en linfocitos CD4+ humanos estimulados

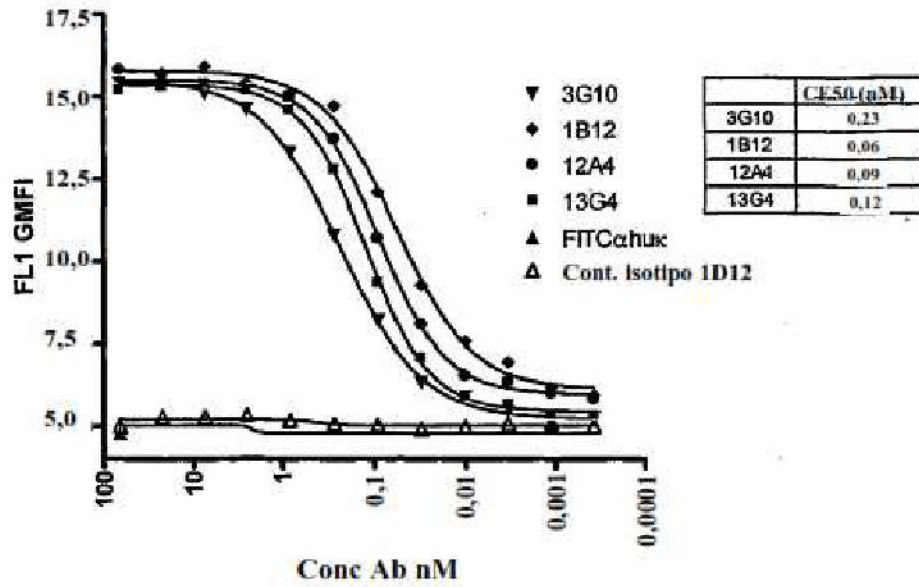


Figura 35

Titulación de HuMab PDL1 en PBMC de macaco activados

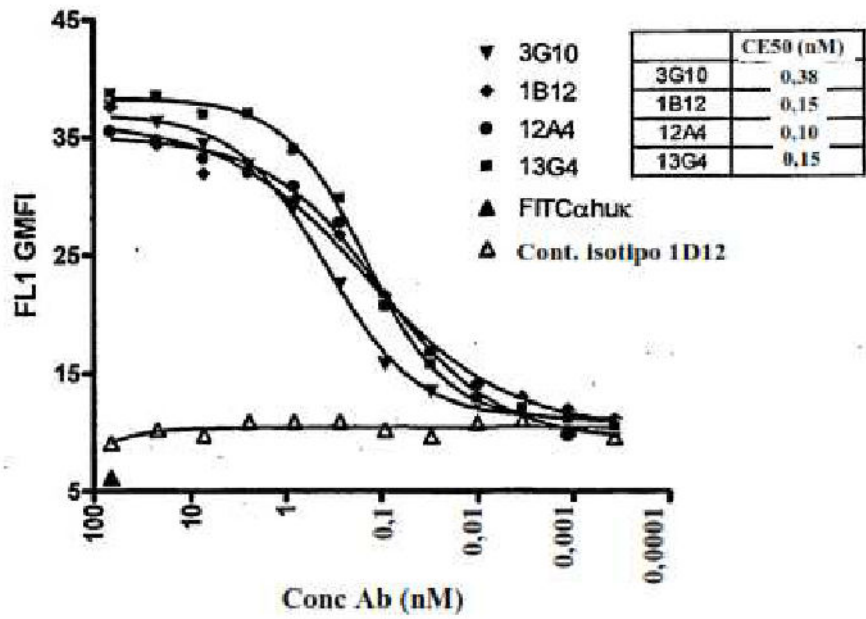


