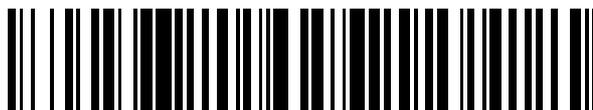


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 592 216**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.09.2009 PCT/US2009/058475**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.04.2010 WO10036959**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2009 E 09816950 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2016 EP 2342226**

54 Título: **Anticuerpos anti-PD-1, PD-L1 y PD-L2 humanos y sus usos**

30 Prioridad:

26.09.2008 US 100534 P

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

28.11.2016

73 Titular/es:

**DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.
(50.0%)**

**450 Brookline Avenue
Boston, MA 02115, US y
EMORY UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FREEMAN, GORDON, J.;
AHMED, RAFI;
JONES, TIMOTHY, D.;
CARR, FRANCIS, J. y
GREGSON, JAMES, P.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 592 216 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 anti-PD-1, PD-L1 y PD-L2 humanos y sus usos

5 Antecedentes de la invención

Para que los linfocitos T respondan a polipéptidos exógenos, deben proporcionarse al menos dos señales a través de células presentadoras de antígeno (APC) a linfocitos T inactivos (Jenkins, M. y Schwartz, R. (1987) *J. Exp. Med.* 165:302-319; Mueller, D. L. *et al.* (1990) *J. Immunol.* 144:3701-3709). La primera señal, que confiere especificidad a la respuesta inmunitaria, se transduce mediante el receptor de linfocitos T (TCR) después del reconocimiento del péptido antigénico exógeno presentado en el contexto del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC). La segunda señal, denominada coestimulación, induce a los linfocitos T a proliferar y a hacerse funcionales (Lenschow *et al.* (1996) *Annu. Rev. Immunol.* 14:233). La coestimulación no es específica de antígeno, ni limitada al MHC, y se proporciona por moléculas de superficie celular distintas expresadas por las APC (Jenkins, M. K. *et al.* (1988) *J. Immunol.* 140:3324-3330; Linsley, P. S. *et al.* (1991) *J. Exp. Med.* 173:721-730; Gimmi, C. D. *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 88:6575-6579; Young, J. W. *et al.* (1992) *J. Clin. Invest.* 90:229-237; Koulova, L. *et al.* (1991) *J. Exp. Med.* 173:759-762; Reiser, H. *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 89:271-275; van-Seventer, G. A. *et al.* (1990) *J. Immunol.* 144:4579-4586; LaSalle, J. M. *et al.* (1991) *J. Immunol.* 147:774-80; Dustin, M. I. *et al.* (1989) *J. Exp. Med.* 169:503; Armitage, R. J. *et al.* (1992) *Nature* 357:80-82; Liu, Y. *et al.* (1992) *J. Exp. Med.* 175:437-445).

Las proteínas B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) son moléculas coestimuladoras críticas (Freeman *et al.* (1991) *J. Exp. Med.* 174:625; Freeman *et al.* (1989) *J. Immunol.* 143:2714; Azuma *et al.* (1993) *Nature* 366:76; Freeman *et al.* (1993) *Science* 262:909). B7-2 desempeña una función predominante durante las respuestas inmunitarias primarias, mientras que B7-1, que está regulada positivamente después durante una respuesta inmunitaria, puede ser importante para prolongar las respuestas de los linfocitos T primarios o coestimular respuestas de linfocitos T secundarios (Bluestone (1995) *Immunity* 2:555).

CD28 es un ligando para B7-1 y B7-2 que se expresa de manera constitutiva en linfocitos T inactivos y aumenta en la expresión después de la activación de linfocitos T. El ligamiento de CD28 junto con una señal TCR produce la transducción de una señal coestimuladora que induce a los linfocitos T a proliferar y segregar IL-2 (Linsley, P. S. *et al.* (1991) *J. Exp. Med.* 173:721-730; Gimmi, C. D. *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 88:6575-6579; June, C. H. *et al.* (1990) *Immunol. Today* 11:211-6; Harding, F. A. *et al.* (1992) *Nature* 356:607-609). Un segundo ligando B7-1 y B7-2, CTLA4 (CD152), es homólogo a CD28, pero no se expresa en linfocitos T inactivos. La expresión de CTLA4 se produce después de la activación de linfocitos T (Brunet, J. F. *et al.* (1987) *Nature* 328:267-270). El ligamiento de CTLA4 da como resultado la transducción de una señal inhibitoria que impide la proliferación de linfocitos T y la secreción de citocinas. Por tanto, CTLA4 es un regulador negativo crítico de respuestas de linfocitos T (Waterhouse *et al.* (1995) *Science* 270:985) (Allison y Krummel (1995) *Science* 270:932). El tercer miembro de la familia CD28 descubierto es ICOS (Hutloff *et al.* (1999) *Nature* 397:263; WO 98/38216). El ligamiento de ICOS con su ligando (ICOS-L) produce altos niveles de expresión de citocinas, pero expansión limitada de linfocitos T (Riley J. L. *et al.* (2001) *J. Immunol.* 166:4943-48; Aicher A. *et al.* (2000) *J. Immunol.* 164:4689-96; Mages H. W. *et al.* (2000) *Eur. J Immunol.* 30:1040-7; Brodie D. *et al.* (2000) *Curr. Biol.* 10:333-6; Ling V. *et al.* (2000) *J. Immunol.* 164:1653-7; Yoshinaga S. K. *et al.* (1999) *Nature* 402:827-32). Si los linfocitos T se estimulan a través del receptor de linfocitos T en ausencia de una señal coestimuladora, se vuelven insensibles, anérgicos o mueren.

La importancia de la ruta coestimuladora B7:CD28/CTLA4/ICOS se ha demostrado *in vitro* y en diversos sistemas de modelos *in vivo*. El bloqueo de esta ruta coestimuladora produce el desarrollo de tolerancia específica de antígeno en sistemas murinos y humanos (Harding, F. A. *et al.* (1992) *Nature* 356:607 609; Lenschow, D. J. *et al.* (1992) *Science* 257:789 792; Turka, L. A. *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11102 11105; Gimmi, C. D. *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6586 6590; Boussiotis, V. *et al.* (1993) *J. Exp. Med.* 178:1753 1763). Inversamente, la expresión de B7 por células tumorales murinas B7 negativas induce la inmunidad específica mediada por linfocitos T acompañada por rechazo de tumor y protección prolongada a exposición tumoral (Chen, L. *et al.* (1992) *Cell* 71:1093 1102; Townsend, S. E. y Allison, J. P. (1993) *Science* 259:368 370; Baskar, S. *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:5687 5690). Por lo tanto, la manipulación de las rutas coestimuladoras ofrece un gran potencial para estimular o suprimir las respuestas inmunitarias en seres humanos.

El descubrimiento de más miembros de las familias B7-1 y CD28 ha revelado rutas adicionales que proporcionan señales secundarias coestimuladoras e inhibitoras a linfocitos T. Una de las rutas más novedosas está representada por el receptor de muerte programada 1 (PD-1; también denominado CD279) y sus ligandos, PD-L1 (B7-H1; CD274) y PD-L2 (B7-DC; CD273). PD-1 es un miembro de la familia CD28/CTLA4 que se expresa en linfocitos T activados, pero no en reposo (Nishimura *et al.* (1996) *Int. Immunol.* 8:773). El ligamiento de PD-1 mediante sus ligandos media una señal inhibitoria que da como resultado la producción reducida de citocinas, y la supervivencia reducida de linfocitos T (Nishimura *et al.* (1999) *Immunity* 11:141; Nishimura *et al.* (2001) *Science* 291:319; Chemnitz *et al.* (2004) *J. Immunol.* 173:945).

65

5 PD-L1 es un miembro de la familia B7 que se expresa en muchos tipos de células, incluyendo APC y linfocitos T activados (Yamazaki *et al.* (2002) *J. Immunol.* 169:5538). PD-L1 se use tanto a PD-1 como a B7-1. La unión tanto de B7-1 por PD-L1 expresada en linfocitos T y la unión de PD-L1 expresada en linfocitos T por B7-1 da como resultado la inhibición de linfocitos T (Butte *et al.* (2007) *Immunity* 27:111). También hay pruebas de que, al igual que otros miembros de la familia B7, PD-L1 también puede proporcionar señales coestimuladoras a linfocitos T (Subudhi *et al.* (2004) *J. Clin. Invest.* 113:694; Tamura *et al.* (2001) *Blood* 97:1809). El documento WO 2008/083174 muestra un método de reactivación de linfocitos T agotados y para tratar infecciones y tumores con un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 murino bloqueante.

10 PD-L2 es un miembro de la familia B7 expresado en diversas APC, incluyendo células dendríticas, macrófagos y mastocitos derivados de médula ósea (Zhong *et al.* (2007) *Eur. J. Immunol.* 37:2405). PD-L2 expresado en APC puede inhibir tanto la activación de los linfocitos T a través del ligamiento de PD-1 como coestimular la activación de los linfocitos T, a través de un mecanismo independiente de PD-1 (Shin *et al.* (2005) *J. Exp. Med.* 201:1531). Además, el ligamiento de PD-L2 expresado en células dendríticas produce una expresión y una supervivencia de citocinas en células dendríticas potenciada (Radhakrishnan *et al.* (2003) *J. Immunol.* 37:1827; Nguyen *et al.* (2002) *J. Exp. Med.* 196:1393). La estructura y expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2, así como características de señalización y funciones de estas moléculas en el contexto de regulación de la activación y tolerancia de linfocitos T (por ejemplo, efectos terapéuticos) se revisa con más detalles en Kier *et al.* (2008) *Ann. Rev. Immunol.* 26:677. La manipulación de esta y otras rutas coestimuladoras ofrece un gran potencial para estimular o suprimir las respuestas inmunitarias en seres humanos y existe una necesidad de composiciones y métodos que sean útiles para efectuar dichas manipulaciones.

Sumario de la invención

25 La presente invención se basa en la generación y el aislamiento de nuevos compuestos, anticuerpos monoclonales humanos como se define en las reivindicaciones, que se unen específicamente a PD-L1 humano

así como la caracterización de dichos nuevos anticuerpos y la demostración de su valor terapéutico en el tratamiento de diversas afecciones mediadas por PD-L1.

30 Las técnicas habituales usadas para humanizar anticuerpos murinos frecuentemente producen anticuerpos humanizados que tienen afinidades de unión antigénica reducidas en comparación con los anticuerpos murinos originales (Almagro y Fransson (2008) *Frontiers in Bioscience* 13:1619-1633; Foote y Winter (1992) *J. Mol. Biol.* 224:487-499; Hwang *et al.* (2005) *Methods* 36: 35-42). Sorprendentemente, se ha observado que los anticuerpos humanos compuestos de la presente invención se unen a PD-L1 con afinidades muy próximas a las de los anticuerpos murinos. Adicionalmente, las técnicas de humanización convencionales producen anticuerpos humanizados que conservan alguna secuencia murina. Como resultado, dichos anticuerpos pueden conservar inmunogenicidad cuando se administran a seres humanos. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado CAMPATH® suscita inmunogenicidad en aproximadamente el 50 % de los pacientes. Los anticuerpos humanos compuestos de la presente invención, por otro lado, proceden completamente de secuencias de origen humano. Por lo tanto, posiblemente son menos significativamente inmunogénicos y más terapéuticamente eficaces y útiles cuando se administran a pacientes humanos en lugar de anticuerpos anti-PD-L1 humanos. Por consiguiente, los anticuerpos humanos compuestos de la presente invención, proporcionan un medio mejorado para el tratamiento y la prevención de trastornos mediados por PD-L1, atribuible en parte a su única especificidad, afinidad, estructura, actividad funcional y el hecho de que proceden de secuencias de anticuerpos humanos. La presente invención también se basa en el descubrimiento de nuevas aplicaciones terapéuticas para estos anticuerpos, incluyendo su uso en el tratamiento de infecciones y cánceres administrando los anticuerpos humanos compuestos descritos en el presente documento.

50 En el presente documento se describe un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a una proteína PD-1, una proteína PD-L1 o una proteína PD-L2 (tal como la proteína PD-1, PD-L1 o PD-L2 humana), en el que el anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, es quimérico, humanizado, compuesto, humano o humano, y que comprende una, dos, tres, cuatro, cinco o seis secuencias de CDR seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7-24.

55 También se desvela un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión antigénica del mismo, que se une a una proteína PD-1 (tal como una proteína PD-1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2), en el que el anticuerpo aislado, o fragmento de unión antigénica del mismo, es quimérico, humanizado, compuesto, humano o humano y que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende las SEQ ID NO: 7-9 (secuencia CDR1 de SEQ ID NO: 7, secuencia CDR2 de SEQ ID NO: 8, y secuencia CDR3 de SEQ ID NO: 9) y/o una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 10-12 (secuencia CDR1 de SEQ ID NO: 10, secuencia CDR2 de SEQ ID NO: 11 y secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 12).

65 También se desvela un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión antigénica del mismo, que se une a una proteína PD-L1 (tal como una proteína PD-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4), en el que el anticuerpo aislado, o fragmento de unión antigénica del mismo, es quimérico, humanizado, compuesto,

humano o humano, y que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende las SEQ ID NO: 13-15 (secuencia CDR1 de SEQ ID NO: 13, secuencia CDR2 de SEQ ID NO: 14, y secuencia CDR3 de SEQ ID NO: 15), y/o una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 16-18 (secuencia CDR1 de SEQ ID NO: 16, secuencia CDR2 de SEQ ID NO: 17 y secuencia CDR3 de SEQ ID NO: 18).

5 También se desvela un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión antigénica del mismo, que se une a una proteína PD-L2 (tal como una proteína PD-L2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6), en que el anticuerpo aislado, o fragmento de unión antigénica del mismo, es quimérico, humanizado, compuesto, humano o humano, y que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende las SEQ ID NO: 19-21 (secuencia CDR1 de SEQ ID NO: 19, secuencia CDR2 de SEQ ID NO: 20 y secuencia CDR3 de SEQ ID NO: 21), y/o una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 22-24 (secuencia CDR1 de SEQ ID NO: 22, secuencia CDR2 de SEQ ID NO: 23 y secuencia CDR3 de SEQ ID NO: 24).

15 También se desvela un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión antigénica del mismo, que se une a una proteína PD-1, una proteína PD-L1 o una proteína PD-L2 (tal como una proteína PD-1, PD-L1 o PD-L2 humana) en la que el anticuerpo aislado, o fragmento de unión antigénica del mismo, es quimérico, humanizado, compuesto y/o humano, y que comprende una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 25-29, 34-38 o 43-47 o una secuencia que tiene una homología de al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % o más idéntica a la SEQ ID NO: 25-29, 34-38 o 43-47, y/o una secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 30-33, 39-42 o 48-51, o una secuencia que tiene una homología de al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % o más con la SEQ ID NO: 30-33, 39-42 o 48-51.

25 También se desvela un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión antigénica del mismo, que se une a una proteína PD-1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en la que el anticuerpo aislado, o fragmento de unión antigénica del mismo, es quimérico, humanizado, compuesto o humano, y que comprende una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 25-29, o una secuencia con una identidad u homología de al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % o más con SEQ ID NO: 25-29, y/o una secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 30-33, o una secuencia con una identidad u homología de al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % o más con la SEQ ID NO: 30-33. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión antigénica del mismo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 27 o 28, y una secuencia de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 32 o 33. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión antigénica del mismo descrito en el presente documento comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 28, y una secuencia de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 32.

30 La invención proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento antigénico del mismo, que se une a una proteína PD-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, en el que el anticuerpo aislado, o fragmento de unión antigénica del mismo, está humanizado o compuesto y que comprende una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 34-38, y una secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 39-42. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión antigénica del mismo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 35 o 37, y una secuencia de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 39, 40 o 42. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión antigénica del mismo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 35, y una secuencia de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 42.

45 También se desvela un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión antigénica del mismo, que se une a una proteína PD-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6, en el que el anticuerpo aislado, o fragmento de unión antigénica del mismo, es quimérico, humanizado, compuesto o humano y que comprende una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 43-47, una secuencia con una identidad u homología de al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % o más con SEQ ID NO: 43-47, y/o una secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo con que consiste en SEQ ID NO: 48-51, o una secuencia con una identidad u homología de al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % o más con la SEQ ID NO: 48-51. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión antigénica del mismo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 44 o 46, y una secuencia de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 49, 50 o 51. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión antigénica del mismo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 46, y una secuencia de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 51.

60 Otra realización de la invención es un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión antigénica del mismo, que se une a una proteína PD-L1, en el que el anticuerpo aislado inhibe la unión del anticuerpo 29E2A3 biotinilado con Fc-PD-L1 en un ensayo ELISA de competición, en el que el anticuerpo 29E2A3 comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 78, y una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 79.

65

Otra realización de la invención es un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión antigénica del mismo, que se une a una proteína PD-L1 en la que el anticuerpo aislado inhibe la señal mediada por PD-L1.

5 En particular, una realización de la invención es un ácido nucleico aislado como se define en las reivindicaciones. Otra realización es un vector, una célula hospedadora o un animal como se define en las reivindicaciones.

10 También se desvela un ácido nucleico que se hibrida, en condiciones rigurosas, con el complemento de un ácido nucleico que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 25-51, o una secuencia con una homología de al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más con la SEQ ID NO: 25-51.

15 Por tanto, la invención proporciona un ácido nucleico aislado como se define en las reivindicaciones que codifica una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de cualquiera de los anticuerpos o fragmentos unión antigénica de los mismos de la invención. En algunas realizaciones, el ácido nucleico está un vector, tal como un vector de expresión. La invención también proporciona una célula hospedadora que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican la cadena pesada y ligera de los anticuerpos o fragmentos de unión antigénica descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la célula hospedadora produce los anticuerpos o fragmentos de unión antigénica. La invención también proporciona métodos de producción del anticuerpo o fragmento de unión antigénica descrito en el presente documento que comprenden cultivar una célula que produzca el anticuerpo o fragmento de unión antigénica y recuperar el anticuerpo o fragmento de unión antigénica del cultivo celular.