Figura 36

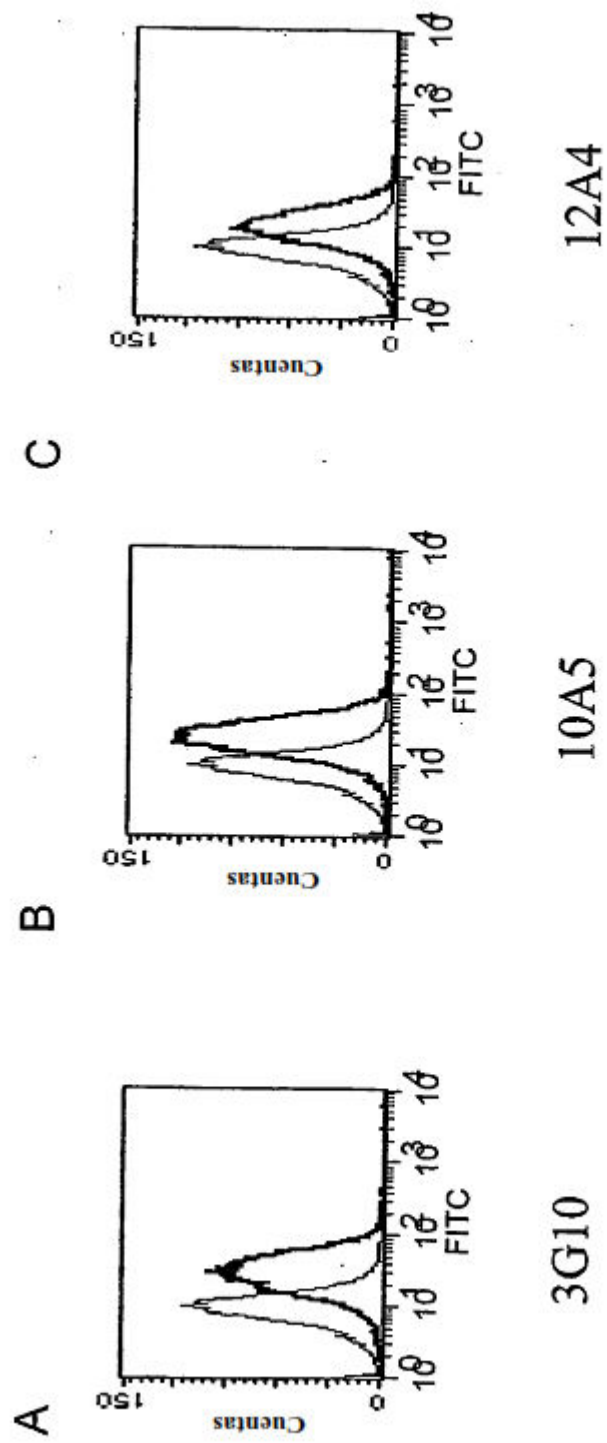


Figura 37

**Titulación de células ES-2 tratadas con IFN γ –
Detección de HuMab α PDL1 anti-Hu Kappa**

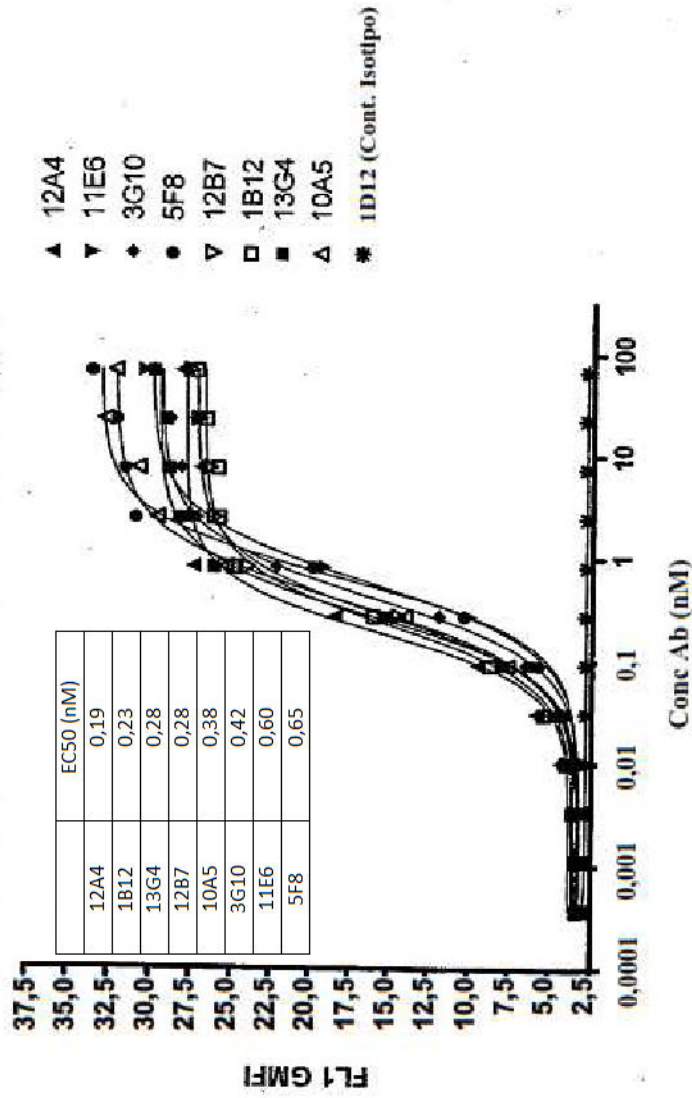


Figura 38

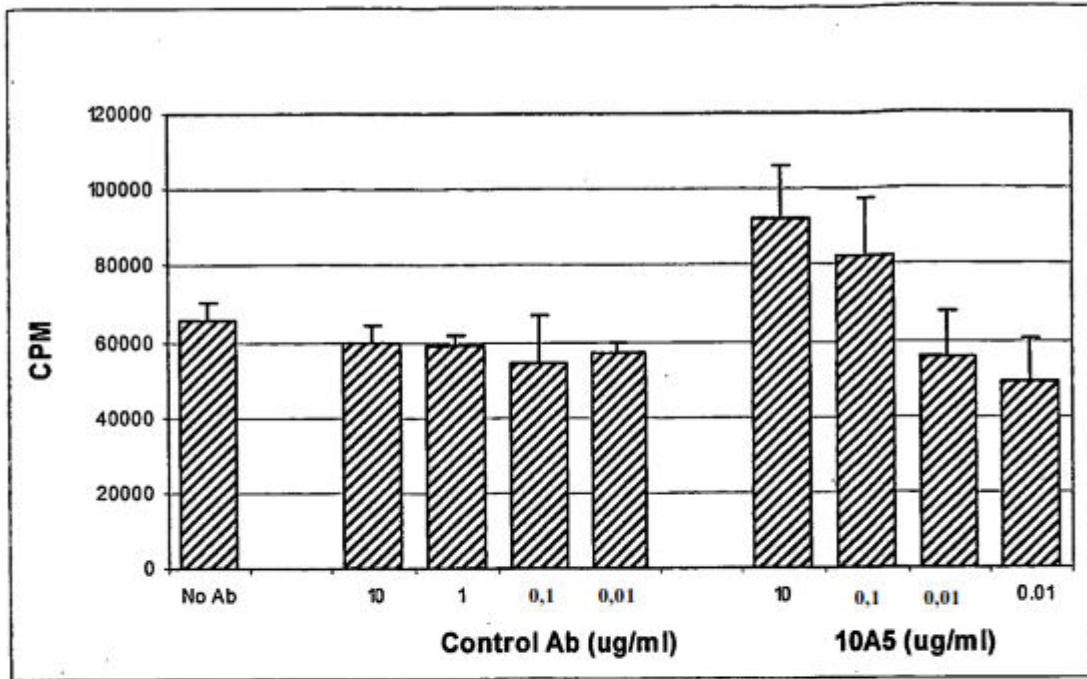


Figura 39A

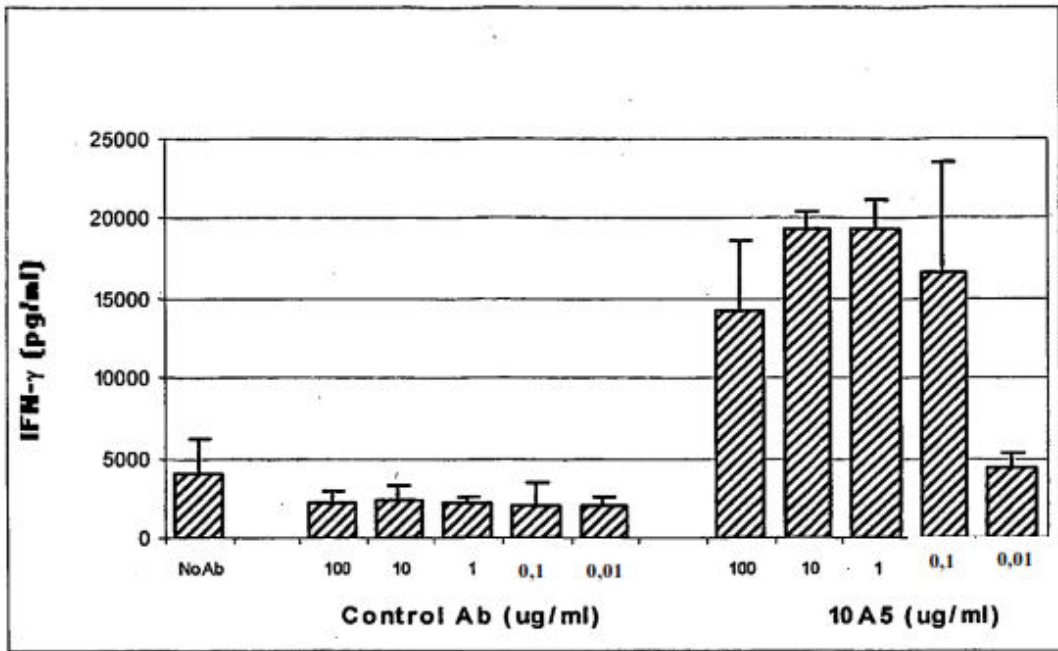


Figura 39B