20 Adicionalmente la invención incluye una composición farmacéutica como se define en las reivindicaciones que comprende un anticuerpo aislado o un fragmento de unión antigénica del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 La invención incluye un método de reactivación de un linfocito T exhausto, que comprende poner en contacto una población de linfocitos T en el que algunas células expresan PD-L1 usando un anticuerpo descrito en el presente documento o un fragmento de unión antigénica del mismo bien *in vitro* o *ex vivo*.

35 La invención incluye adicionalmente un anticuerpo, o un fragmento de unión antigénica del mismo, como se define en las reivindicaciones, para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que padece una infección persistente, incluyendo una infección vírica, una infección bacteriana, una infección helmíntica o una infección protozoaria administrando al sujeto una composición que comprenda una cantidad eficaz de un anticuerpo aislado descrito en el presente documento, o un fragmento de unión antigénica del mismo.

40 La invención incluye adicionalmente un anticuerpo, o un fragmento de unión antigénica del mismo, como se define en las reivindicaciones, para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que padece cáncer administrando al sujeto una composición que comprenda una cantidad eficaz de un anticuerpo aislado descrito en el presente documento, o un fragmento de unión antigénica del mismo, incluyendo en el que el anticuerpo aislado induce citotoxicidad mediada por anticuerpo o esta modificado para inducir citotoxicidad mediada por anticuerpo o conjugado a un agente seleccionado del grupo que consiste en una toxina o un agente formador de imágenes. El anticuerpo o el fragmento de unión antigénica que se une a PD-L1 se administra al sujeto que tiene un cáncer que sobreexpresa PD-L1.

45 También se desvela un método de tratamiento del sujeto que padece asma, que comprende administrar al sujeto una composición que comprenda una cantidad eficaz de un anticuerpo aislado que se una a una proteína PD-L2 descrita en el presente documento, o un fragmento de unión antigénica del mismo.

50 También se desvela un método de tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad inflamatoria o rechazo de trasplante, administrando al sujeto una composición que comprenda una cantidad eficaz de un anticuerpo aislado descrito en el presente documento, o un fragmento de unión antigénica del mismo, que se una a una proteína PD-L1.

55 Específicamente, como se define en las reivindicaciones, la invención proporciona un anticuerpo, un fragmento de unión antigénica o un polipéptido de la invención para su uso en métodos de tratamiento de dichos trastornos. La invención también incluye el uso de un anticuerpo, un fragmento de unión antigénica o un polipéptido descritos en el presente documento para la fabricación de un medicamento, tal como un medicamento para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento en un sujeto.

60 **Breve descripción de los dibujos**

La **figura 1** muestra un diagrama esquemático de vectores de expresión usados para la clonación de las secuencias de inmunoglobulina humana ensambladas de la presente invención.

65 Las **figuras 2A-2E** muestran secuencias de región variable de cadena pesada humana, compuestas, (figura 2A, VH1; figura 2B, VH2; figura 2C, VH3; y figura 2D, VH4; figura 2E, VH5) diseñadas para corresponder a las del

anticuerpo anti-PD-1 humano de ratón, EH12.2H7.

Las **figuras 3A-3D** muestran de secuencias de región variable de cadena ligera humana, compuestas (figura 3A, Vk1; figura 3B, Vk2; figura 3C, Vk3; figura 3D, Vk4) diseñadas para corresponder a la del anticuerpo anti-PD-1 humano de ratón, EH12.2H7.

5 Las **figuras 4A-4E** muestran secuencias de región variable de cadena pesada humana, compuestas (figura 4A, VH1; figura 4B, VH2; figura 4C, VH3; figura 4D, VH4; figura 4E, VH5) diseñadas para corresponder a la del anticuerpo anti-PD-L1 humano de ratón, 29E.2A3.

10 Las **figuras 5A-5D** muestran secuencias de región variable de cadena ligera humana, compuestas (figura 5A, Vk1; figura 5B, Vk2; figura 5C, Vk3; figura 5D, Vk4) diseñadas para corresponder a la del anticuerpo anti-PD-L1 humano de ratón, 29E.2A3.

Las **figuras 6A-6E** muestran secuencias de región variable de cadena pesada humana, compuestas (figura 6A, VH1; figura 6B, VH2; figura 6C, VH3; figura 6D, VH4; figura 6E, VH5) diseñadas para corresponder a la del anticuerpo anti-PD-L2 humano de ratón, 24F.10C12.

15 Las **figuras 7A-7D** muestran secuencias de la región variable de cadena ligera humana, compuestas (figura 7A, Vk1; figura 7B, Vk2; figura 7C, Vk3; figura 7D, Vk4) diseñadas para corresponder a la del anticuerpo anti-PD-L2 humano de ratón, 24F.10C12.

Las **figuras 8A-8C** muestran resultados SDS-PAGE de 1 µg de anticuerpos humanos, compuestos, correspondientes a los anticuerpos antihumano de ratón, EH12.2H7, 29E.2A3 y 24F.10C12, respectivamente.

20 La **figura 9A-9C** muestra resultados de competición ELISA de anticuerpos humanos correspondientes a y con respecto a los anticuerpos antihumano de ratón, EH12.2H7, 29E.2A3 y 24F.10C12, respectivamente. En la figura 9A, la unión de los anticuerpos purificados con PD-1 humano se ensayaron mediante ELISA de competición. Diversas concentraciones de cada anticuerpo (0,06 µg/ml a 8 µg/ml) se mezclaron con una concentración fija de EH12.2H7 biotinilado (40 ng/ml) y se unieron con una placa maxisorb immulon revestida con PD-1. También se detectó la unión mediante estreptavidina-HRP y sustrato OPD. La absorbancia a 490 nm se midió en un lector de placa y esto se representó gráficamente frente a la concentración del anticuerpo de ensayo. En la figura 9B, la unión de los anticuerpos purificados con PD-L1 humano se ensayó mediante ELISA de competición. Diferentes concentraciones de cada anticuerpo (0,02 mg/ml a 8 mg/ml) se mezclaron con una concentración fija de 29E.2A3 biotinilado (40 ng/ml) y se unieron a una placa maxisorb immulon revestida con PD-L1. La unión se detectó con estreptavidina-HRP y sustrato OPD. La absorbancia a 490 nm se midió en un lector de placa y esto se representó gráficamente frente a la concentración del anticuerpo de ensayo. En la figura 9C, la unión de los anticuerpos purificados contra PD-L2 humano se ensayó mediante ELISA de competición. Diversas concentraciones de cada anticuerpo (0,02 mg/ml a 8 mg/ml) se mezclaron con una concentración fija de 24F.10C12 biotinilado (40 ng/ml) y se unieron con una placa maxisorb immulon revestida con PD-L2. La unión se detectó mediante estreptavidina-HRP y sustrato OPD. La absorbancia a 490 nm se midió en un lector de placa y esto se representó gráficamente frente a la concentración del anticuerpo de ensayo.

25 30 35 Las **figuras 10A-10C** muestran datos de unión de Cl_{50} resultantes de análisis de competición ELISA de los anticuerpos humanos, compuestos, formados de acuerdo con diferentes combinaciones de cadenas pesada y ligera humanas, compuestas, diseñadas para corresponder a las de los anticuerpos anti-humano de ratón, EH12.2H7 (figura 10A), 29E.2A3 (figura 10B) y 24F.10C12 (figura 10C), respectivamente. El ensayo se realizó como se describe en la figura 3. La Cl_{50} de cada combinación de cadena pesada y ligera se normalizó frente a la Cl_{50} del anticuerpo de ratón. SD = Sin datos.

40 La **figura 11** muestra las secuencias de aminoácido de PD-1, PD-L1 y PD-L2.
La **figura 12** muestra las secuencias de aminoácidos de las regiones CDR de algunos de los anticuerpos humanos, compuestos, descritos en el presente documento.

45 La **figura 13** muestra las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de algunos de los anticuerpos humanos, compuestos, descritos en el presente documento.

50 Las **figuras 14A y 14B** muestran el efecto de un anticuerpo anti-PD-1 humanizado y un anticuerpo anti-PD-L1 humanizado sobre la capacidad proliferativa de linfocitos T CD8 específicos de Gag del SIV *in vitro*. Cada símbolo representa un macaco individual. Los números entre paréntesis representan un factor de aumento en la proliferación en presencia de un Ab bloqueante en comparación con un Ab no bloqueante.

La **figura 15** muestra que el bloqueo de PD-L1 reestablece la proliferación conducida por el antígeno de linfocitos T CD8 intrahepáticos (datos representativos del animal 1564).

Descripción detallada de la invención

55 La presente invención proporciona nuevos compuestos terapéuticos basados en anticuerpos para el tratamiento y diagnóstico de diversos trastornos mediados por PD-L1, (por ejemplo, tratamiento de enfermedades infecciosas persistentes y cánceres).

60 Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, en primer lugar, se definen determinados términos. Se exponen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

65 Como se usa en el presente documento, los términos "PD-1", "PD-L1" y "PD-L2" incluyen cualquiera de las variantes o isoformas que expresan de manera natural las células, y/o sus fragmentos que tienen al menos una actividad biológica del polipéptido, de longitud completa, salvo que expresamente se defina de otra manera. Además, la expresión "ligando de PD-1" incluye cualquiera o ambas PD-L1 (Freeman *et al.* (2000) J. Exp. Med. 192:1027) y PD-

L2 (Latchman *et al.* (2001) *Nat. Immunol.* 2:261) y cualquiera de las variantes o isoformas que expresan de manera natural las células, y/o sus fragmentos que tienen al menos una actividad biológica de los polipéptidos de longitud completa. Por ejemplo, las secuencias de PD-1, PD-L1 y PD-L2 de diferentes especies, incluyendo seres humanos, son muy conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Honjo *et al.*, Patente de Estados Unidos. n.º 5.629.204, que desvela secuencias PD-1 de ser humano y de ratón; Wood *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 7.105.328, que desvela secuencias PD-1 humanas; Chen *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 6.803.192, que desvela secuencias PD-L1 de ser humano y ratón; Wood *et al.*, Patente de Estado Unidos n.º 7.105.328, que desvela secuencias PD-L1 humanas; Freeman *et al.*, Patente de Estados Unidos Pub. 20020164600, que desvela secuencias PD-L2 humanas y de ratón).

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos enteros y cualquier fragmento de unión antigénica (es decir, "parte de unión antigénica") o cadena sencilla del mismo. Un "anticuerpo" se refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H, *heavy*) y dos cadenas ligeras (L, *light*) interconectadas por enlaces disulfuro, o una parte de unión antigénica del mismo. Cada cadena pesada comprende 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 comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende 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 comprende un dominio, CL. Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR, *framework regions*). Cada V_H y V_L comprende tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. "Los anticuerpos inactivadores" se refieren a anticuerpos que no inducen el sistema del complemento.

La expresión "regiones hipervariables", "HVR" o "HV", cuando se usan en el presente documento se refieren a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. Generalmente los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en la V_H (H1, H2, H3), y tres en la V_L (L1, L2, L3). En anticuerpos naturales, H3 y L3 presentan la mayor diversidad de las seis HVR, y se piensa que H3 en particular desempeña una función exclusiva confiriendo especificidad refinada a los anticuerpos. Véase, por ejemplo, Xu *et al.* *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson y Wu en *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)). De hecho, los anticuerpos de camélidos de origen natural que constan solamente de una cadena pesada son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera. Véase, por ejemplo, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993) y Sheriff *et al.*, *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

Diversas delineaciones de regiones hipervariables están en uso y se incluyen en el presente documento. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las más habitualmente utilizadas (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª edición. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Por otro lado, Chothia se refiere a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). El extremo del bucle CDR-H1 de Chothia cuando se numera usando la convención de numeración de Kabat varía entre H32 y H34 (véase más adelante) dependiendo de la longitud del bucle (esto se debe a que el esquema de numeración de Kabat coloca las inserciones en H35A y H35B; si no están presentes ni 35A ni 35B, el bucle termina en 32; si solo está presente 35A, el bucle termina en 33; y se están presentes tanto 35A como 35B, el bucle termina en 34). Las regiones hipervariables AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se usan en el programa informático de modelación de anticuerpos AbM Oxford Molecular. Las regiones hipervariables de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los restos de cada una de estas regiones hipervariables se indican a continuación.

Núcleo	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32, 33 o 34	H30-H35B (numeración de Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (numeración de Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102	H93-H101

Las regiones hipervariables pueden comprender "regiones hipervariables extendidas" siguientes: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en la V_L y 26-35B (H1), 50-65, 47-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 o 95-102 (H3) en la V_H. Estas regiones hipervariables extendidas son normalmente combinaciones de las definiciones de Kabat y

Chothia, que puede opcionalmente incluir también restos identificados usando la definición de Contacto. Los restos del dominio variable se enumeran de acuerdo Kabat *et al.*, citado anteriormente para cada una de estas definiciones.

5 Los restos de la región "marco conservada" o "FR" son aquellos restos de dominio variable distintos de los restos HVR como se define en el presente documento.

10 La expresión "numeración de restos de dominio variable como en Kabat" o "numeración de posición de aminoácidos como en Kabat", y variaciones de las mismas, se refiere al sistema de numeración usado para los dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera del conjunto de los anticuerpos en Kabat *et al.*, citado anteriormente. Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un solo inserto de aminoácido (resto 52a de acuerdo con Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo, restos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del resto 82 de la FR de cadena pesada. La numeración de restos Kabat
15 puede determinarse para un anticuerpo determinado por alineamiento en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "convencional".

20 La expresión "región Fc" del presente documento se usa para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana normalmente se define para abarcar desde un resto de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxilo de la misma. La lisina C terminal (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc puede retirarse, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o mediante modificación recombinante de ingeniería genética del ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. Por
25 consiguiente, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los restos K447 retirados, poblaciones de anticuerpos sin restos K447 retirados, y poblaciones de anticuerpos que tengan una mezcla de anticuerpos con y sin el resto K447. Las regiones Fc de secuencia nativa adecuadas para su uso en los anticuerpos de la invención incluyen IgG1, IgG2 (IgG2A, IgG2B), IgG3 e IgG4 humanas.

30 "El receptor Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII incluyendo variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativas de estos receptores, los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que se diferencian principalmente
35 en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación de inmunorreceptores basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición de inmunorreceptores basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplasmático (véase M. Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997). Se revisan FcR en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Otros FcR que
40 incluyen los que van a identificarse en el futuro están englobados por el término "FcR" en este documento.

45 El término "CDR", se refiere a una región determinante de complementariedad (CDR) de las cuales tres constituyen el carácter de unión de una región variable de cadena ligera (CDRL1, CDRL2 y CDRL3) y tres constituyen el carácter de unión de una región variable de cadena pesada (CDRH1, CDRH2 y CDRH3). Las CDR contribuyen a la actividad funcional de una molécula de anticuerpo y están separadas por secuencias de aminoácidos que comprenden regiones armazón o marco conservadas. Los límites CDR de las definiciones exactas y las longitudes se someten a diferentes sistemas de clasificación y numeración. Por lo tanto, las CDR pueden referirse a las de Kabat, Chothia y Contacto o a cualquier otra definición límite, incluyendo el sistema de numeración descrito en el presente documento. A pesar de diferentes límites, cada uno de estos sistemas tiene algún grado de solapamiento
50 en lo que constituyen las denominadas "regiones hipervariables", dentro de las secuencias variables. Las definiciones de CDR de acuerdo con estos sistemas pueden por lo tanto diferir en cuanto a longitud y áreas límite con respecto a la región marco conservada adyacente. Véase, por ejemplo, Kabat, Chothia y/o MacCallum *et al.*, (Kabat *et al.*, in "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5ª Edición, U.S. Department of Health and Human Services, 1992; Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 1987, 196: 901; y MacCallum *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 1996, 262: 732).
55

60 Como se usa en el presente documento, la expresión "parte de unión antigénica" de un anticuerpo (o simplemente "parte antigénica"), se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, PD-1, PD-L1 y/o PD-L2). Se ha observado que la función de unión antigénica de un anticuerpo puede llevarse a cabo por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos dentro de la expresión "parte de unión antigénica" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_H, V_L, C_L y C_H1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados mediante un puente de disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consta de los dominios V_H y C_H1; (iv) un fragmento de Fv que consta de los dominios V_H y V_L de un solo brazo del anticuerpo; (v) un fragmento de dAb (Ward *et al.*, (1989)
65 *Nature* 341:544 546), que consta de un dominio V_H; (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR)

aislada o (vii) una combinación de dos o más CDR aisladas que opcionalmente pueden unirse mediante un enlazador sintético. Adicionalmente, aunque los dos dominios del fragmento F_v, V_H y V_L, están codificados por genes distintos, estos pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que los permite constituirse como una cadena de proteínas sencilla en la que las regiones V_H y V_L se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como F_v monocatenaria (scFv); véase por ejemplo Bird *et al.* (1988) Science 242:423 426; y Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 85:5879 5883). Dichos anticuerpos monocatenarios también pretenden incluirse dentro de la expresión "parte de unión antigénica" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica y los fragmentos se exploran con respecto a su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales; xenogénicos, alogénicos o singénicos; o formas modificadas de los mismos (por ejemplo, humanizados, quiméricos, etc.). Los anticuerpos también pueden ser completamente humanos. Preferentemente, los anticuerpos de la invención se unen específica o sustancialmente a polipéptidos PD-1, PD-L1 o PD-L2. La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que presenta una sola especificidad y afinidad de unión para un epítipo particular. Por consiguiente, la expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a un anticuerpo que presenta una sola especificidad de unión y que tiene regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana o de inmunoglobulina que no sean de la línea germinal. En una realización los anticuerpos monoclonales humanos se producen mediante un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionado a una célula inmortalizada.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo aislado" pretende referirse a un anticuerpo que carece sustancialmente de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1, PD-L1 o PD-L2 carece sustancialmente de anticuerpos que no se unen a PD-1, PD-L1 o PD-L2, respectivamente). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo de of PD-1, PD-L1 y/o PD-L2 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otras proteínas PD-1, PD-L1 y/o PD-L2, respectivamente, de diferentes especies. Sin embargo, el anticuerpo se une siempre preferentemente a PD-1, PD-L1 y/o PD-L2 humano. Además, el anticuerpo aislado carece normalmente de manera sustancial de otro material celular y/o compuestos químicos. En el presente documento se desvela una combinación de anticuerpos monoclonales "aislados" que tienen diferentes especificidades por PD-1, PD-L1 y/o PD-L2 combinados en una composición bien definida.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que consiste en la CDR de anticuerpos derivados de mamíferos que no son humanos, y la región FR y la región constante de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado es útil como un componente eficaz en un agente terapéutico de acuerdo con la presente invención dado que la antigenicidad del anticuerpo humanizado en el cuerpo humano está reducida.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo compuesto" se refiere a un anticuerpo que tiene regiones variables que comprenden secuencias de inmunoglobulina de línea germinal o de línea no germinal de dos o más regiones variables no relacionadas. Adicionalmente, la expresión "anticuerpo humano, compuesto" se refiere a un anticuerpo que tiene regiones constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana de línea germinal o de línea no germinal y regiones variables que comprenden secuencias humanas de línea germinal o de línea no germinal de dos o más regiones variables humanas no relacionadas. Un anticuerpo humano, compuesto, es útil como un componente eficaz en un agente terapéutico de acuerdo con la presente invención dado que la antigenicidad del anticuerpo humano, compuesto, en el organismo está reducida.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humano recombinante" incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medio recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, de un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado de los mismos (descrito adicionalmente en la sección I, más adelante), (b) anticuerpos aislados de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos combinatoria humana, recombinante y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana de otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal y no germinal humana. Sin embargo, en determinadas realizaciones, dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se utiliza un animal transgénico para secuencias Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y por tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan de y están relacionadas con secuencias de la línea germinal humana V_H y V_L, pueden no existir en la naturaleza en el repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Como se usa en el presente documento la expresión "anticuerpo heterólogo" se define en relación al organismo no humano transgénico que produce dicho anticuerpo. Ese término se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia

de aminoácidos o a una secuencia de ácido nucleico que corresponde a la encontrada en un organismo que no consiste en el animal no humano transgénico y generalmente de una especie distinta a la del animal no humano transgénico.