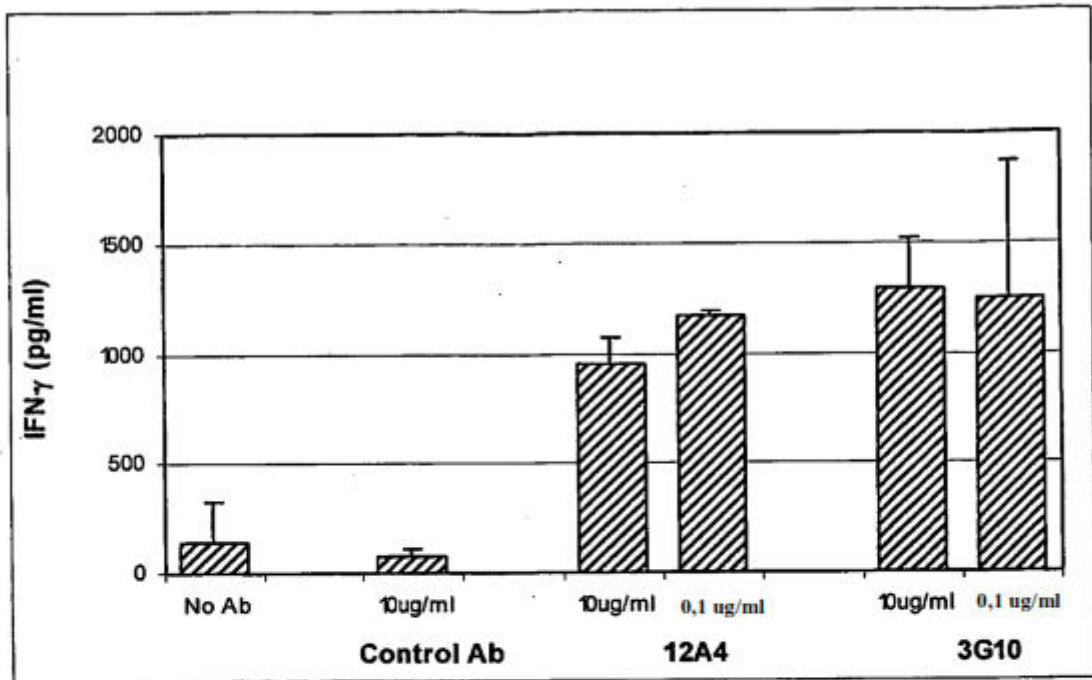


Figura 39C

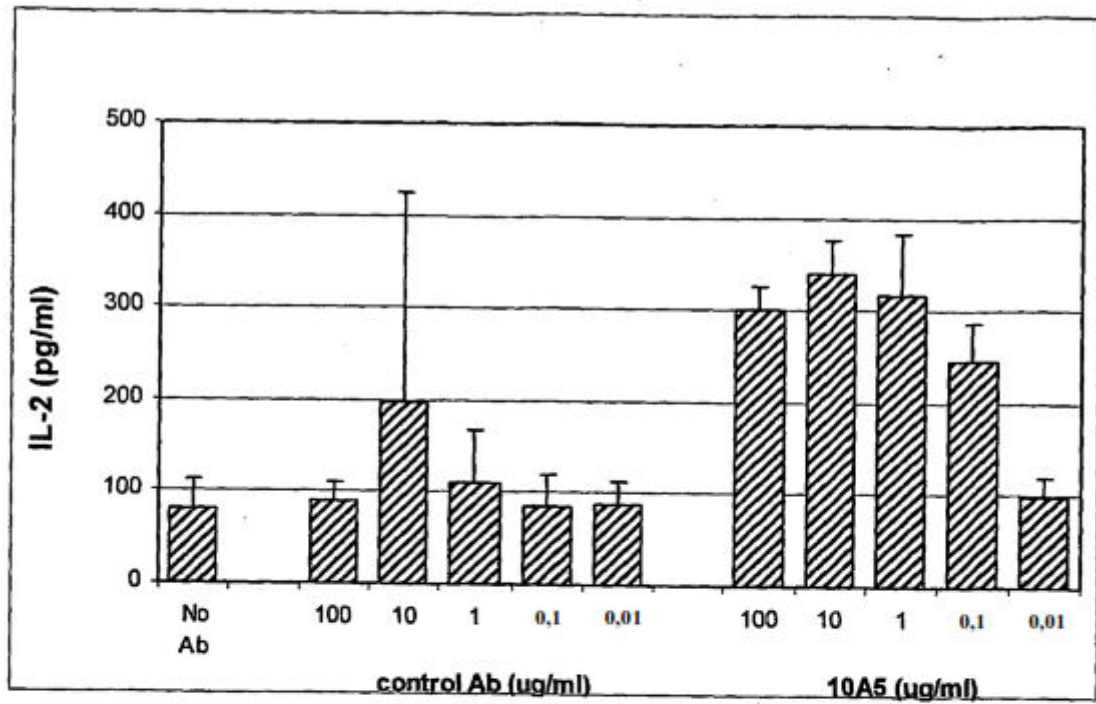


Figura 39D

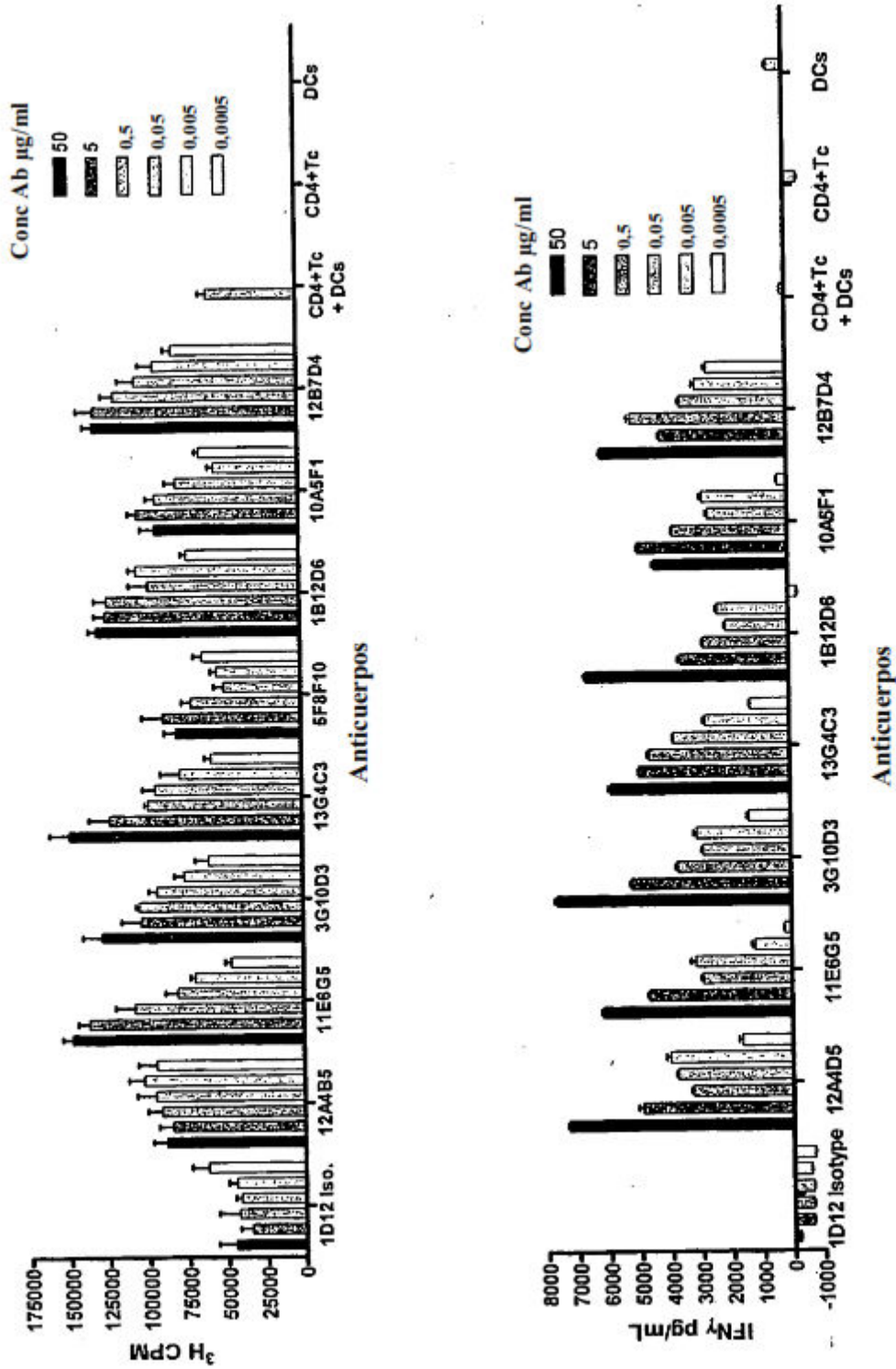


Figura 40

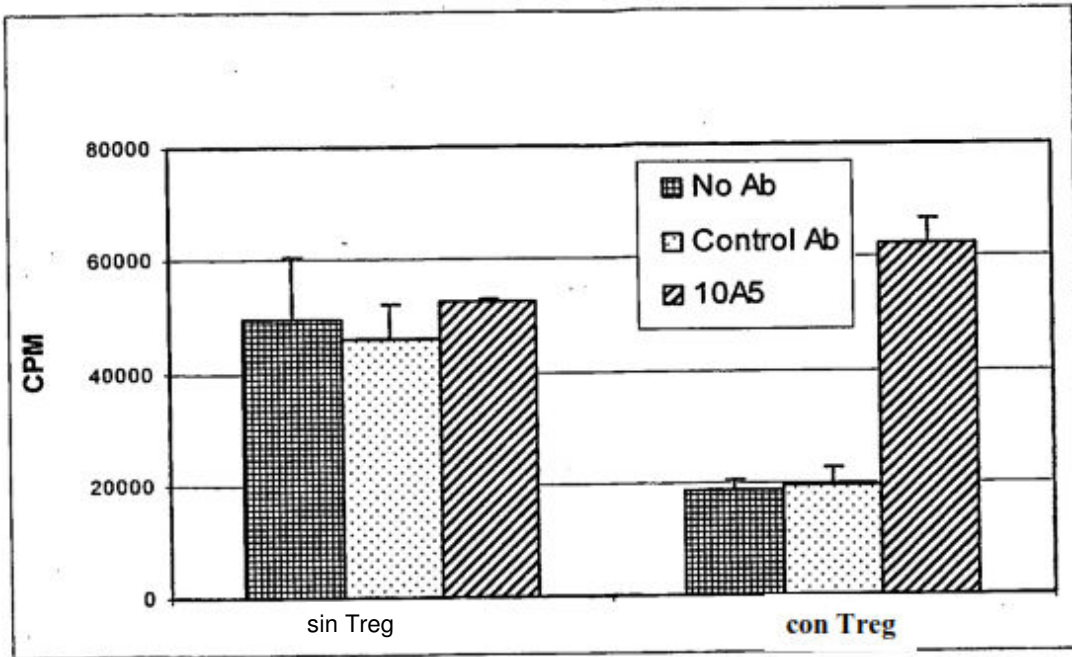


Figura 41A

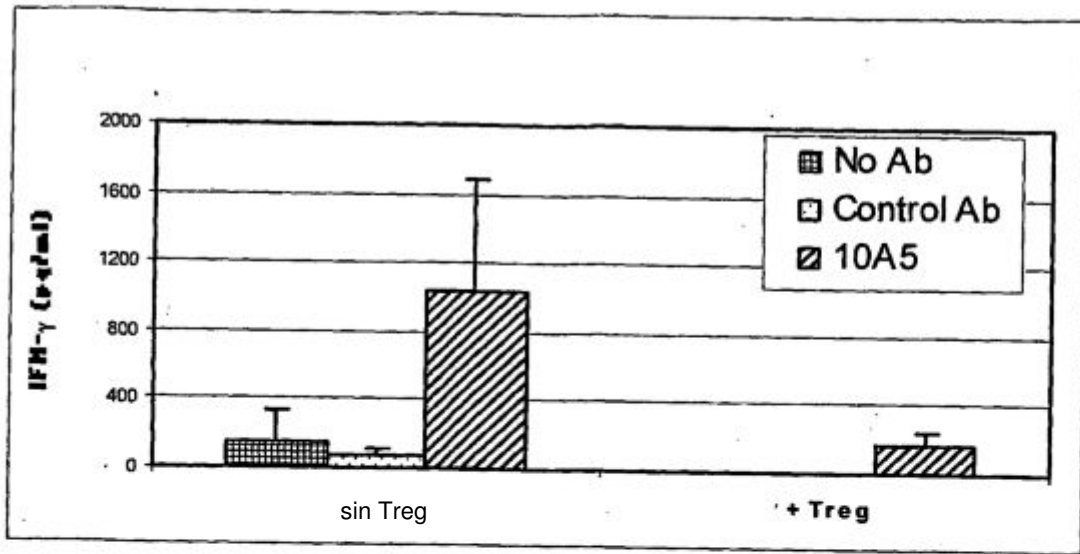


Figura 41B

Respuesta proliferativa en un MLR T/Treg/DC en presencia de anticuerpos anti-PDL1 humanos