- 5 Como se usa en el presente documento, el término “ K_D ” pretende referirse a la constante de disociación del equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión “unión específica” se refiere a un anticuerpo que se une a un antígeno predeterminado. Normalmente, el anticuerpo se une con una afinidad (K_D) de aproximadamente menor de 10^{-7} M, tal como aproximadamente 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso más baja cuando se determina mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento BIACORE 3000 usando PD-1, PD-L1 o PD-L2 recombinante humano como el analito y el anticuerpo como el ligando, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 o 10,0 veces o mayor que su afinidad por la unión con un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto al antígeno predeterminado o a un antígeno estrechamente relacionado. Las frases “un anticuerpo que reconoce un antígeno” y “un anticuerpo específico para un antígeno” se usan indistintamente en el presente documento con la expresión “un anticuerpo que une específicamente a un antígeno”.

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

25 Como se usa en el presente documento, la expresión “patrón de glucosilación” se define como el patrón de unidades de hidrato de carbono que están unidas de manera covalente a una proteína, más específicamente a una proteína de inmunoglobulina. Un patrón de glucosilación de un anticuerpo heterólogo puede caracterizarse por ser sustancialmente similar a patrones de glucosilación que se producen en la naturaleza en anticuerpos producidos por la especie del animal transgénico no humano, cuando un experto habitual en la técnica reconocería que el patrón de glucosilación del anticuerpo heterólogo es más similar a dicho patrón de glucosilación en la especie del animal transgénico no humano en lugar de las especies de las que proceden los genes CH del gen transgénico.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión “origen natural” como se aplica a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica o polinucleotídica que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionalmente por el hombre en el laboratorio es de origen natural.

35 Como se usa en el presente documento, el término “reordenado” se refiere a una configuración de un locus de inmunoglobulina de cadena pesada o cadena ligera en la que un segmento V se coloca inmediatamente adyacente a un segmento D-J o J en una conformación que codifica esencialmente un dominio V_H y V_L completo, respectivamente. Un locus de gen de inmunoglobulina reordenado puede identificarse por comparación con el ADN de la línea germinal; un locus reordenado tendrá al menos un elemento de homología heptamérico/nonamérico recombinado.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión “no reordenado” o “configuración de línea germinal” en referencia a un segmento V se refiere a la configuración en la que el segmento V no está recombinado de tal manera que esté inmediatamente adyacente a un segmento D o J.

Como se usa en el presente documento, la expresión “molécula de ácido nucleico” pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser mono o bicatenaria, pero preferentemente es ADN bicatenario.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión “molécula de ácido nucleico aislada” en referencia a ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o partes de anticuerpos (por ejemplo, V_H , V_L , CDR3) que se unen a PD-1, PD-L1 o PD-L2, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico en la que las secuencias nucleotídicas que codifican el anticuerpo o parte del anticuerpo carecen de otras secuencias nucleotídicas que codifican anticuerpos o partes de anticuerpos que se unen a antígenos distintos de PD-1, PD-L1 o PD-L2, respectivamente, con otras secuencias que pueden flanquear de manera natural el ácido nucleico en el ADN genómico humano. Las figuras 2-7 corresponden a secuencias de nucleótidos y aminoácidos que comprenden las regiones variables de cadena pesada (V_H) y cadena ligera (V_L) de los anticuerpos anti-PD-1, PD-L1 o PD-L2 humanos desvelados en el presente documento, respectivamente.

60 En el presente documento también se desvelan “modificaciones de secuencia conservativas” de las secuencias expuestas en las figuras (por ejemplo, figuras 2-7), incluyendo modificaciones de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo codificado por la secuencia de nucleótidos o que contiene la secuencia de aminoácidos. Dichas modificaciones de secuencia conservativa incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de nucleótidos y aminoácidos. Pueden introducirse modificaciones en la secuencia expuesta en las figuras (por ejemplo, figuras 2-7) mediante técnicas convencionales conocidas en la materia, tales como mutagénesis dirigida al sitio, y mutagénesis mediada por PCR. Las

5 sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen unas en las que el resto de aminoácido se reemplaza con un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por tanto, un resto de aminoácido no esencial predicho en un anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-PD-L2 humano se reemplaza preferentemente con otro resto de aminoácido de la misma familia de cadena lateral.

15 Como alternativa, en otra realización, pueden introducirse mutaciones al azar a lo largo de toda o parte de una secuencia que codifica un anticuerpo anti-PD-1, PD-L1 o PD-L2 humano, tal como mediante mutagénesis de saturación, y los anticuerpos anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-PD-L2 humanos modificados resultantes pueden explorarse con respecto a la actividad de unión.

20 Por consiguiente, los anticuerpos codificados por las secuencias de nucleótidos de región variable de cadena pesada y ligera desvelados en el presente documento y/o que contienen las secuencias de aminoácidos de región variable de cadena pesada y ligera desvelados en el presente documento (por ejemplo, figuras 2-7) incluyen anticuerpos sustancialmente similares codificados por o que contienen secuencias similares que se han modificado de una manera conservativa. Un análisis adicional de cómo pueden generarse dichos anticuerpos sustancialmente similares basándose en las secuencias (es decir, regiones variables de cadena pesada y ligera) desveladas en el presente documento (por ejemplo, figuras 2-7) se proporcionan más adelante.

25 Adicionalmente, hay una correspondencia conocida y definida entre la secuencia de aminoácidos de una proteína particular y las secuencias de nucleótidos que pueden codificar la proteína, como se define en el código genético (véase más adelante). Del mismo modo, hay una correspondencia conocida y definitiva entre la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico particular y la secuencia de aminoácidos codificada por ese ácido nucleico, como se define mediante el código genético.

30

CÓDIGO GENÉTICO

Alanina (Ala, A)	GCA, GCC, GCG , GCT
Arginina (Arg, R)	AGA, ACG, CGA, CGC, CGG, CGT
Asparagina (Asn, N)	AAC, AAT
Ácido Aspártico (Asp, D)	GAC, GAT
Cisteína (Cys, C)	TGC, TGT
Ácido Glutámico (Glu, E)	GAA, GAG
Glutamina (Gln, Q)	CAA, CAG
Glicina (Gly, G)	GGA, GGC, GGG i, GGT
Histidina (His, H)	CAC, CAT
Isoleucina (Ile, I)	ATA, ATC, ATT
Leucina (Leu, L)	CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, TTG
Lisina (Lys, K)	AAA, AAG
Metionina (Met, M)	ATG
Fenilalanina (Phe, F)	TTC, TTT
Prolina (Pro, P)	CCA, CCC, CCG, CCT
Serina (Ser, S)	AGC, AGT, TCA, TCC, TCG, TCT
Treonina (Thr, T)	ACA, ACC, ACG, ACT
Triptófano (Trp, W)	TGG
Tirosina (Tyr, Y)	TAC, TAT
Valina (Val, V)	GTA, GTC, GTG, GTT
Señal de terminación (finalización)	TAA, TAG, TGA

35 Una característica importante y bien conocida del código genético es su redundancia, mediante la cual, para la mayoría de los aminoácidos usados para elaborar proteínas, puede emplearse más de un triplete de nucleótidos codificante (ilustrado anteriormente). Por lo tanto, diversas secuencias diferentes de nucleótidos pueden codificar una secuencia de aminoácidos determinada. Dichas secuencias de nucleótidos se consideran funcionalmente equivalentes ya que dan como resultado la producción de la misma secuencia de aminoácidos en todos los organismos (aunque determinados organismos pueden traducir algunas secuencias de un modo más eficaz que lo hacen otros). Adicionalmente, de un modo ocasional, una variante metilada de una purina o pirimidina puede

encontrarse en una secuencia de nucleótidos determinada. Dichas metilaciones no afectan a la relación codificante entre el codón trinucleotídico y el aminoácido correspondiente.

5 Para los ácidos nucleicos, la expresión "homología sustancial" indica que dos ácidos nucleicos, o secuencias designadas de los mismos, cuando se alinean óptimamente y se comparan son idénticos, con inserciones o
 10 deleciones de nucleótidos apropiadas, en al menos aproximadamente el 80 % de los nucleótidos, normalmente al menos aproximadamente el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, o más de los nucleótidos, y más preferentemente al menos aproximadamente 97 %, 98 %, 99 % o más de los nucleótidos. Como alternativa, existe homología sustancial cuando los segmentos se hibridan en condiciones de hibridación selectiva con el complemento de la cadena.

15 El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = n° de posiciones idénticas/total de n° de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que requieren introducirse para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden realizarse usando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes más adelante.

20 El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse usando el programa GAP del paquete del programa informático GCG (disponible en internet en la página web de la compañía GCG), usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos también puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (CABIOS, 4:11 17 (1989)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de restos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444 453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete informático GCG (disponible en internet en la página web de la compañía GCG), usando bien una matriz Blosum 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1,2, 3, 4, 5 o 6.

30 Las secuencias de ácido nucleico y de proteínas de la presente invención pueden usarse adicionalmente como una "secuencia a investigar" para realizar una búsqueda frente a bases de datos públicas para identificar por ejemplo secuencias relacionadas. Dichas búsquedas pueden realizarse usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403 10. Pueden realizarse búsquedas de nucleótidos BLAST con el programa NBLAST, puntuación =100, longitud de palabra =12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las secuencias de ácido nucleico de la invención. 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 proteína de la invención. Para obtener alineamientos con hueco con fines comparativos, puede utilizarse el BLAST con huecos como se describe en Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389 3402.
 35 Cuando se utilizan los programas BLAST y BLAST con huecos, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST) (disponibles en internet en el sitio web NCBI).

40 Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular o en una forma pura parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico está "aislado" o "se hace sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes como, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas convencionales, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, banda CsCl, cromatografía en columna, electroforesis con gel de agarosa y otros bien conocidos en la técnica. Véase, F. Ausubel, *et al.*, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987).

50 Las composiciones de ácido nucleico de la presente invención, aunque a menudo en una secuencia nativa (excepto para los sitios de restricción modificados y similares), de cualquier ADNc, genómico o mezclas de los mismos pueden mutarse de acuerdo con técnicas convencionales para proporcionar secuencias génicas. Para las secuencias codificantes, estas mutaciones, pueden afectar a la secuencia de aminoácidos si se desea. En particular, las secuencias de ADN sustancialmente homólogas a o que derivan de las constantes V, D, J, nativas, y otras de dichas secuencias descritas en el presente documento se contemplan (en las que "derivado" indica que una secuencia es idéntica o modificada de otra secuencia).

60 Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si este afecta a la transcripción de la secuencia. Con respecto a las secuencias reguladoras de la transcripción, unido operativamente significa que las secuencias de ADN que están unidas son contiguas y, cuando sea necesario unir dos regiones codificantes de proteína, contiguas y en fase de lectura. Para secuencias de conmutación, unidas operativamente indica que las secuencias pueden ser capaces de efectuar la recombinación de conmutación.

65

Como se usa en el presente documento, el término “vector” pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico con el cual se ha ligado. Un tipo de vector es un “plásmido” que se refiere a un bucle de ADN monocatenario circular en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma vírico.

5 Determinados vectores son capaces de realizar aplicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora después de la introducción en la célula hospedadora, y por lo tanto replicarse con el genoma hospedador. Adicionalmente, determinados vectores pueden dirigir la expresión de genes con los que están

10 unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento “vectores de expresión recombinantes” (o simplemente, “vectores de expresión”). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector” pueden usarse indistintamente como plásmido en la forma de vector más habitualmente usada. Sin embargo, la invención pretende incluir dichas formas distintas de vectores de expresión, tales como vectores

15 víricos (por ejemplo, retrovirus con defectos de replicación, adenovirus y virus adenoasociados) que realizan funciones equivalentes.

Como se usa en el presente documento, la expresión “célula hospedadora recombinante” (o simplemente “célula hospedadora”), pretende referirse a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante.

20 Debe entenderse que dichos términos se incluyen para hacer referencia no solamente a la célula sujeto particular sino a la descendencia de dicha célula. Dado que determinadas modificaciones pueden producirse en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias en el entorno, dicha descendencia puede, de hecho, no ser beneficiosa para la célula parental, pero aún quedaría dentro de la expresión “célula hospedadora” como se usa en el presente documento.

25 Como se usa en el presente documento, el término “sujeto” incluye cualquier animal humano o no humano. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden usarse para tratar un sujeto con una enfermedad inflamatoria, tal como artritis, por ejemplo, artritis reumatoide. La expresión “animal no humano” incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos tales como primates no humanos, cabra, perro, vaca, pollos, anfibios, reptiles, etc.

30

Como se usa en el presente documento, el término “modular” incluye regulación positiva y negativa, por ejemplo, potenciando o inhibiendo una respuesta.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión “inhibir” incluye la disminución, limitación o bloqueo de, por ejemplo, una acción, función o interacción particular.

Como se usa en el presente documento, la expresión “célula inmunitaria” se refiere a células que desempeñan una función en la respuesta inmunitaria. Las células inmunitarias son de origen hematopoyético e incluyen linfocitos, tales como linfocitos B y T; células citolíticas naturales; células mieloides, tales como monocitos, macrófagos, eosinófilos, mastocitos, basófilos y granulocitos.

40

Como se usa en el presente documento, la expresión “linfocito T” incluye linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+. La expresión linfocito T también incluye linfocitos T de tipo T auxiliar 1, linfocitos T de tipo T auxiliar 2, linfocitos T de tipo T auxiliar 17 y linfocitos T inhibidores. La expresión “célula presentadora de antígeno” incluye células presentadoras de antígeno profesional (por ejemplo, linfocitos B, monocitos, células dendríticas, células de Langerhans) así como otras células presentadoras de antígeno (por ejemplo, queratinocitos, células endoteliales, astrocitos, fibroblastos, oligodendrocitos).

45

Como se usa en el presente documento, la expresión “respuesta inmunitaria” incluye respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos B y/o mediadas por linfocitos T que están influenciadas por la modulación de la coestimulación de linfocitos T. Las respuestas inmunitarias a modo de ejemplo incluyen respuestas de linfocitos T, por ejemplo, producción de citocinas y citotoxicidad celular. Además, la expresión respuesta inmunitaria incluye respuestas inmunitarias que están indirectamente afectadas por la activación de linfocitos T, por ejemplo, producción

50 de anticuerpos (respuestas humorales) y activación de células sensibles a citocinas, por ejemplo, macrófagos.

55

Como se usa en el presente documento, el término “coestimular”, como se usa con referencia a células inmunitarias activadas incluye la capacidad de un polipéptido coestimulador proporcione una segunda señal mediada por un receptor no activador (una “señal coestimuladora”) que induce la proliferación y/o función efectora. Por ejemplo, una señal coestimuladora puede dar como resultado la secreción de citocinas, por ejemplo, en un linfocito T que ha recibido una señal mediada por receptores de linfocitos T. Las células inmunitarias que han recibido una señal mediada por receptores de células, por ejemplo, mediante un receptor de activación se denominan en el presente documento “células inmunitarias activadas”.

60

Como se usa en el presente documento, la expresión “señal inhibidora” se refiere a una señal transmitida mediante un receptor inhibidor (por ejemplo, CTLA4 o PD-1) para un polipéptido en una célula inmunitaria. Dicha señal

65

antagoniza una señal mediante un receptor de activación (por ejemplo, mediante un polipéptido TCR o CD3) y puede dar como resultado, por ejemplo, la inhibición de una segunda generación de mensajeros; una inhibición de proliferación; una inhibición de la función efectora en la célula inmunitaria, por ejemplo, fagocitosis reducida, producción reducida de anticuerpos, citotoxicidad celular reducida, la disminución de la célula inmunitaria para producir mediadores (tales como citocinas (por ejemplo, IL-2) y/o mediadores de respuestas alérgicas); o el desarrollo de anergia.