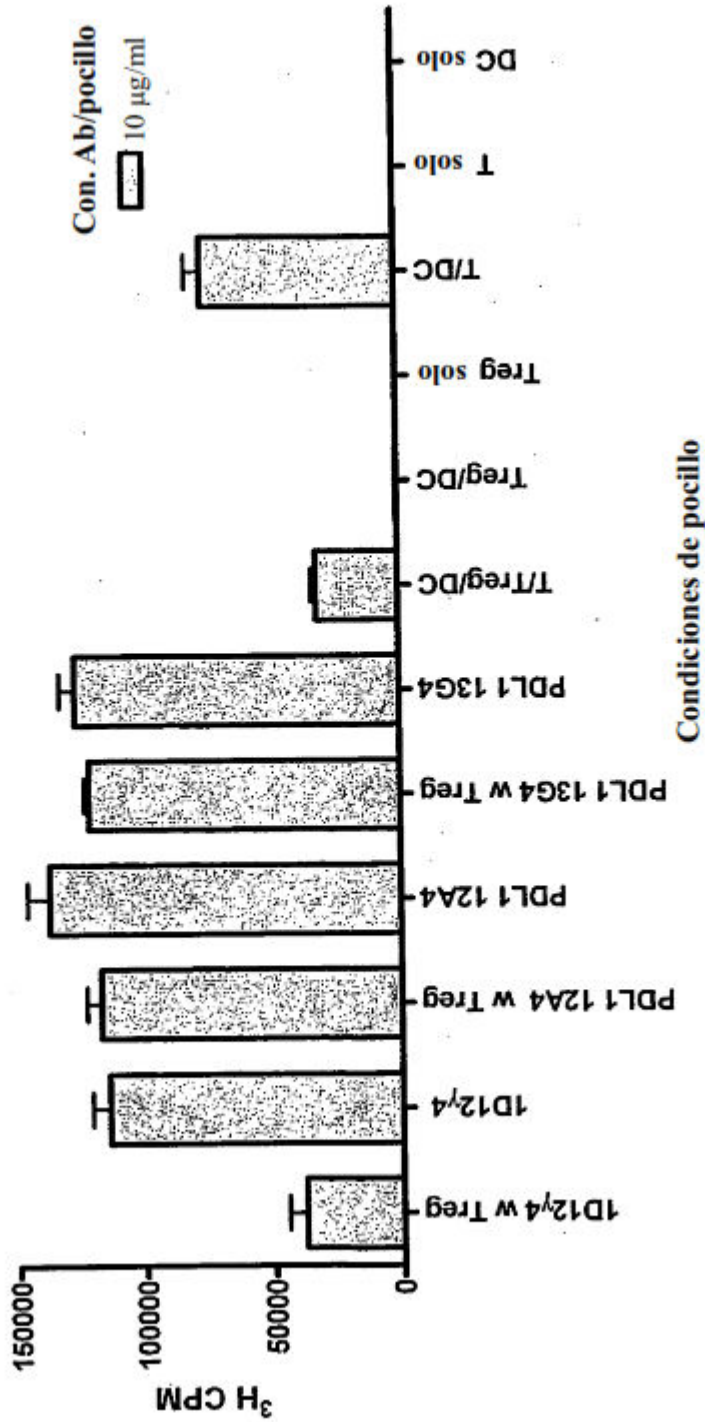


Figura 42

Liberación de IFN-gamma en un MLR T/Treg/DC en presencia de anticuerpos anti-PDL1 humanos

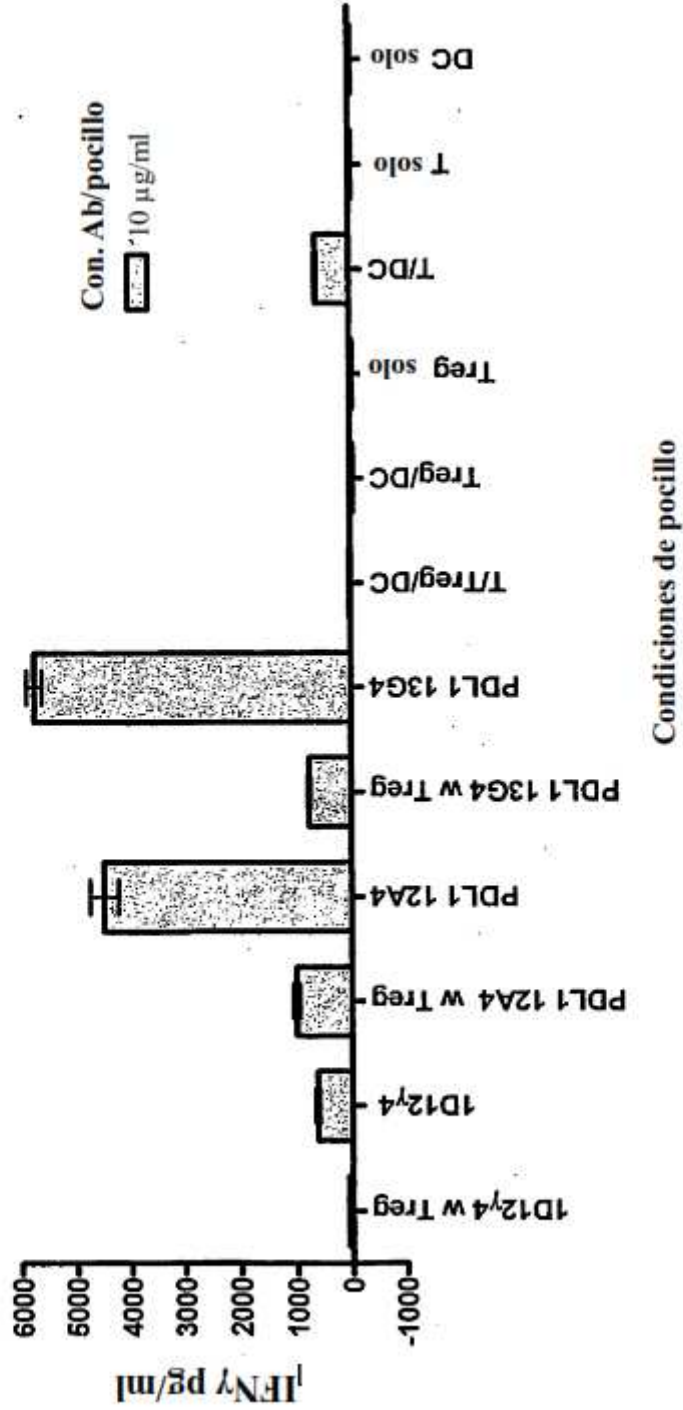


Figura 43

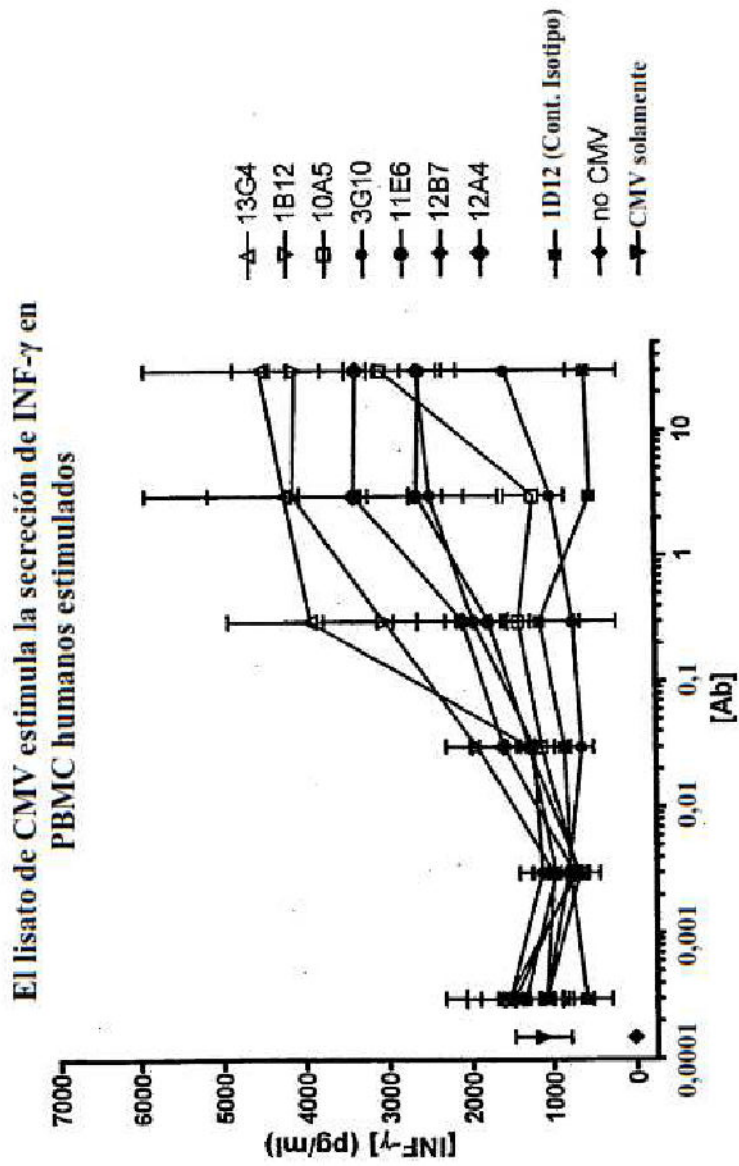


Figura 44

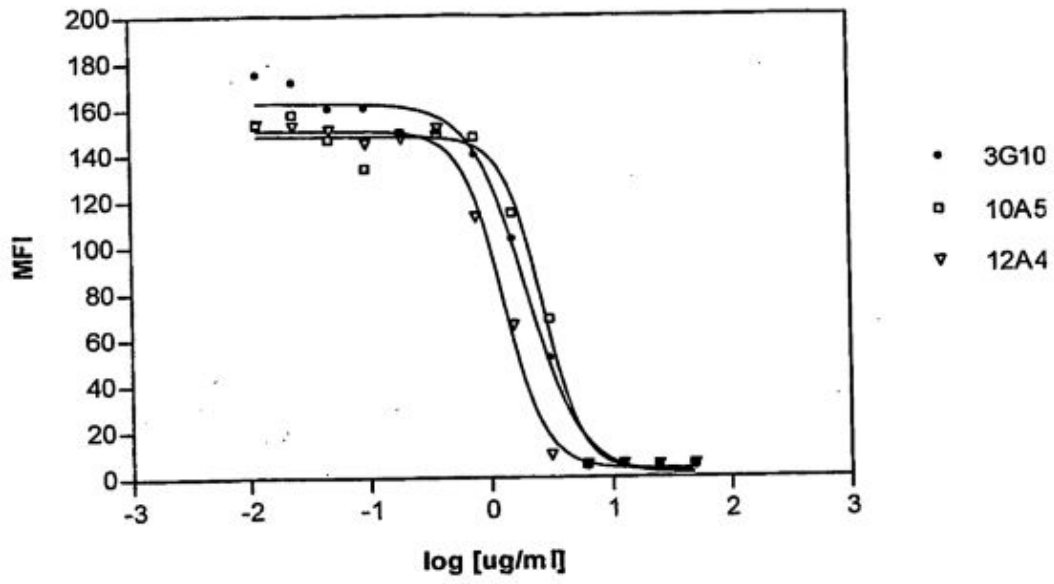


Figura 45

Bloqueo del enlace de PD1-Ig mediante los Ab anti-PDL1 en células ES-2 tratadas con IFN-gamma