Como se usa en el presente documento, la expresión “insensible” incluye reactividad de células inmunitarias a estimulación, por ejemplo, mediante un receptor de activación o una citocina. La insensibilidad puede producirse, por ejemplo, debido a exposición a inmunosupresores o exposición a altas dosis de antígeno. Como se usa en el presente documento, el término “anergia” o “tolerancia” incluye refractividad a activación de la estimulación mediada por receptor. Dicha refractividad es generalmente específica de antígeno y persiste después que haya cesado la exposición al antígeno tolerizante. Por ejemplo, la anergia en linfocitos T (en oposición a insensibilidad) se caracteriza por ausencia de producción de citocinas, por ejemplo, IL-2. La anergia de linfocitos T se produce cuando los linfocitos T se exponen a un antígeno y reciben una primera señal (una señal mediada por CD-3 o receptor de linfocitos T) en ausencia de una segunda señal (una señal coestimuladora). En estas condiciones, la reexposición de las células al mismo antígeno (incluso si se produce reexposición en presencia de un polipéptido coestimulador) da como resultado la imposibilidad de producir citocinas y por tanto imposibilidad de proliferar. Sin embargo, los linfocitos T anérgicos pueden proliferar si se cultivan con citocinas (por ejemplo, IL-2). Por ejemplo, la anergia de linfocitos T también puede observarse mediante la ausencia de producción de IL-2 por linfocitos T medidos por ELISA o mediante ensayo de proliferación usando una línea celular indicadora. Como alternativa, puede usarse una construcción génica indicadora. Por ejemplo, los linfocitos T alérgicos no pueden iniciar la transcripción del gen IL-2 inducido o por un promotor heterólogo bajo el control del potenciador del gen IL-2 en 5' o por un multímero de la secuencia AP1 que podría encontrarse dentro del potenciador (Kang *et al.* (1992) *Science* 257:1134).

Como se usa en el presente documento, el término “actividad” cuando se usa con respecto a un polipéptido, por ejemplo, polipéptido PD-1, PD-L1 o PD-L2, incluye actividades que son inherentes en la estructura de la proteína. Por ejemplo, con respecto al ligando PD-1, el término “actividad” incluye la capacidad de modular la coestimulación de las células inmunitarias (por ejemplo, modulando una señal coestimuladora en una célula inmunitaria activada) o modular la inhibición modulando una señal inhibidora en una célula inmunitaria (por ejemplo, conectando un receptor natural en una célula inmunitaria). Los expertos en la técnica reconocerán que cuando un polipéptido ligando de PD-1 se une a un receptor coestimulador, puede generarse una señal coestimuladora en la célula inmunitaria. Cuando un polipéptido ligando PD-1 se une a un receptor inhibidor, se genera una señal inhibidora en la célula inmunitaria. Además, cuando un ligando PD-1 se une a un polipéptido B7-1, puede generarse una señal inhibidora (Butte *et al.* (2007) *Immunity* 27:111).

Con respecto a PD-1, el término “actividad” incluye la capacidad de un polipéptido PD-1 para modular una señal inhibidora en una célula inmunitaria, por ejemplo, acoplando un ligando PD-1 natural en una célula presentadora de antígenos. PD-1 transmite una señal inhibidora a una célula inmunitaria de una manera similar a CTLA4. La modulación de una señal inhibidora en una célula inmunitaria da como resultado la modulación de la proliferación de, y/o secreción de citocinas por, una célula inmunitaria. Por tanto, la expresión “actividad PD-1” incluye la capacidad de un polipéptido PD-1 para unirse a su ligando (o ligandos) natural, a la capacidad de modular las señales coestimuladoras o inhibidoras de las células inmunitarias y la capacidad de modular la respuesta inmunitaria.

Como se usa en el presente documento, el término “interacción”, cuando se refiere al contacto físico (por ejemplo, unión) de las moléculas entre sí. Generalmente, dicha interacción da como resultado una actividad (que produce un efecto biológico) de una o ambas de dichas moléculas. La actividad puede ser una actividad directa de una o ambas de las moléculas (por ejemplo, señal de transducción).

Como alternativa, puede impedirse la unión de una o ambas moléculas en la interacción a un ligando y por tanto mantenerse inactivas con respecto a la actividad de unión a ligando (por ejemplo, uniéndose a su ligando y desencadenando o inhibiendo la coestimulación). La inhibición de dicha interacción da como resultado la alteración de la actividad de una o más moléculas implicadas en la interacción. Potenciar dicha interacción es prolongar o aumentar la probabilidad de dicho contacto físico y prolongar o aumentar la probabilidad de dicha actividad.

Como se usa en el presente documento las formas singulares “un”, “uno/una” y “el” incluyen referentes en plural a menos que el contexto dictamine claramente lo contrario.

Se entiende que aspectos y realizaciones de la invención descritos en el presente documento incluyen “que consisten” y/o “que esencialmente consisten en” aspectos y realizaciones.

Diversos aspectos de la invención se describen con mayor detalle en las siguientes subsecciones.

I. Moléculas de ácido nucleico aisladas

Un aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, los de las Figuras 4-5) o partes biológicamente activas de los mismos, así como fragmentos de ácido nucleico suficientes para su uso como sondas de hibridación para identificar moléculas de ácido nucleico que codifican estos polipéptidos y fragmentos para su uso como cebadores de PCR para la amplificación o mutación de las moléculas de ácido nucleico. Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de ácido nucleico" pretende incluir moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm) y análogos del ADN o ARN generados usando análogos nucleotídicos. La molécula de ácido nucleico puede ser mono o bicatenaria, pero preferentemente es ADN bicatenario.

La expresión "molécula de ácido nucleico aislada" incluye moléculas de ácido nucleico que están separadas de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico. Por ejemplo, con respecto al ADN genómico, el término "aislado" incluye moléculas de ácido nucleico que están separadas del cromosoma con el que está naturalmente asociado el ADN genómico. Preferentemente, una molécula de ácido nucleico "aislada" carece de secuencias que flanquean naturalmente el ácido nucleico (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' de la molécula de ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del cual procede el ácido nucleico. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico "aislada", tal como una molécula de ADNc, puede carecer sustancialmente de cualquier material celular, o medio de cultivo, cuando se produce por técnicas recombinantes, o carece sustancialmente de precursores químicos o de otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente.

Una molécula de ácido nucleico de la presente invención (por ejemplo, las de las Figuras 4-5), o una parte de la misma, puede aislarse usando técnicas de biología molecular convencionales y la información de secuencias proporcionada en el presente documento. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que incluye toda o una parte de secuencias mostradas en las Figuras 4-5 pueden aislarse por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores oligonucleotídicos sintéticos diseñados en función de las secuencias mostradas en las Figuras 4-5.

Una molécula de ácido nucleico de la invención puede amplificarse usando ADNc, ARNm o, como alternativa, ADN genómico, como un molde y cebadores oligonucleotídicos apropiados de acuerdo con técnicas de amplificación por PCR convencionales. La molécula de ácido nucleico así amplificada puede clonarse en un vector apropiado y caracterizarse mediante análisis de secuencia de ADN. Adicionalmente, los oligonucleótidos correspondientes a secuencias de ácido nucleico de la invención pueden prepararse por técnicas de síntesis convencionales, por ejemplo, usando un sintetizador de ADN automático.

En otra realización, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención comprende una molécula de ácido nucleico que es un complemento de una molécula de ácido nucleico de la presente invención (por ejemplo, las de las Figuras 4-5), o una parte de la misma. Una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una molécula de ácido nucleico de la presente invención (por ejemplo, la de las Figuras 4-5), o una parte de la misma, es una que es suficientemente complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en las Figuras 4-5, de tal manera que puede hibridarse con la secuencia de nucleótidos respectiva mostrada en las Figuras 4-5, formando de este modo un dúplex estable.

En el presente documento se desvela una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a toda la longitud de la secuencia de nucleótidos mostrada en las Figuras 2-7, o una parte de cualquiera de estas secuencias de nucleótidos.

Adicionalmente, la molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender solo una parte de una molécula de ácido nucleico de la presente invención (por ejemplo, las de las Figuras 4-5), o una parte de la misma, por ejemplo, un fragmento que puede usarse como una sonda o cebador o un fragmento que codifica una parte de un polipéptido de la invención, por ejemplo, las de las Figuras 4-5. La sonda/cebador comprende normalmente oligonucleótidos purificados sustancialmente. El oligonucleótido comprende normalmente una región de secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con al menos aproximadamente 12 o 15, preferentemente aproximadamente 20 o 25, más preferentemente aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 o 75 nucleótidos consecutivos de una molécula de ácido nucleico de la presente invención (por ejemplo, las de las Figuras 4-5); de una secuencia antisentido de una molécula de ácido nucleico de la presente invención (por ejemplo, las de las Figuras 4-5); o de un mutante de una molécula de ácido nucleico de la presente invención (por ejemplo, las de las Figuras 4-5).

Las sondas basadas en una molécula de ácido nucleico de la presente invención (por ejemplo, las de las Figuras 4-5) pueden usarse para detectar transcritos o secuencias genómicas que codifican los mismos polipéptidos u homólogos. En una realización descrita en el presente documento, la sonda comprende adicionalmente un grupo marcador unido a la misma, por ejemplo, el grupo marcador puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático.

65

Un fragmento de ácido nucleico que codifica una "parte biológicamente activa de un polipéptido de la invención" puede prepararse aislando una parte de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico de la presente invención (por ejemplo, la de las Figuras 4-5) que codifica un polipéptido que tiene una actividad biológica de un polipéptido de la invención (por ejemplo, la capacidad de unirse a su diana antigénica), expresando la parte codificada del polipéptido de la invención (por ejemplo, por expresión recombinante *in vitro*) y evaluando la actividad de la parte codificada del polipéptido de la invención.

La invención incluye adicionalmente moléculas de ácido nucleico que se diferencian de la secuencia (o secuencias) de nucleótidos mostrada en las Figuras 4-5 debido a la degeneración del código genético, y por tanto codifican los mismos polipéptidos que los codificados por la secuencia de nucleótidos respectiva mostrada en las Figuras 4-5. En otra realización, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención (por ejemplo, las de las Figuras 4-5).

Las moléculas de ácido nucleico correspondientes a homólogos de una molécula de ácido nucleico de la presente invención (por ejemplo, las de las Figuras 4-5) pueden aislarse en función de su homología con los ácidos nucleicos desvelados en el presente documento usando los ADNc desvelados en el presente documento, o una parte de los mismos, como una sonda de hibridación de acuerdo con técnicas de hibridación convencionales en condiciones de hibridación rigurosas.

Por consiguiente, en otra realización, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención tiene al menos una longitud de 15, 20, 25, 30 o más nucleótidos e hibrida en condiciones rigurosas con la molécula de ácido nucleico que comprende una molécula de ácido nucleico de la presente invención (por ejemplo, las de las Figuras 4-5).

Como se usa en el presente documento, la expresión "hibrida en condiciones rigurosas" pretende describir condiciones de hibridación y lavado en las que las secuencias de nucleótidos que son significativamente idénticas u homólogas entre sí permanecen hibridadas entre sí. Preferentemente, las condiciones son tal que las secuencias al menos aproximadamente el 70 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 80 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente el 85 % o 90 % idénticas entre sí permanecen hibridadas entre sí. Los expertos en la técnica conocen dichas condiciones rigurosas y pueden encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Inc. (1995), apartados 2, 4 y 6. En Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), capítulos 7, 9 y 11 pueden encontrarse condiciones rigurosas adicionales. Un ejemplo no limitante de condiciones de hibridación rigurosas incluye hibridación en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 4x o 6x, a aproximadamente 65-70 °C (o hibridación en SSC 4x más formamida al 50 % a aproximadamente 42-50 °C) seguido de uno o más lavados en SSC 1x, a aproximadamente 65-70 °C. Un ejemplo adicional no limitante de condiciones de hibridación rigurosas incluye hibridación en SSC 6x a 45 °C, seguido de uno o más lavados en SSC 0,2x, SDS 0,1 % a 65 °C. Un ejemplo no limitante de condiciones de hibridación muy rigurosas incluye hibridación en SSC 1x, a aproximadamente 65-70 °C (o hibridación en SSC 1x más formamida al 50 % a aproximadamente 42-50 °C), seguido de uno o más lavados en SSC 0,3x a aproximadamente 65-70 °C. Un ejemplo no limitante de condiciones de hibridación de rigurosidad reducida incluye hibridación en SSC 4x o 6x, a aproximadamente 50-60 °C (o como alternativa hibridación en SSC 6x más formamida al 50 % a aproximadamente 40-45 °C) seguido de uno o más lavados en 2x, a aproximadamente 50-60 °C. Los intervalos intermedios de los valores indicados anteriormente, por ejemplo, a 65-70 °C o a 42-50 °C también pretenden incluirse en la presente invención. El SSPE (1x SSPE en NaCl 0,15M, NaH₂PO₄ 10 mM y EDTA 1,25 mM, pH 7,4) puede sustituirse por SSC (SSC 1x es NaCl 0,15M y citrato de sodio 15 mM) en los tampones de hibridación y lavado; los lavados se realizan durante 15 minutos después de finalizar la hibridación. La temperatura de hibridación para híbridos que se espera que sea menor de 50 pares de bases de longitud debe ser 5-10 °C menor que la temperatura de fusión (T_f) del híbrido, donde T_f se determina de acuerdo con las siguientes ecuaciones. Para híbridos menores de 18 pares de bases de longitud, T_f (°C) = $2(N.º \text{ de bases } A + T) + 4(N.º \text{ de bases } G + C)$. Para híbridos entre 18 y 49 pares de bases de longitud, T_f (°C) = $81,5 + 16,6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41(\%G+C) - (600/N)$, donde N es el número de bases en el híbrido; y $[\text{Na}^+]$ es la concentración de iones de sodio en el tampón de hibridación ($[\text{Na}^+]$ para SSC 1x=0,165M). El experto en la técnica también reconocerá que pueden añadirse reactivos adicionales a los tampones de hibridación y/o lavado para disminuir la hibridación inespecífica de las moléculas de ácido nucleico con membranas, por ejemplo, membranas de nitrocelulosa o nailon, incluyendo, pero sin limitación, agentes bloqueantes (por ejemplo, BSA o ADN transportador de esperma de salmón o arenque), detergentes (por ejemplo, SDS), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), Ficoll, PVP y similar. Cuando se usan membranas de nailon, en particular, un ejemplo no limitante adicional de condiciones de hibridación rigurosas es la hibridación en NaH₂PO₄ 0,25-0,5M, SDS al 7 % a aproximadamente 65°C, seguido de uno o más lavados en NaH₂PO₄ 0,02M, SDS al 1 % a 65°C, véase, por ejemplo, Church y Gilbert (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1991-1995 (o, como alternativa, SSC 0,2x, SDS al 1 %).

El experto en la materia apreciará también que pueden introducirse cambios por mutación en una molécula de ácido nucleico desvelada en el presente documento (por ejemplo, las de las Figuras 2-7), conduciendo por tanto a cambios en la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos codificados desvelados en el presente documento, sin alterar la capacidad funcional de los polipéptidos. Por ejemplo, las sustituciones de nucleótidos que conducen a sustituciones de aminoácidos en restos de aminoácidos "no esenciales" pueden realizarse en una molécula de ácido nucleico desvelada en el presente documento (por ejemplo, las de las Figuras 2-7). Un resto de aminoácido "no esencial" es

un resto que puede alterarse de una molécula de ácido nucleico desvelada en la presente invención (por ejemplo, las de las Figuras 2-7) sin alterar la actividad biológica, mientras que para la actividad biológica se requiere un aminoácido "esencial". Por ejemplo, los restos de aminoácido que están conservados entre los polipéptidos desvelados en el presente documento, por ejemplo, los que se requieren para la unión de los polipéptidos con su antígeno diana, se prevé que sean particularmente poco susceptibles a la alteración.

Por consiguiente, en el presente documento también se desvelan moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos (por ejemplo, los de las Figuras 2-7) que contienen cambios en restos de aminoácido que no son esenciales para la actividad. Dichos polipéptidos difieren en la secuencia de aminoácidos de los de las Figuras 2-7, pero conservan actividad biológica. En una realización desvelada en el presente documento, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido, donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 71 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a las de las Figuras 2-7.

Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido idéntico a los polipéptidos de las Figuras 2-7, puede crearse introduciendo una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de las de las Figuras 2-7, de tal manera que una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácido se introducen en el polipéptido codificado. Pueden introducirse mutaciones en las moléculas de ácido nucleico desveladas en el presente documento (por ejemplo, las de las Figuras 2-7) mediante técnicas convencionales, tales como mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis mediada por PCR. En una realización se realizan sustituciones de aminoácidos conservativas en uno o más restos de aminoácido predichos no esenciales. Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una en la que el resto de aminoácido se reemplaza por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han identificado familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por tanto, un resto de aminoácido no esencial predicho en un polipéptido desvelado en el presente documento (por ejemplo, los de las Figuras 2-7) puede reemplazarse por otro resto de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. Como alternativa, pueden introducirse mutaciones al azar a lo largo de toda o parte de una o más moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, las de las Figuras 2-7), tal como mediante mutagénesis por saturación, y los mutantes resultantes pueden explorarse con respecto a su actividad biológica para identificar mutantes que conserven actividad. Después de la mutagénesis de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, las de las Figuras 2-7), el polipéptido codificado puede expresarse de manera recombinante y puede determinarse la actividad del polipéptido.

Como se describe en el presente documento, un polipéptido mutante puede ensayarse con respecto a la capacidad de unirse a y/o modular la actividad de PD-1 natural (por ejemplo, ligandos de PD-1) o un compañero del ligando PD-1 (por ejemplo, PD-1 y B7-1), modular señalización intra o intercelular, modular activación de linfocitos T y/o modular la respuesta inmunitaria de un organismo.

En el presente documento también se desvelan moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican proteínas de fusión. Dichas moléculas de ácido nucleico que comprenden al menos una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido desvelado en el presente documento (por ejemplo, los de las Figuras 2-7) unida operativamente a una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido desvelado en el presente documento (por ejemplo, los de las Figuras 2-7) pueden prepararse mediante técnicas de ADN recombinantes convencionales.

Las características de expresión de una molécula de ácido nucleico de la presente invención (por ejemplo, las de las Figuras 4-5) en una línea celular o microorganismo pueden modificarse insertando un elemento regulador de ADN heterólogo en el genoma de una línea celular estable o en microorganismos clonados de tal manera que el elemento regulador insertado está unido operativamente con las moléculas de ácido nucleico de la presente invención (por ejemplo, las de las Figuras 4-5). Por ejemplo, un elemento regulador heterólogo puede insertarse en una línea celular estable o microorganismo clonado, de tal manera que esté unido operativamente con una molécula de ácido nucleico de la presente invención (por ejemplo, las de las Figuras 4-5), usando técnicas, tales como recombinación homóloga dirigida, que son muy conocidas por los expertos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Chappel, patente de Estados Unidos N.º 5.272.071; publicación PCT N.º WO 91/06667, publicada el 16 de mayo de 1991.

60 II. Moléculas polipeptídicas aisladas

Un aspecto de la invención se refiere a polipéptidos aislados de la presente invención (incluyendo anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en el presente documento, y los de las Figuras 4-5) y partes biológicamente activas de los mismos. En una realización, los polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, los de las Figuras 4-5), y partes biológicamente activas de los mismos pueden aislarse de fuentes de células o tejidos mediante un esquema de purificación apropiado usando técnicas de purificación de proteínas

convencionales. En otra realización, los polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, los de las Figuras 4-5) y partes biológicamente activas de los mismos se produce mediante técnicas de ADN recombinante. Como alternativa, los polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, los de las Figuras 4-5), y partes biológicamente activas de los mismos pueden sintetizarse químicamente usando técnicas de síntesis peptídica convencional.

5 Un polipéptido "aislado" o "purificado" o parte biológicamente activo del mismo carece sustancialmente de material celular u otras proteínas contaminantes de la fuente celular o tisular de la que proceden los polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, los de las Figuras 4-5), o carece sustancialmente de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La frase "carece sustancialmente de material celular" incluye preparaciones de uno o más polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, los de las Figuras 4-5), y partes biológicamente activas de los mismos, en los que los polipéptidos se separan de los componentes celulares de las células partir de las cuales se produce de manera recombinante o se aísla. En una realización, la frase "carece sustancialmente de material celular" incluye preparaciones de uno o más polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, los de las Figuras 4-5), y partes biológicamente activas de los mismos que tienen una cantidad menor de aproximadamente 30 % (en peso seco) de proteínas que no son de la presente invención (también denominados en el presente documento una "proteína contaminante"), más preferentemente una cantidad menor de aproximadamente 20 % de proteínas que no son de la presente invención, aún más preferentemente una cantidad de proteínas menor de aproximadamente 10 % que no son de la presente invención, y lo más preferentemente una cantidad de proteínas menor de aproximadamente 5 % que no son de la presente invención. Cuando los polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, los de las Figuras 4-5) o una parte biológicamente activa de los mismos se produce de manera recombinante, también es preferente que carezca sustancialmente de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20 %, más preferentemente menos de aproximadamente 10 % y lo más preferentemente menos de aproximadamente 5 % del volumen de la preparación de proteína.

25 La expresión "carece sustancialmente de precursores químicos o de otros productos químicos" incluye preparaciones de uno o más polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, los de las Figuras 4-5), o una parte biológicamente activa de los mismos en la que el polipéptido se separa de precursores químicos o de otros productos químicos que están implicados en la síntesis del polipéptido. En una realización, la frase "carece sustancialmente de precursores químicos o de otros productos químicos" incluye preparaciones de uno o más polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, los de las Figuras 4-5) o parte biológicamente activa de los mismos que tienen una cantidad menor de aproximadamente 30 % (en peso seco) de precursores químicos o de proteínas que no son de la presente invención, más preferentemente una cantidad menor de aproximadamente 20 % de precursores químicos o de proteínas no de la presente invención, incluso más preferentemente una cantidad menor de aproximadamente 10 % de precursores químicos o de proteínas que no son de la presente invención, y lo más preferentemente una cantidad menor de aproximadamente 5 % de precursores químicos o de proteínas que no son de la presente invención.

40 Como se usa en el presente documento, una "parte biológicamente activa" de uno o más polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, los de las Figuras 4-5), incluyen polipéptidos que participan en una interacción entre una molécula PD-L1 y una molécula no PD-L1, por ejemplo, un ligando natural de ligandos PD-1, por ejemplo, PD-1 o B7-1, respectivamente. Las partes biológicamente activas de uno o más polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, los de las Figuras 4-5) incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente idénticas a o procedentes de la secuencia de aminoácidos de uno o más polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, los de las Figuras 4-5), que incluyen menos aminoácidos en comparación con uno o más polipéptidos de longitud completa respectivos de la presente invención (por ejemplo, los de las Figuras 4-5), y exhiben al menos una actividad del respectivo polipéptido (o polipéptidos) de la presente invención (por ejemplo, los de las Figuras 4-5). En una realización, partes biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con la capacidad de unirse específicamente a PD-1 o a un ligando de PD-L1 de acuerdo con el antígeno, respectivamente, con el cual este se suscitó o se diseñó para unirse. Las partes biológicamente activas de uno o más polipéptidos de la invención (por ejemplo, los de las Figuras 4-5) pueden usarse como dianas para el desarrollo de agentes que modulan una actividad mediada por PD-1 o PD-L1, por ejemplo, activación o supresión de células inmunitarias.

55 En una realización, uno o más polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, los de las Figuras 4-5) tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en las Figuras 4-5. En el presente documento también se describe que el polipéptido es sustancialmente idéntico a uno o más polipéptidos mostrados en las Figuras 2-7 y conserva la actividad funcional del uno o más polipéptidos respectivos mostrados en las Figuras 2-7, pero se diferencia en la secuencia de aminoácidos debido a la mutagénesis, como se describe con detalle en el subapartado 1 anterior. Por consiguiente, en el presente documento también se describe un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 71 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 % 60 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % o más idéntica a uno o más polipéptidos mostrados en las Figuras 2-7.

65 Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean con fines de comparación óptimos (por ejemplo, puede introducirse huecos en una o en ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácido o ácido nucleico para el alineamiento óptimo pueden no considerarse secuencias que no son idénticas para fines comparativos). Como se describe en el

presente documento, la longitud de una secuencia de referencia alineada con fines comparativos tiene una longitud de al menos 30 %, preferentemente al menos 40 %, más preferentemente al menos 50 %, incluso más preferentemente al menos 60 % e incluso más preferentemente al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % de la longitud de la secuencia de referencia. Después, los restos de aminoácidos o nucleótidos en posiciones de aminoácidos o nucleótidos correspondientes se comparan. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se usa en el presente documento, una "identidad" de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a una "homología" de aminoácido o ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que se necesita introducir para el alineamiento óptimo de las dos secuencias.

La divulgación también proporciona proteínas quiméricas o de fusión. Como se usa en el presente documento, una "proteína quimérica" o "proteína de fusión" comprende uno o más polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, los de las Figuras 4-5) unidos operativamente a un polipéptido que no es de la presente invención. Un "polipéptido (polipéptidos) de la presente invención" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un polipéptido mostrado en las Figuras 4-5, mientras que un "polipéptido que no es de la presente invención" se refiere a un polipéptido que no tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un polipéptido que no es sustancialmente homólogo a un polipéptido mostrado en las Figuras 4-5, por ejemplo, un polipéptido que es diferente de un polipéptido mostrado en las Figuras 4-5 y que procede del mismo organismo o de un organismo diferente. Dentro de la proteína de fusión, la expresión "unido operativamente" pretende indicar que el polipéptido (o polipéptidos) de la presente invención y que el polipéptido (o los polipéptidos) no descritos en la presente invención se fusionan en fase entre sí. El polipéptido o polipéptidos que no son de la presente invención pueden fusionarse con el extremo N o extremo C del polipéptido (o polipéptidos) de la presente invención y corresponde a una fracción que altera la solubilidad, afinidad de unión, estabilidad o valencia del polipéptido (o polipéptidos) de la presente invención.

Por ejemplo, en una realización, la proteína de fusión es una proteína de fusión GST con un polipéptido (o polipéptidos) de la presente invención. Dichas proteínas de fusión pueden facilitar la purificación de los polipéptidos recombinantes de la invención. En otra realización, la proteína de fusión contiene una secuencia de señal heteróloga en su extremo N. En determinadas células hospedadoras (por ejemplo, células hospedadoras de mamífero), la expresión y/o secreción del polipéptido (o polipéptidos) de la presente invención puede aumentarse a través del uso de una secuencia señal heteróloga.

Un polipéptido (o polipéptidos) quimérico o de fusión de la presente divulgación (por ejemplo, los de las Figuras 2-7) pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante convencionales. Por ejemplo, fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias polipeptídicas se ligan entre sí en fase de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo, empleando términos de extremo romo o de extremo escalonado para el ligamiento, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, rellenado de extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa de alcalina para impedir la unión no deseable, y ligamiento enzimático. En otra realización, el gen de fusión puede sintetizarse por técnicas convencionales incluyendo sintetizadores de ADN automáticos. Como alternativa, la amplificación por PCR de fragmentos génicos puede realizarse usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que posteriormente pueden hibridarse y reamplificarse para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons: 1992). Además, muchos vectores de expresión se encuentran disponibles en el mercado que ya codifican un resto de fusión (por ejemplo, un polipéptido GST).

Las secuencias de aminoácidos del polipéptido (o polipéptidos) de la presente invención (por ejemplo, los de las Figuras 4-5) identificados en el presente documento permitirán a los expertos en la técnica producir polipéptidos correspondientes al polipéptido (o polipéptidos) de la presente invención (por ejemplo, los de las Figuras 4-5). Dichos polipéptidos pueden producirse en células hospedadoras procariontas o eucariotas por expresión de polinucleótidos que codifican uno o más polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, los de las Figuras 4-5). Como alternativa, dichos péptidos pueden sintetizarse por métodos químicos. En la técnica se conocen bien métodos para la expresión de polipéptidos heterólogos en hospedadores recombinantes, síntesis química de polipéptidos y traducción *in vitro* y se describen adicionalmente en Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1989), 2ª Ed., Cold Spring Harbor, N. Y.; Berger y Kimmel, *Methods in Enzymology*, Volumen 152, *Guide to Molecular Cloning Techniques* (1987), Academic Press, Inc., San Diego, Calif.; Merrifield, J. (1969) *J. Am. Chem. Soc.* 91:501; Chaiken I. M. (1981) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 11:255; Kaiser *et al.* (1989) *Science* 243:187; Merrifield, B. (1986) *Science* 232:342; Kent, S. B. H. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* 57:957; y Offord, R. E. (1980) *Semisynthetic Proteins*, Wiley Publishing).

III. Anticuerpos contra PD-L1

Los anticuerpos contra PD-L1 descritos en el presente documento pueden producirse usando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento o conocidos en la técnica. Los anticuerpos monoclonales (por ejemplo,

anticuerpos humanos) de la invención pueden producirse usando diversas técnicas conocidas, tales como la técnica de hibridación de células somáticas convencional descritas por Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Aunque se prefieren los procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, también pueden emplearse otras técnicas para la producción de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, transformación vírica u oncogénica de linfocitos B, técnica de presentación en fagos usando bibliotecas de genes de anticuerpos humanos.

Un método para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales de la invención es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es muy conocida en la técnica, incluyendo protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento y la fusión de esplenocitos.

Los anticuerpos policlonales pueden prepararse como se ha descrito anteriormente inmunizando un sujeto adecuado con un inmunogén polipeptídico. La titulación del anticuerpo polipeptídico en el sujeto inmunizado puede monitorizarse a lo largo del tiempo por técnicas convencionales, tales como con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando un polipéptido inmovilizado. Si se desea, el anticuerpo dirigido contra el antígeno puede aislarse del mamífero (por ejemplo, de la sangre) y purificarse adicionalmente por técnicas muy conocidas, tales como cromatografía con proteína A para obtener la fracción de IgG. En un momento apropiado después de la inmunización, por ejemplo, cuando los títulos de anticuerpo son más elevados, las células productoras de anticuerpo pueden obtenerse del sujeto y usarse para preparar anticuerpos monoclonales por técnicas convencionales, tales como la técnica de hibridoma originalmente descrita por Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495-497 (véase también Brown *et al.* (1981) *J. Immunol.* 127:539-46; Brown *et al.* (1980) *J. Biol. Chem.* 255:4980-83; Yeh *et al.* (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:2927-31; y Yeh *et al.* (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75), la técnica de hibridoma de linfocitos B humano más reciente (Kozbor *et al.* (1983) *Immunol. Today* 4:72), la técnica de EBV-hibridoma (Cole *et al.* (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) o técnicas de trioma. La tecnología para producir hibridomas de anticuerpo monoclonal es muy conocida (véase en líneas generales Kenneth, R. H. en *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., Nueva York, Nueva York (1980); Lerner, E. A. (1981) *Yale J. Biol. Med.* 54:387-402; Geffer, M. L. *et al.* (1977) *Somatic Cell Genet.* 3:231-36). En resumen, una línea celular inmortal (normalmente un mieloma) se fusiona con linfocitos (normalmente esplenocitos) de un mamífero inmunizado con un inmunogén como se describe anteriormente, y el sobrenadante del cultivo de las células de hibridoma resultantes se exploran para identificar un hibridoma productor de un anticuerpo monoclonal que se une al antígeno polipeptídico, preferentemente de un modo específico.

Cualquiera de los muchos protocolos bien conocidos usados para fusionar linfocitos y líneas celulares inmortalizadas puede aplicarse para el fin de generar un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 (véase, por ejemplo, Galfre, G. *et al.* (1977) *Nature* 266:55052; Geffer *et al.* (1977) citado anteriormente; Lerner (1981) citado anteriormente; Kenneth (1980) citado anteriormente). Además, el experto habitual apreciará que hay muchas variaciones de estos métodos que también serían útiles. Normalmente, la línea celular inmortal (por ejemplo, una línea celular de mieloma) procede de la misma especie de mamífero que la de los linfocitos. Por ejemplo, pueden prepararse hibridomas murinos fusionando linfocitos de un ratón inmunizado con una preparación inmunogénica de la presente invención con una línea celular de ratón inmortalizada. Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son líneas celulares de mieloma de ratón que son sensibles a medios de cultivo que contienen hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"). Como un compañero de fusión puede usarse cualquiera de diversas líneas de células de mieloma de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo, las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp2/O-Ag14. Estas líneas de mieloma se encuentran disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Rockville, Md. Normalmente, las células de mieloma de ratón sensibles a HAT se fusionan con esplenocitos de ratón usando polietilenglicol ("PEG"). Las células de hibridoma resultantes de la fusión se seleccionan después usando medio HAT, que destruye las células de mieloma no fusionadas y fusionadas de una manera no productiva (los esplenocitos no fusionados mueren después de varios días porque no se transforman). Las células de hibridoma productoras de un anticuerpo monoclonal de la invención se detectan explorando los sobrenadantes de cultivo de hibridoma para anticuerpos que se unen a un polipéptido determinado, por ejemplo, usando un ensayo ELISA convencional.

Como una alternativa a la preparación de hibridomas que segregan anticuerpos monoclonales, puede identificarse y aislarse un anticuerpo monoclonal específico para uno de los polipéptidos descritos anteriormente explorando una biblioteca de inmunoglobulina combinatoria recombinante (por ejemplo, una fagoteca de anticuerpos) con el polipéptido apropiado para aislar de este modo los miembros de la biblioteca de inmunoglobulina que se unen al polipéptido. En el comercio se dispone de kits para generar y explorar bibliotecas de presentación en fagos (por ejemplo, el Pharmacia *Recombinant Phage Antibody System*, N.º de catálogo 27-9400-01; y el kit de presentación en fagos *SurfZAP™* de Stratagene, N.º de catálogo 240612). Adicionalmente, pueden encontrarse ejemplos de métodos y reactivos particularmente adecuados para su uso en la generación y exploración de una biblioteca de presentación en fagos, por ejemplo, Ladner *et al.* Patente de Estados Unidos 5.223.409; Kang *et al.* Publicación internacional N.º WO 92/18619; Dower *et al.* Publicación internacional N.º WO 91/17271; Winter *et al.* Publicación internacional N.º WO 92/20791; Markland *et al.* Publicación internacional N.º WO 92/15679; Breitlina *et al.* Publicación internacional WO 93/01288; McCafferty *et al.* Publicación internacional N.º WO 92/01047; Garrard *et al.* Publicación internacional N.º WO 92/09690; Ladner *et al.* Publicación internacional N.º WO 90/02809; Fuchs *et al.* (1991) *Biotechnology* (NY) 9:1369-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum. Antibody. Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J.* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896;

Clarkson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580; Garrard *et al.* (1991) *Biotechnology (NY)* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:4133-4137; Barbas *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982; y McCafferty *et al.* (1990) *Nature* 348:552-554.

5 Adicionalmente, pueden generarse anticuerpos PD-L1 recombinantes, tales como anticuerpos monoclonales compuestos y humanizados, que pueden prepararse usando técnicas de ADN recombinante convencionales. Dichos anticuerpos monoclonales compuestos y humanizados pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinantes conocidas en la técnica, por ejemplo, usando métodos descritos en Robinson *et al.* Publicación de patente internacional WO 87/002671; Akira *et al.* Solicitud de patente europea 184.187; Taniguchi, M. Solicitud de patente europea 171.496; Morrison *et al.* Solicitud de patente europea 173.494; Neuberger *et al.* Solicitud PCT WO 10 86/01533; Cabilly *et al.* Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567; Cabilly *et al.* Solicitud de patente europea 125.023; Better *et al.* (1988) *Science* 240:1041-1043; Liu *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:214-218; Nishimura *et al.* (1987) *Cancer Res.* 47:999-1005; Wood *et al.* (1985) *Nature* 314:446-449; and Shaw *et al.* (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 15 80:1553-1559; Morrison, S. L. (1985) *Science* 229:1202-1207; Oi *et al.* (1986) *Biotechniques* 4:214; Winter U.S. Patent 5,225,539; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:552-525; Verhoeyan *et al.* (1988) *Science* 239:1534; y Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060.