	EC50 (nM)
12A4	0,17
1B12	0,21
12B7	0,25
10A5	0,29
13G4	0,29
3G10	0,47
11E6	0,68
5F8	1,03

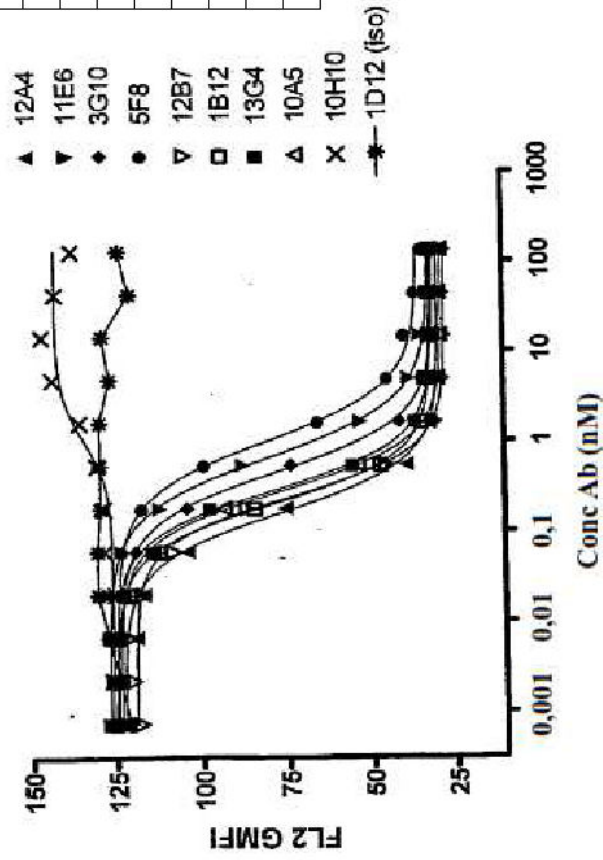


Figura 46

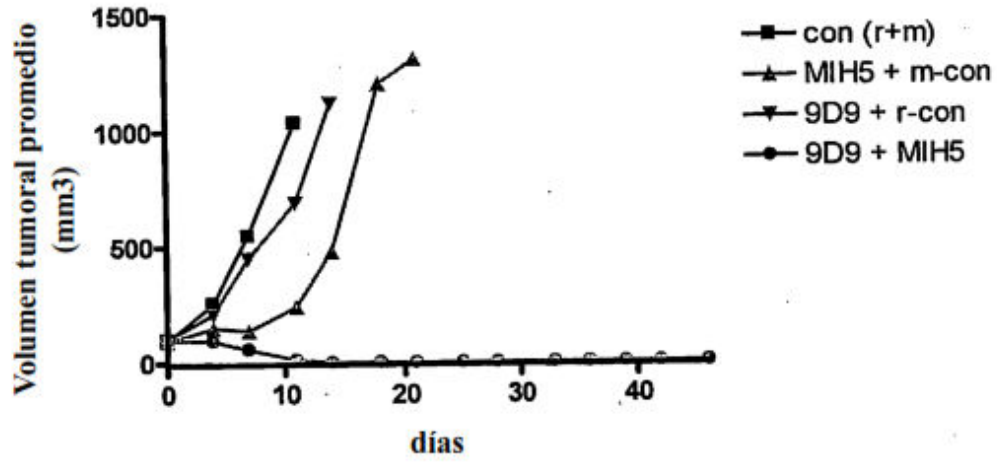


Figura 47