Además, pueden prepararse anticuerpos humanizados de acuerdo con protocolos convencionales tales como los 20 desvelados en la patente de Estados Unidos 5.565.332. En otra realización, pueden producirse cadenas de anticuerpo o miembros de pares de unión específicos por recombinación entre vectores que comprenden ácido nucleico que codifican una fusión de una cadena polipeptídica de un miembro de par de unión específico y un componente de un empaquetado de presentación genérica replicable y vectores que contienen moléculas de ácido nucleico que codifican una segunda cadena polipeptídica de un solo miembro de par de unión usando técnicas 25 conocidas en la materia, por ejemplo, como se describe en las patentes de Estados Unidos 5.565.332, 5.871.907 o 5.733.743. En la técnica también se conoce el uso de anticuerpos intracelulares que inhiben la función de las proteínas en una célula (véase, por ejemplo, Carlson, J. R. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:2638-2646; Biocca, S. *et al.* (1990) *EMBO J.* 9:101-108; Werge, T. M. *et al.* (1990) *FEBS Lett.* 274:193-198; Carlson, J. R. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 90:7427-7428; Marasco, W. A. *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 30 90:7889-7893; Biocca, S. *et al.* (1994) *Biotechnology (NY)* 12:396-399; Chen, S.-Y. *et al.* (1994) *Hum. Gene Ther.* 5:595-601; Duan, L. *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 91:5075-5079; Chen, S.-Y. *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 91:5932-5936; Beerli, R. R. *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:23931-23936; Beerli, R. R. *et al.* (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204:666-672; Mhashilkar, A. M. *et al.* (1995) *EMBO J.* 14:1542-1551; Richardson, J. H. *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 92:3137-3141; publicación PCT n.º WO 35 94/02610 por Marasco *et al.*; y publicación PCT n.º WO 95/03832 por Duan *et al.*).

En otra realización, pueden generarse anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra PD-L1 usando ratones transgénicos o transcromosómicos que llevan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. En una realización, ratones transgénicos, denominados en el presente documento "ratones HuMAb" que contienen un miniloci de gen de inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina de cadena ligera κ y pesada (μ y γ) humana no ordenada, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci de cadena μ y κ 40 endógenos (Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856 859). Por consiguiente, los ratones exhiben expresión reducida de IgM de ratón o κ , y en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena ligera y pesada humana introducidos se someten a modificación de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgGK humanos de alta afinidad (Lonberg, N. *et al.* (1994), citado anteriormente; revisado en Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49 101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol. Vol. 13:* 65 93, y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) *Ann. N. Y Acad. Sci* 764:536 546). La preparación de ratones HuMAb se describe en Taylor, L. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287 6295; Chen, J. *et al.* (1993) *International Immunology* 5: 45 647 656; Tuailleon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 90:3720 3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* 4:117 123; Chen, J. *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 821 830; Tuailleon *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152:2912 2920; Lonberg *et al.*, (1994) *Nature* 368(6474): 856 859; Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49 101; Taylor, L. *et al.* (1994) *International Immunology* 6: 579 591; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol. Vol. 13:* 65 93; Harding, F. y Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci* 764:536 546; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845 851. Véase además, las Patentes de Estados Unidos n.º 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 de Lonberg y Kay, y GenPharm internacional; Patente de Estado Unidos n.º 5.545.807 de Surani *et al.*; publicación internacional n.º WO 50 98/24884, publicada el 11 de junio de 1998; WO 94/25585, publicada el 10 de noviembre de 1994; WO 93/1227, publicada el 24 de junio de 1993; WO 92/22645, publicado el 23 de diciembre de 1992; WO 92/03918, publicado el 19 de Marzo de 1992.

60 En otra realización, un anticuerpo para su uso en la invención es un anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico tiene sitios de unión para dos antígenos diferentes dentro de un solo polipéptido de anticuerpo. La unión antigénica puede ser simultánea o secuencial. Triomas e híbridos son dos ejemplos de líneas celulares que pueden secretar anticuerpos biespecíficos. Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos producidos por un hibridoma híbrido o 65 un trioma se desvelan en la Patente de Estados Unidos n.º 4.474.893. Se han construido anticuerpos biespecíficos por medios químicos (Staerz *et al.* (1985) *Nature* 314:628, y Perez *et al.* (1985) *Nature* 316:354) y tecnología de

hibridoma (Staerz y Bevan (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 83:1453, y Staerz y Bevan (1986) Immunol. Today 7:241). También se describen anticuerpos biespecíficos en la patente de Estado Unidos n.º 5.959.084. En la patente de Estado Unidos 5.798.229 se describen fragmentos de anticuerpos biespecíficos. También pueden generarse agentes biespecíficos preparando heterohíbridomas fusionando híbridomas u otras células preparando diferentes anticuerpos, seguido por identificación de clones que producen y co-ensamblan ambos anticuerpos. También pueden generarse por conjugación química o genética de cadenas de inmunoglobulina completa o partes de las mismas tales como secuencias Fab y Fv. El componente anticuerpo puede unirse a PD-L1.

Otro aspecto de la invención se refiere a anticuerpos polipeptídicos anti- PD-L1 que pueden obtenerse mediante un proceso que comprende inmunizar a un animal con un polipéptido PD-L1 inmunogénico, respectivamente, o con una parte inmunogénica; y después aislar del animal anticuerpos que se unen específicamente al polipéptido.

En otro aspecto más de la invención, pueden usarse secuencias de anticuerpos parciales o conocidas para generar y/o expresar nuevos anticuerpos. Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de restos de aminoácido que están localizados en las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácido en las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que secuencias fuera de las CDR. Dado que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las interacciones entre anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imiten las propiedades de anticuerpos específicos de origen natural construyendo vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo específico de origen natural injertado en secuencias marco conservadas a partir de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades (véase, por ejemplo, Riechmann, L. *et al.*, 1998, Nature 332:323 327; Jones, P. *et al.*, 1986, Nature 321:522 525; y Queen, C. *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 86:10029 10033). Dichas secuencias marco conservadas pueden obtenerse en bases de datos de ADN públicas que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de línea germinal o no germinal. Estas secuencias de línea germinal diferirán de las secuencias de genes de anticuerpos maduros porque no incluyen genes variables completamente ensamblados, que se forman mediante unión V(D)J durante la maduración de linfocitos B. Las secuencias de genes de línea germinal también diferirán de las secuencias de un anticuerpo del repertorio secundario de alta afinidad en individuos homogéneamente a través de la región variable. Por ejemplo, las mutaciones somáticas son relativamente poco frecuentes en la parte amino-terminal de la región marco conservada. Por ejemplo, las mutaciones somáticas son relativamente poco frecuentes en la parte amino-terminal de la región 1 marco conservada y en la parte carboxilo terminal de la región marco conservada 4. Además, muchas mutaciones somáticas no modifican significativamente las propiedades de unión del anticuerpo. Por esta razón, no es necesario obtener toda la secuencia de ADN de un anticuerpo particular para recrear un anticuerpo recombinante intacto que tenga propiedades de unión similares a las del anticuerpo original (véase el documento WO 99/045962 publicado el 16 de septiembre de 1999). La secuencia de cadena ligera y pesada parcial que abarca las regiones CDR es normalmente suficiente para esta finalidad. La secuencia parcial se usa para determinar qué variable de línea germinal y/o línea no germinal y unión de segmentos génicos contribuye a los genes variables de anticuerpo recombinado. La secuencia de línea germinal y/o línea no germinal se usa después para llenar partes que faltan de las regiones variables. Las secuencias líder de cadena pesada y ligera se escinden durante la maduración de las proteínas y no contribuyen a las propiedades del anticuerpo final. Para añadir secuencias que faltan, pueden combinarse secuencias de ADN clonadas con oligonucleótidos sintéticos por ligamiento o amplificación por PCR. Como alternativa, toda la región variable puede sintetizarse como un conjunto de oligonucleótidos cortos, solapantes, y combinarse mediante amplificación PCR para crear un clon de región variable completamente sintético. Este proceso tiene determinadas ventajas tales como eliminación o inclusión o sitios de restricción particulares, u optimización de codones particulares. El proceso también puede usarse para explorar bibliotecas de secuencias que codifican inmunoglobulinas particulares en una especie (por ejemplo, ser humano) para diseñar secuencias que codifican inmunoglobulinas afines de secuencias de anticuerpo conocidas en otras especies (por ejemplo, ratón) (véase, por ejemplo, el apartado de ejemplos más adelante).

Las secuencias de nucleótidos de transcritos de cadena pesada y ligera de un híbrido se usan para diseñar un conjunto solapante de oligonucleótidos sintéticos para crear secuencias V sintéticas con idénticas capacidades codificantes de aminoácidos como las secuencias naturales. Las secuencias de cadena pesada y kappa sintéticas pueden diferenciarse de las secuencias naturales de tres maneras: cadenas de bases de nucleótidos repetidas se interrumpen para facilitar la síntesis de oligonucleótidos y amplificación PCR; se incorporan sitios óptimos de inicio de la traducción de acuerdo con las normas de Kozak (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266L19867019870); y se diseñan genéticamente sitios HindIII aguas arriba de los sitios de inicio de la traducción.

Para las regiones variables tanto de cadena ligera como pesada, las secuencias de la cadena codificante optimizada, y no codificante correspondiente, se degradan en 30-50 nucleótidos aproximadamente el punto central del oligonucleótido no codificante. Por tanto, para cada cadena, los oligonucleótidos pueden ensamblarse en conjuntos bicatenarios solapantes que abarcan los segmentos de 150-400 nucleótidos. Los conjuntos se usan después como moldes para producir productos de amplificación PCR de 150-400 nucleótidos. Normalmente, un conjunto de oligonucleótidos de región variable sencilla se degradará en dos conjuntos que se amplifican por separado para generar dos productos PCR solapantes. Estos productos de solapamiento se combinan después para amplificación PCR para formar toda la región variable. También puede ser deseable incluir un fragmento solapante de la región constante de cadena pesada ligera o la amplificación PCR para generar fragmentos que pueden

clonarse fácilmente en las construcciones de vectores de expresión.

Las regiones variables de cadena ligera y pesada reconstruida se combinan después con secuencias promotoras clonadas, secuencias líder, secuencias de inicio de la traducción, secuencias líder, región constante, 3' no traducida, poliadenilación, y terminación de la transcripción para formar construcciones de vectores de expresión. Las construcciones de expresión de cadena pesada y ligera pueden combinarse en un solo vector, cotransfectarse, transfectarse en serie o transfectarse individualmente en células hospedadoras que después se fusionan para formar una célula hospedadora que expresa ambas cadenas.

Para este uso en la técnica se conocen plásmidos e incluyen los plásmidos proporcionados en el apartado de ejemplos más adelante. Los anticuerpos quiméricos y completamente humanos desvelados en el presente documento también incluyen anticuerpos IgG2, IgG3, IgE, IgA, IgM e IgD. Pueden construirse plásmidos similares para la expresión de otros isotipos de cadena pesada, o para la expresión de anticuerpos que comprenden cadenas ligeras lambda.

Por tanto, en otro aspecto de la invención, las características estructurales de anticuerpos conocidos, no humanos o humanos (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 anti humano de ratón, tal como el anticuerpo 29E.2A3) se usan para crear anticuerpos anti-PD-L1 humanos estructuralmente relacionados que conservan al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tal como la unión con PD-L1. Otra propiedad funcional incluye la inhibición de la unión de 29E.2A3 con PD-L1 en un ensayo ELISA de competición. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-L1 humanos estructuralmente relacionados tienen una afinidad de unión más baja con el antígeno en comparación con el anticuerpo 29E.2A3 como se miden mediante el valor CI50 como se describe en el ejemplo 2 (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo de referencia murino no es mayor de ninguno de 3,0, 2,0, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2 o 1,1 veces del anticuerpo estructuralmente relacionado). En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-L1 humanos estructuralmente relacionados tienen una afinidad mayor por el antígeno en comparación con el anticuerpo 29E.2A3 medido por el valor CI50 como se describe en el ejemplo 2 (de tal manera que la afinidad del anticuerpo estructuralmente relacionada es al menos de 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 o 2,0 veces del anticuerpo de referencia). Además, una o más CDR o regiones variables de la presente invención (por ejemplo, figuras 4-5) pueden combinarse de manera recombinante con regiones marco conservadas humanas conocidas y las CDR crear anticuerpos anti PD-L1 humanos modificados de manera recombinante, adicionales de la invención.

Dado que es muy conocido en la técnica que los dominios CDR3 de cadena ligera y pesada de anticuerpo desempeñan una función particularmente importante en la especificidad de unión/afinidad de un anticuerpo por un antígeno, los anticuerpos recombinantes de la invención preparados como se expone anteriormente comprenden preferentemente las CDR3 de cadena ligera y pesada de las regiones variables de la presente invención (por ejemplo, figuras 4-5). Los anticuerpos pueden comprender adicionalmente las CDR2 de regiones variables de la presente invención (por ejemplo, figuras 4-5). Los anticuerpos pueden comprender adicionalmente las CDR1 de las regiones variables de la presente invención (por ejemplo, figuras 4-5). Los anticuerpos pueden comprender adicionalmente cualquiera de las combinaciones de las CDR.

Las regiones CDR1, 2 y/o 3 de los anticuerpos modificados genéticamente descritos anteriormente pueden comprender la secuencia (o secuencias) de aminoácidos exacta como aquellas de las regiones variables de la presente invención (por ejemplo, figuras 4-5) desveladas en el presente documento.

Además de simplemente la unión de PD-L1, anticuerpos codificados genéticamente tales como los descritos anteriormente pueden seleccionarse con respecto a su retención de otras propiedades funcionales de anticuerpos de la invención, tales como:

- (1) unión a PD-L1 humano;
- (2) inhibición de la unión de 29E.2A3 con PD-L1;
- (3) unión con PD-L1 humano e inhibición de la capacidad en que PD-L1 unido se una a ligandos PD-L1 (Por ejemplo, PD-1 y/o B7-1);

Las secuencias de aminoácido de región variable de cadena pesada y ligera para los anticuerpos EH12.2H7, 29E.2A3 y 24F.10C12 se muestran a continuación.

Región variable de cadena pesada de EH12.2H7

QVQLQQSGAELAKPGASVQMSCKASGYSFTSSWIHWVKQRPGQGLEWIGYIYPSTGFT
EYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARWRDSSGYHAMDYWGQG
TSVTVSS (SEQ ID NO:76)

Región variable de cadena ligera de EH12.2H7

DIVLTQSPASLTVSLGQRATISCRASQSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKFGSNLES
GIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYCQHSWEIPYTFGGGKLEIK (SEQ ID
NO:77)

Región variable de cadena pesada de 29E.2A3

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYVNPFDG
TKYNEMFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARQAWGYPWGQGLTVTS
A (SEQ ID NO:78)

5

Región variable de cadena ligera de 29E.2A3

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRATESVEYYGTSLVQWYQQKPGQPPKLLIYAASSVDS
GVPARFSGSGSGTDFSLTIHPVEEDDIAMYFCQQSRRVPYTFGGGKLEIK (SEQ ID
NO:79)

10

Región variable de cadena pesada de 24F.10C12

QVQLQQSAAELARPGASVKMSCASGYTFTGYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPRSGY
TEYNQKFKDKTTLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARPWFAYWGQGLTVTVSA
(SEQ ID NO:80)

Región variable de cadena ligera de 24F.10C12

DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWAS
TRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLELK (SEQ
ID NO:81)

15

La actividad de los anticuerpos en la inhibición de la unión de PD-L1 con su ligando (o ligandos) puede determinarse ensayando la capacidad del anticuerpo para bloquear la unión entre PD-L1 y su ligando. Puede usarse un ensayo ELISA de competición en presencia de un ligando marcado y el anticuerpo. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo anti-PD-L1 podría bloquear la interacción entre PD-1 y PD-L1, se realiza un experimento de unión competitiva. Las células que expresan PD-L1 se preincuban con el anticuerpo anti-PD-L1 seguido por la adición de la proteína de fusión PD-1-Ig biotinilada. Si el anticuerpo anti-PD-L1 bloquea la unión de PD-1-Ig de una manera dependiente de la dosis y con una alta avidéz, se considera que el anticuerpo anti-PD-L1 es eficaz en la inhibición de la interacción entre PD-1 y PD-L1.

20

25 IV. Vectores de expresión recombinantes y células hospedadoras

Otro aspecto de la invención se refiere a vectores, preferentemente, a vectores de expresión, que contienen una, dos o más moléculas de ácido nucleico que codifican uno o más polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, figuras 4-5) (o una parte de las mismas). Como se usan en el presente documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que puede ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma vírico. Determinados vectores son capaces de replicarse de manera autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) están integrados en el genoma de una célula hospedadora después de la introducción en la célula hospedadora, y por lo tanto se replican junto con el genoma del hospedador. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes con los que están unidos operativamente. En el presente documento dichos vectores reciben el nombre de "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ARN recombinantes están frecuentemente en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma más habitualmente usada de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de este tipo de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo,

30

35

40

retrovirus con replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados), que realizan funciones equivalentes.

Los vectores de expresión recombinante de la invención comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido núcleo en una célula hospedadora, lo que significa que los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas en función de las células hospedadoras que se usan para la expresión, que está unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico que se va a expresar. En un vector de expresión recombinante, "unido operativamente" pretende significar que la secuencia de nucleótidos de interés está unida a una o más secuencias reguladoras de una manera que permita la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula hospedadora cuando el vector se introduce en la célula hospedadora). La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo; señales de poliadenilación). Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (1990) *Methods Enzymol.* 185:3-7. Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células hospedadoras y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos solo en determinadas células hospedadoras (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada y similar. Los vectores de expresión de la invención pueden introducirse en células hospedadoras para así producir proteínas o péptidos, incluyendo proteínas o péptidos de fusión, codificados por los ácidos nucleicos como se describe en el presente documento.

Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden diseñarse para la expresión de polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, figuras 4-5) en células procariotas o eucariotas. Por ejemplo, los polipéptidos pueden expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (usando vectores de expresión baculovirus), células de levadura o células de mamífero. Se analizan células hospedadoras adecuadas adicionalmente en Goeddel (1990) citada anteriormente. Como alternativa, el vector de expresión recombinante puede transcribirse y traducirse *in vitro*, por ejemplo usando secuencias reguladoras del promotor T7 y polimerasa de T7.

La expresión de polipéptidos en procariotas se realiza más frecuentemente en *E. coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de proteínas de fusión o no fusión. Los vectores de fusión añaden diversos aminoácidos a un polipéptido codificado en su interior, normalmente en el extremo amino del polipéptido recombinante. Dichos vectores de fusión normalmente realizan tres propósitos: 1) aumentar la expresión del polipéptido recombinante; 2) aumentar la solubilidad de polipéptido recombinante; y 3) ayudar a la purificación del polipéptido recombinante actuando como un ligando en purificación de afinidad. A menudo, en los vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión de la fracción de fusión y el polipéptido recombinante para permitir la separación del polipéptido recombinante de la fracción de fusión posterior a la purificación de la proteína de fusión. Dichas enzimas, y sus secuencias de reconocimiento afines, incluyen factor Xa, trombina y enteroquinasa. Los vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D. B. y Johnson, K. S. (1988) *Gene* 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) que fusionan glutatión S-transferasa (GST), la proteína de unión maltosa E o la proteína A, respectivamente, al polipéptido recombinante diana.

Como ejemplos de vectores de expresión de *E. coli* de no fusión inducible adecuados se incluyen pTrc (Amann *et al.* (1988) *Gene* 69:301-315) y pET 1 ld (Studier *et al.* (1990) *Methods Enzymol.* 185:60-89). La expresión del gen diana del vector pTrc se basa en la transcripción de la ARN polimerasa del hospedador a partir de un promotor de fusión trp-lac híbrido. La expresión del gen diana del vector pET 11 se basa en la transcripción de un promotor de fusión gn10-lac de T7 mediado por una ARN polimerasa viral co-expresada (T7 gn1). Esta polimerasa viral se proporciona mediante células hospedadoras BL21(DE3) o HMS174(DE3) de un profago residente que aloja un gen gn1 de T7 bajo el control transcripcional del promotor lacUV 5.

Una estrategia para maximizar la expresión de polipéptidos recombinantes en *E. coli* es expresar el polipéptido en bacterias hospedadoras con capacidad defectuosa para escindir proteolíticamente el polipéptido recombinante (Gottesman, S. (1990) *Methods Enzymol.* 185:119-128). Otra estrategia es alterar la secuencia de ácido nucleico del ácido nucleico a insertar en un vector de expresión de la manera que los codones individuales de cada aminoácido se utilizan preferencialmente en *E. coli* (Wada *et al.* (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118). Dicha alteración de ácidos de secuencias de ácido nucleico de la invención puede realizarse mediante técnicas de síntesis de ADN convencionales.

En otra realización, el vector de expresión es un vector de expresión de levadura. Los ejemplos de vectores de expresión en levaduras *S. cerevisiae* incluyen pYepSec1 (Baldari *et al.* (1987) *EMBO J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan y Herskowitz (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz *et al.* (1987) *Gene* 54:113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.) y picZ (Invitrogen Corp, San Diego, Calif.).

Como alternativa, los polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, figuras 4-5) pueden expresarse en células de insecto usando vectores de expresión de baculovirus. Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión

de polipéptidos en células de insecto cultivadas (por ejemplo, células Sf 9) incluyen la serie pAc (Smith *et al.* (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) y la serie pVL (Lucklow y Summers (1989) Virology 170:31-39).

5 En otra realización más, un ácido nucleico de la presente invención (por ejemplo, figuras 4-5) se expresa en células de mamífero usando un vector de expresión de mamífero. Los ejemplos de vectores de expresión de mamífero incluyen pCDM8 (Seed, B. (1987) Nature 329:840) y pMT2PC (Kaufman *et al.* (1987) EMBO J. 6:187-195). Cuando se usan en células de mamífero, las funciones del control del vector de expresión a menudo se proporcionan mediante elementos reguladores virales. Por ejemplo, los promotores habitualmente usados proceden de polioma, adenovirus 2, citomegalovirus y Virus de simio 40. Para otros sistemas de expresión adecuados para células tanto
10 procariontas como eucariotas véase los capítulos 16 y 18 de Sambrook, J. *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

15 En otra realización, el vector de expresión de un mamífero recombinante puede dirigir la expresión del ácido nucleico preferentemente en un tipo de células particular (por ejemplo, para expresar el ácido nucleico se usan elementos reguladores específicos de tejido). En la técnica se conocen elementos reguladores específicos de tejido. Como ejemplos no limitantes de promotores específicos de tejido adecuados se incluyen el promotor de albúmina (específico de hígado; Pinkert *et al.* (1987) Genes Dev. 1:268-277), promotores específicos linfocitos (Calame y Eaton (1988) Adv. Immunol. 43:235-275), promotores particulares de receptores de linfocitos T (Winoto y Baltimore (1989) EMBO J. 8:729-733) e inmunoglobulinas (Banerji *et al.* (1983) Cell 33:729-740; Queen y Baltimore (1983) Cell 33:741-748), promotores específicos de neuronas (por ejemplo, el promotor de neurofilamento; Byrne y Ruddle (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 86:5473-5477), promotores específicos de páncreas (Edlund *et al.* (1985) Science 230:912-916), y promotores específicos de glándula mamaria (por ejemplo, promotor de suero de leche; Patente de Estados Unidos n.º 4.873.316 y publicación de solicitud europea n.º 264.166). También se
20 incluyen promotores regulados por evolución, por ejemplo, por promotores hox murinos (Kessel y Gruss (1990) Science 249:374-379) y el promotor alfa fetoproteínico (Campes y Tilghman (1989) Genes Dev. 3:537-546).

Otro aspecto de la invención se refiere a células hospedadoras en las que se introduce una molécula de ácido nucleico de la presente invención (por ejemplo, figuras 4-5) en un vector de expresión recombinante o una molécula de ácido nucleico que contiene secuencias que permiten recombinar homológamente en un sitio específico del genoma de la célula hospedadora. Las expresiones "célula hospedadora" y "célula hospedadora recombinante" se usan indistintamente en el presente documento. Se entiende que dichas expresiones se refieren no solo a la célula del sujeto particular sino a la descendencia o posible descendencia de dicha célula. Porque ciertas modificaciones pueden producirse en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, dicha descendencia
30 puede no ser, de hecho, idéntica a la célula parental, pero aun así quedar incluida dentro del alcance de la expresión como se usa en el presente documento.

Una figura hospedadora puede ser cualquier célula procarionta o eucariótica. Por ejemplo, un polipéptido de la presente invención (por ejemplo, figuras 4-5) puede expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto, células de levadura o de mamífero (tales como células de ovario de hámster chino (CHO) o COS). Los expertos en la técnica conocen otras células hospedadoras que son adecuadas.

El ADN vectorial puede introducirse en células procariontas o eucariotas mediante técnicas convencionales de transformación o transfección. Como se usa en el presente documento, los términos "transformación" y "transfección" pretenden referirse a diversas técnicas reconocidas en la materia para introducir ácido nucleico exógeno (por ejemplo, ADN) en una célula hospedadora, incluyendo co-precipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada con DEAE-dextrano, lipofección o electroporación. En Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), y en otros manuales de laboratorio pueden encontrarse métodos adecuados para la transformación o transfección de células hospedadoras.
45 50

Para la transfección estable de células de mamífero, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y la técnica de transfección que se utilice, únicamente una pequeña fracción de células puede integrar el ADN exógeno en su genoma. Para identificar y seleccionar estos integrantes, generalmente un gen que codifica un marcador de selección (por ejemplo, la resistencia a antibióticos) se introduce en las células hospedadoras junto con el gen de interés. Marcadores de selección preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. El ácido nucleico que codifica un marcador de selección puede introducirse en una célula hospedadora en el mismo vector que el que codifica un polipéptido PD-L1 o puede introducirse en un vector distinto. Las células se transfectan de manera estable con el ácido nucleico introducido pueden identificarse por la selección de fármacos (por ejemplo, células que tienen incorporado el gen marcador de selección sobrevivirán, mientras que las otras morirán).
55 60

Una célula hospedadora de la invención, tal como una célula hospedadora procarionta o eucariota en cultivo, puede usarse para producir (es decir, expresar), un polipéptido de la presente invención (por ejemplo, figuras 4-5). Por consiguiente, la invención proporciona adicionalmente métodos para producir un polipéptido de la presente invención (por ejemplo, figuras 4-5) usando las células hospedadoras de la presente invención. En una realización, el método
65

comprende cultivar la célula hospedadora de la invención (en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica a un polipéptido de la presente invención (por ejemplo, figuras 4-5)) en un medio adecuado de tal manera que se produce un polipéptido de la presente invención (por ejemplo, figuras 4-5). En otra realización, el método comprende adicionalmente aislar un polipéptido de la presente invención (por ejemplo, figuras 4-5) del medio o de la célula hospedadora.

Las células hospedadoras de la invención también pueden usarse para producir animales transgénicos no humanos, como se describe más adelante.

10 V. Producción de animales no humanos transgénicos y transcromosómicos que generan anticuerpos PD-L1 humanos, compuestos

En otro aspecto adicional, la invención proporciona animales no humanos transgénicos y transcromosómicos, tales como ratones transgénicos o transcromosómicos, que pueden expresar anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a PD-L1. En una realización particular con la invención proporciona un ratón transgénico o transcromosómico que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana, de tal manera que el ratón produce anticuerpos anti-PD-L1 humanos cuando se inmunizan con antígeno PD-L1 y/o células que expresen PD-L1. El transgén de cadena pesada humana puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón como ocurre en el caso de los ratones transgénicos, por ejemplo, HuMAb, de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Como alternativa, el transgén de cadena pesada humana puede mantenerse extracromosómicamente, como es el caso de los ratones transcromosómicos (por ejemplo, KM) como se describe en el documento WO 02/43478. Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos pueden producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos contra PD-L1 (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgE) mediante recombinación V-D-J y cambio de isotipo. El cambio de isotipo puede producirse mediante, por ejemplo, cambio clásico o no clásico de isotipo.

El diseño de un animal no humano transgénico o transcromosómico que responde a estimulación antigénica exógena con un repertorio de anticuerpos heterólogos, requiere que los transgenes de inmunoglobulina heterólogos contenidos en el animal transgénico funcionen correctamente a lo largo de la ruta del desarrollo de linfocitos B. Esto incluye, por ejemplo, el cambio de isotipo del transgén de cadena pesada heteróloga. Por consiguiente, se construyen transgenes para producir el cambio de isotipos y uno o más de los siguientes anticuerpos: (1) alto nivel y expresión específica del tipo de célula, (2) reordenación génica funcional, (3) activación de y respuesta a exclusión alélica, (4) expresión de un repertorio primario suficiente, (5) transducción de señal, (6) hipermutación somática y (7) dominación del locus del anticuerpo de transgén durante la respuesta inmunitaria.

No es preciso que se cumplan todos los criterios anteriores. Por ejemplo, en aquellas realizaciones en las que los loci de inmunoglobulina endógena del animal transgénico se alteran funcionalmente, el transgén no requiere activar la exclusión alélica. Además, en aquellas realizaciones en las que el transgén comprende un gen de inmunoglobulina de cadena pesada y/o ligera funcionalmente reordenado, el segundo criterio de reordenación génica funcional es innecesario, al menos para que ese transgén que ya está reordenado. Para el fondo de inmunología molecular, véase, 2ª edición (1989), Paul William E., ed. Raven Press, N.Y.

En determinadas realizaciones, los animales no humanos transgénico o transcromosómico usados para generar los anticuerpos monoclonales humanos de la invención contienen transgenes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina heterólogos reordenados, no reordenados o una combinación de reordenados y no reordenados en la línea germinal del animal transgénico. Cada uno de los transgenes de cadena pesada comprende al menos un gen CH. Además, el transgén de cadena pesada puede contener secuencias de cambio de isotipo funcional, que pueden soportar el cambio de isotipo de un transgén heterólogo que codifica múltiples genes CH en los linfocitos B del animal transgénico. Dichas secuencias de cambio pueden ser aquellas que se producen de manera natural en el locus de inmunoglobulina de la línea germinal de la especie que sirve como fuente para los genes CH transgénicos, o secuencias de cambio tales que pueden proceder de aquellas que se producen en la especie que va a recibir la construcción transgénica (el animal transgénico). Por ejemplo, una construcción transgénica humana que se usa para producir un ratón transgénico puede producir una frecuencia más alta de eventos de cambio de isotipo si este incorpora secuencias de cambio similares a las que se producen de manera natural en el locus de cadena pesada de ratón, ya que supuestamente las secuencias de cambio de ratón están optimizadas para actuar con los sistemas de la enzima recombinasa de cambio de ratón, mientras que las secuencias de cambio humanas no. Las secuencias de cambio pueden aislarse y clonarse mediante métodos de clonación convencionales o pueden sintetizarse de nuevo a partir de oligonucleótidos sintéticos solapantes diseñados en función de la información de secuencia publicada relacionada con las secuencias de la región de cambio de inmunoglobulina (Mills *et al.*, Nucl. Acids Res. 15:7305 7316 (1991); Sideras *et al.*, Intl. Immunol. 1:631 642 (1989)). Para cada uno de los animales transgénicos anteriores, se han descubierto transgenes de inmunoglobulina de cadena ligera y pesada heterólogos funcionalmente reordenados en una fracción significativa de los linfocitos B en el animal transgénico (al menos un 10 por ciento).

Los transgenes usados para generar los animales transgénicos de la invención incluyen un transgén de cadena pesada que comprende ADN que codifica al menos un segmento génico variable, un segmento génico de diversidad, un segmento génico de unión y al menos un segmento génico de región constante. El transgén de

cadena ligera de inmunoglobulina comprende ADN que codifica al menos un segmento génico variable, un segmento génico de unión y al menos un segmento génico de región constante. Los segmentos génicos que codifican los segmentos génicos de cadena ligera y pesada son heterólogos para el animal no humano transgénico en el que proceden de, o corresponden con, ADN que codifica los segmentos génicos de cadena pesada y ligera de
 5 inmunoglobulina de una especie que no consiste en el animal no humano transgénico. En un aspecto de la invención, el transgén se construye de tal manera que los segmentos génicos individuales están no reordenados, es decir, no reordenados para codificar una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina funcional. Dichos transgenes no reordenados soportan la recombinación de los segmentos génicos V, D y J (reordenación funcional) y soportan preferentemente la incorporación de todo o de parte de un segmento génico de región D en la cadena pesada de
 10 inmunoglobulina reordenada resultante en el animal no humano transgénico cuando se expone al antígeno PD-1, PD-L1 o PD-L2.

En una realización alternativa, los transgenes comprenden un "mini-locus" no reordenado. Dichos transgenes normalmente comprenden una parte sustancial de los segmentos C, D y J, así como un subconjunto de los
 15 segmentos génicos V. En dichas construcciones transgénicas, las diversas secuencias reguladoras, por ejemplo, promotores, potenciadores, regiones de cambio de clase, secuencias donantes de corte y empalme y aceptores de corte y empalme para el procesado de ARN, señales de recombinación y similares, comprenden secuencias correspondientes derivadas del ADN heterólogo. Dichas secuencias reguladoras pueden incorporarse en el transgén del mismo o de una especie relacionada de animal no humano usado en la invención. Por ejemplo, los segmentos
 20 génicos de inmunoglobulina pueden combinarse en un transgén con una secuencia potenciadora de inmunoglobulina de roedor para su uso en un ratón transgénico. Como alternativa, pueden incorporarse secuencias reguladoras sintéticas en el transgén, en el que dichas secuencias reguladoras sintéticas no son homólogas a una secuencia de ADN funcional que se sabe que se produce de manera natural en los genomas de los mamíferos. Se diseñaron secuencias reguladoras sintéticas de acuerdo con normas consenso tales como, por ejemplo, las que se
 25 especifican las secuencias permisibles de un sitio aceptor de corte y empalme o un motivo promotor/potenciador. Por ejemplo, un minilocus comprende una parte del locus de inmunoglobulina genómico que tiene al menos una delección interna (es decir, no en un extremo de la parte) de una parte de ADN no esencial (por ejemplo, secuencia intermedia, intrón o parte de la misma) en comparación con el locus Ig de la línea germinal de origen natural.

Los ratones transgénicos y transcromosómicos empleados en la presente invención pueden exhibir producción de
 30 inmunoglobulina con un repertorio significativo, y de manera ideal sustancialmente similar al de un ratón natural. Por lo tanto, por ejemplo, en realizaciones en las que se han inactivado genes Ig endógenos, los niveles de inmunoglobulina total pueden variar de aproximadamente 0,1 a 10 mg/ml de suero, o de aproximadamente 0,5 a 5 mg/ml, o al menos aproximadamente 1,0 mg/ml. Cuando un transgén capaz de suscitar un cambio a IgG de IgM se
 35 ha introducido en el ratón transgénico, la proporción de ratón adulto de IgG en suero a IgM puede ser de aproximadamente 10:1. La proporción de IgG con IgM será mucho menor en el ratón inmaduro. En general, más de aproximadamente 10 %, preferentemente de 40 a 80 % de los linfocitos de bazo y ganglios linfáticos pueden expresar exclusivamente la proteína IgG.

El repertorio será idealmente aproximado al mostrado en un ratón natural, habitualmente al menos
 40 aproximadamente 10 % tan alto, o 25 a 50 % o más. Generalmente, al menos aproximadamente un millar de diferentes inmunoglobulinas (de manera ideal IgG), por ejemplo, preferentemente de 10^4 a 10^6 o más, se producirá, dependiendo principalmente del número de diferentes regiones V, J y D introducidas en el genoma de ratón. Estas inmunoglobulinas normalmente reconocen aproximadamente la mitad o más de proteínas altamente antigénicas, por
 45 ejemplo, la proteína A de *Staphylococcus*. Normalmente las inmunoglobulinas exhibirán una afinidad (K_D) para antígenos preseleccionados de menos de 10^{-7} M, tal como menos de 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso más baja.

En algunas realizaciones, puede ser preferible generar ratones con repertorios predeterminados para limitar la
 50 selección de genes V representado en respuesta de anticuerpo contra un tipo antigénico predeterminado. Un transgén de cadena pesada que tiene un repertorio predeterminado puede comprender, por ejemplo, genes V_H humanos que se usan preferentemente en respuestas de anticuerpo contra el tipo de antígeno predeterminado en seres humanos. Como alternativa, algunos genes V_H pueden excluirse de un repertorio definido por diversas razones (por ejemplo, tener una baja probabilidad de codificar regiones V de alta afinidad para el antígeno predeterminado; tener una baja propensión a experimentar mutaciones somáticas y una agudización de la afinidad; o son
 55 inmunogénicos en determinados seres humanos). Por tanto, antes de la reordenación de un transgén que contenga diversos segmentos de gen de cadena pesada o ligera, dichos segmentos génicos pueden identificarse fácilmente, por ejemplo, por hibridación o secuenciación de ADN, como de especies de organismos distintos a los del animal transgénico.

Los ratones transgénicos y transcromosómicos como se describe anteriormente pueden inmunizarse, por ejemplo,
 60 con una preparación purificada o enriquecida de PD-L1 y/o células que expresan PD-L1. Como alternativa, los ratones transgénicos pueden inmunizarse con ADN que codifica PD-L1 humano. Los ratones producirán después linfocitos B que experimentarán cambio de clase mediante recombinación de cambio intratransgénico (cis-switching) y expresan inmunoglobulinas reactivas con PD-L1. Las inmunoglobulinas pueden ser anticuerpos humanos (también denominados "anticuerpos de secuencia humana"), en los que los polipéptidos de cadena pesada y ligera se
 65 codifican por secuencias transgénicas humanas, que pueden incluir secuencias derivadas de mutación somática y

uniones recombinatorias de región V, así como secuencias codificadas de la línea germinal; estos anticuerpos humanos pueden referenciarse por ser sustancialmente idénticos a una secuencia polipeptídica codificada por un segmento génico V_L o V_H y un segmento J_L o D_H y J_H humano, incluso aunque otras secuencias no de la línea germinal pueden estar presentes como resultado de mutación somática y uniones de recombinación V-J y V-D-J diferenciados. Las regiones variables de cada cadena de anticuerpo están normalmente al menos un 80 por ciento codificada por segmentos génicos V, J, y, en el caso de las cadenas pesadas, D, de línea germinal humana; frecuentemente al menos un 85 por ciento de las regiones variables están codificadas por secuencias de la línea germinal humana presentes en el transgén; frecuentemente 90 o 95 por ciento o más de las secuencias de región variable están codificadas por secuencias de la línea germinal humana en el transgén. Sin embargo, dado que se introducen secuencias no línea germinal por mutación somática y unión VJ y VDJ, los anticuerpos de secuencia humana frecuentemente tendrán algunas secuencias de región variables (y menos frecuentemente secuencias de región constante) que no están codificadas por segmentos génicos V, D o J como se encuentra en el transgén o transgenes humanos en la línea germinal de los ratones. Normalmente, dichas secuencias no línea germinal (o posiciones de nucleótidos individuales) se agruparán en o cerca de las CDR, o en regiones en las que se sabe que las mutaciones somáticas se agrupan.

Los anticuerpos humanos que se unen al antígeno predeterminado puede dar como resultado el cambio de isotipo, de tal manera que se producen anticuerpos humanos que comprenden una cadena γ de secuencia humana (tal como $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2B$ o $\gamma 3$) y una cadena ligera de secuencia humana (tal como kappa). Dichos anticuerpos humanos de cambio de isotipo a menudo contienen una o más mutaciones somáticas normalmente en la región variable y a menudo en o dentro de aproximadamente 10 restos de CDR como resultado de la maduración por afinidad y selección de linfocitos B por antígeno, particularmente posterior a exposición antigénica secundaria (o posterior). Estos anticuerpos humanos altamente afines pueden tener afinidades de unión (K_D) de menos de 10^{-7} M, tal como menos de 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-10} M o incluso menores.

Otro aspecto de la invención incluye linfocitos B procedentes de ratones transgénicos o transcromosómicos como se describe en el presente documento. Los linfocitos B pueden usarse para generar hibridomas que expresen anticuerpos monoclonales humanos que se unen con alta afinidad (por ejemplo, menor de 10^{-7} M) a PD-L1 humano.

El desarrollo de los anticuerpos monoclonales humanos de alta afinidad contra PD-L1 puede facilitarse mediante un método para expandir el repertorio de secuencias génicas de región variable humana en un ratón transgénico que tiene un genoma que comprende un transgén de inmunoglobulina humano integrado, comprendiendo dicho método introducir en el genoma un transgén génico V que comprende segmentos génicos de región V que no están presentes en dicho transgén de inmunoglobulina humana integrada. A menudo, el transgén de región V es un cromosoma artificial de levadura que comprende una parte de un segmento génico humano V_H o V_L (V_k) como puede producirse de manera natural en un genoma humano o puede cortarse y empalmarse conjuntamente por separado mediante métodos recombinantes, que pueden incluir segmentos génicos V desordenados u omitidos. A menudo al menos cinco o más segmentos génicos V funcionales están contenidos en el YAC. En esta variación, es posible elaborar un ratón transgénico producido por el método de expansión de repertorios V, en el que el ratón expresa una cadena de inmunoglobulina que comprende una secuencia de región variable codificada por un segmento génico de región V presente en el transgén de región V y una región C codificada en el transgén Ig humano. Mediante el método de expansión de repertorios V, pueden generarse ratones transgénicos que tienen al menos 5 genes V distintos; así como ratones que contienen al menos aproximadamente 24 genes V o más. Algunos segmentos génicos V pueden ser no funcionales (por ejemplo, pseudogenes y similares); esos segmentos pueden retenerse o pueden delecionarse selectivamente por métodos recombinantes disponibles para el experto habitual en la técnica si se desea.

Una vez que la línea germinal de ratón se ha modificado por ingeniería genética para que contenga un YAC funcional que tiene un repertorio de segmento V ampliado, sustancialmente no presente en el transgén Ig humano que contiene los segmentos génicos J y C, el rasgo puede propagarse y reproducirse en otros fondos genéticos, incluyendo fondos en los que el YAC que tiene un repertorio de segmento V ampliado se reproduce en una línea germinal de ratón que tiene un transgén Ig humano diferente. YAC funcionales múltiples que tienen un repertorio de segmentos V ampliado pueden reproducirse en una línea germinal para funcionar con un transgén Ig humano (o transgenes Ig humanos múltiples). Aunque en el presente documento se denominan transgenes YAC, dichos transgenes cuando se integran en el genoma pueden carecer sustancialmente de secuencias de levadura, tales como secuencias necesarias para la replicación autónoma en levaduras; dichas secuencias pueden retirarse opcionalmente por modificación genética (por ejemplo, digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de campo de impulso u otro método adecuado) después de la replicación en levaduras que ya no es necesaria (es decir, antes de la introducción en una célula ES de ratón o procigoto de ratón). Los métodos de propagación del rasgo de la expresión de inmunoglobulina de la secuencia humana incluyen la reproducción de un ratón transgénico que tiene uno o más transgenes de Ig humanos y opcionalmente también tiene un YAC funcional que tiene un repertorio de segmentos V ampliado. Ambos segmentos génicos V_H y V_L pueden estar presentes en el YAC. El ratón transgénico puede reproducirse en cualquier fondo deseado por el especialista, incluyendo fondos que llevan otros transgenes humanos, incluyendo transgenes Ig humanos y/o transgenes que codifican otras proteínas de linfocitos humanos. La invención también proporciona una inmunoglobulina de secuencia humana de alta afinidad producida por un ratón transgénico que tiene un transgén YAC con repertorio de región V ampliado. Aunque lo anterior

describe una realización preferida del animal transgénico de la invención, se contemplan otras realizaciones que se han clasificado en cuatro categorías:

- 5 (1) animales transgénicos que contienen un transgén de inmunoglobulina ligera reordenado y pesada no reordenado;
- (2) animales transgénicos que contienen un transgén de inmunoglobulina ligera no reordenado y pesada no reordenado;
- 10 (3) animal transgénico que contiene un transgén de inmunoglobulina ligera no reordenado y pesada reordenado; y
- (4) animales transgénicos que contienen transgenes de inmunoglobulina ligera reordenados y pesada reordenados.
- 15

VI. Conjugados de anticuerpos/Inmunotoxinas

En otro aspecto, la presente invención se refiere a anticuerpos PD-L1 humanos conjugados con una fracción terapéutica, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o un radioisótopo. Cuando se conjugan con una citotoxina, estos conjugados de anticuerpo se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial a (por ejemplo, destruya) células. Como ejemplos se incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaina, lidocaina, propanolol, y puomicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguaína, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalan, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), y agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). Un anticuerpo de la presente invención puede conjugarse con un radioisótopo, por ejemplo, yodo radiactivo, para generar radiofarmacéuticos citotóxicos para el tratamiento de un trastorno relacionado, tal como un cáncer.

35 Los anticuerpos PD-L1 humanos conjugados pueden usarse desde el punto de vista del diagnóstico o pronóstico para monitorizar niveles de polipéptidos en tejidos como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento determinado. La detección puede facilitarse por acoplamiento (es decir, unión física) del anticuerpo con una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, P-galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina y ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

Los conjugados de anticuerpos de la invención pueden usarse para modificar una respuesta biológica determinada. No debe considerarse que la fracción terapéutica está limitada a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción farmacológica puede ser una proteína o un polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o un fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina diftérica; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o interferón-gamma; o modificadores de respuestas biológicas tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulador de colonia de granulocitos ("G-CSF") u otras citocinas o factores de crecimiento.

Se conocen bien técnicas para conjugar dichas fracciones terapéuticas con anticuerpos, véase, por ejemplo, Aron *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* (2ª 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).

VII. Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de los anticuerpos monoclonales, o una o más partes de unión a antígeno de los mismos (tales como fragmentos de unión a antígeno), de la presente invención, formulados junto con un transportador farmacéuticamente aceptable. En una realización, las composiciones incluyen una combinación de múltiples anticuerpos humanos aislados (por ejemplo, dos o más) de la invención. Preferentemente, cada uno de los anticuerpos de la composición se une a un epítipo distinto previamente seleccionado de PD-L1.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir una composición de la presente invención con al menos uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como agentes anti-inflamatorios, DMARD (fármacos anti-reumáticos modificadores de enfermedad), agentes inmunosupresores, agentes quimioterapéuticos y agentes de psoriasis. Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse junto con radioterapia. La co-administración con otros anticuerpos, tales como anticuerpos específicos de CD4 y anticuerpos específicos de IL-2, también se incluye en la invención.

Como se usa en el presente documento, "transportador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el vehículo es adecuado para la 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, molécula biespecífica y multiespecífica, puede recubrirse en un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y de otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto parental y no confiere ninguno de los efectos tóxicos no deseados (véase, por ejemplo, Berge, S. M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66: 1 19). Los ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácidos y sales de adición de bases. Las sales de adición de ácidos incluyen las procedentes de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforosos y similares, así como ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos mono- y dicarboxílicos, ácidos alcanoicos fenil sustituidos, ácidos hidroxil alcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de bases incluyen las procedentes de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenziletildiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaina y similares.

Una composición de la presente invención puede administrarse mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la técnica, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados que se deseen. Los compuestos activos pueden prepararse con transportadores que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etilen vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los expertos en la técnica conocen en general muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones o estos están patentados. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Para administrar un compuesto de la invención mediante determinadas vías de administración, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o co-administrarlo con, un material que impide su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse a un sujeto en un transportador apropiado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones salinas y tampones acuosos. Los liposomas incluyen emulsiones CGF de agua en aceite en agua así como liposomas convencionales (Strejan *et al.* (1984) *J. Neuroimmunol.* 7: 27).

Los transportadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio convencional o agente sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas de la invención. También pueden incorporarse en las composiciones compuestos complementarios activos.

Las composiciones terapéuticas normalmente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada con una alta concentración de fármaco. El transportador puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similar), y mezclas adecuadas de los mismos. Puede mantenerse la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido

en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. 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 realizarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

5 Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por microfiltración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los indicados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y criodesecado (liofilización) que produce un polvo del principio activo más cualquier principio deseado adicional de una solución previamente esterilizada por filtración de la misma.

15 Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un solo bolo, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse proporcionalmente o aumentarse según se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Por ejemplo, los anticuerpos humanos de la invención pueden administrarse una o dos veces a la semana mediante inyección subcutánea o una o dos veces al mes mediante inyección subcutánea. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en una forma unitaria de dosificación para facilitar administración y uniformidad de la dosificación. Como se usa en el presente documento, forma unitaria de dosificación se refiere a unidades separadas físicamente adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el transportador farmacéutico requerido. La especificación de las formas unitarias de dosificación de la invención se dictaminan mediante y directamente dependen de (a) las características exclusivas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a conseguir, y (b) las limitaciones intrínsecas en la técnica de la formación de compuestos tal como un compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

30 En una realización, un agente de la invención es un anticuerpo. Como se define en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo (es decir, una dosificación eficaz) varía de aproximadamente 0,001 a 30 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 0.01 a 25 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 1 a 10 mg/kg, de 2 a 9 mg/kg, de 3 a 8 mg/kg, de 4 a 7 mg/kg, o de 5 a 6 mg/kg de peso corporal. El experto en la técnica apreciará que determinados factores pueden ejercer influencia en la dosificación necesaria para tratar de un modo eficaz a un sujeto, incluyendo pero sin limitación, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, salud general y/o edad del sujeto y otras enfermedades presentes. Adicionalmente, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo puede incluir un solo tratamiento o, preferentemente, puede incluir una serie de tratamientos. También se apreciará que la dosificación eficaz de anticuerpo usada para el tratamiento puede aumentar o disminuir a lo largo del ciclo de un tratamiento particular. Los cambios en la dosificación pueden resultar de los resultados de ensayos diagnósticos.

45 Los 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 similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como ascorbil palmitato, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, propil galato, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes metálicos, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamina tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares

50 Para las composiciones terapéuticas, las formulaciones de la presente invención incluyen las que son adecuadas para administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en una forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica de farmacia. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material transportador para producir una sola forma de dosificación variará dependiendo del sujeto que vaya a tratarse y del modo de administración particular. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material transportador para producir una sola forma de dosificación generalmente será esa cantidad de la composición que produzca un efecto terapéutico. Generalmente, del cien por cien, esta cantidad variará de aproximadamente 0,001 por ciento a aproximadamente noventa por ciento de principio activo, como alternativa de aproximadamente 0,005 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, o como alternativa de aproximadamente 0,01 por ciento a aproximadamente 30 por ciento.

60 Las formulaciones de la presente invención que son adecuadas para administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones pulverizadoras que contienen dichos transportadores como se conoce en la técnica que son apropiados. Las formas de dosificación para administración tópica o transdérmica de las composiciones de la presente invención incluyen polvos, pulverizaciones, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. El compuesto activo puede mezclarse en condiciones estériles con un transportador farmacéuticamente aceptable y con cualquier conservante, tampón o

propulsor que se requiera.

Las expresiones “administración parenteral” y “administrada por vía parenteral” como se una en el presente documento significan modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, normalmente por
 5 inyección e incluye, sin limitación, administración intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intaespinal, epidural e inyección intraesternal e infusión.

Los ejemplos de transportadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones
 10 farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada puede mantenerse por ejemplo mediante el uso de materiales de recubrimiento tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y usando tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes de dispersión. La prevención de la presencia de microorganismos puede
 15 garantizarse tanto por procedimientos de esterilización, citados anteriormente, como por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares en las composiciones. Adicionalmente, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede llevarse a cabo mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción tal como monoestearato de aluminio y gelatina.

Cuando los compuestos de la presente invención se administran como compuestos farmacéuticos a seres humanos
 25 y animales, estos pueden administrarse en solitario o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, de 0,001 a 90 % (por ejemplo, de 0,005 a 70 %, tal como de 0,01 a 30 %) de principio activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención que pueden
 30 usarse en forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente
 35 invención pueden modificarse para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particular, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de diversos factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas o del éster, sal o amida de los mismos, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular
 40 que vaya a emplearse, la duración del tratamiento, otros factores, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, estado, salud general del paciente e historial médico previo del paciente que vaya a tratarse y factores similares bien conocidos por la técnica médica. Un médico o veterinario que tenga una habilidad habitual en la técnica puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz de la composición farmacéutica necesaria. Por ejemplo, el médico o el veterinario puede comenzar
 45 con dosis de los compuestos de la invención empleados en las composiciones farmacéuticas a niveles inferiores que los necesarios para conseguir el efecto terapéutico deseado y gradualmente aumentar la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición de la invención será aquella cantidad del compuesto que sea la dosis eficaz más baja para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis eficaz generalmente dependerá de factores descritos anteriormente. Se prefiere que la administración sea intravenosa,
 50 intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, preferentemente administrada proximal al sitio de la diana. Si se desea, la dosis diaria eficaz de una composición terapéutica puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas de dosificación unitaria. Cuando esto es posible para un compuesto de la presente invención administrarse en solitario, es preferible administrar el compuesto como una formulación farmacéutica (composición).

Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por
 55 ejemplo, en una realización, una composición terapéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmico sin aguja, tales como los dispositivos desvelados en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.399.163, 5.383.851, 5.312.335, 5.064.413, 4.941.880, 4.790.824 o 4.596.556. Los ejemplos de implantes bien conocidos y módulos útiles en la presente invención incluyen: Patente de Estados Unidos n.º 4.487.603, que desvela una bomba de microinfusión implantable para dispensar la medicación a una velocidad controlada; la Patente de Estados Unidos n.º 4.486.194, que desvela un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la Patente de Estados Unidos n.º 4.448.233, que desvela una bomba de infusión de medicación para el suministro de medicación a una velocidad de infusión exacta; la Patente de Estados Unidos n.º 4.447.224, que desvela un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración de fármaco continua; la Patente
 65 de Estados Unidos n.º 4.439.196, que desvela un sistema de suministro de fármaco osmótico que tiene

compartimentos multicámara; y la Patente de Estados Unidos n.º 4.475.196, que desvela un sistema de suministro de fármaco osmótico. Muchos otros de dichos implantes, sistemas de suministro y módulos son conocidos por los expertos en la técnica.

5 En determinadas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención pueden formularse para garantizar la distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para garantizar que los compuestos terapéuticos de la invención atraviesan la BBB (si se desea), estos pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para métodos de fabricación de liposomas, véase, por ejemplo las Patentes de Estados Unidos n.º 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden
10 comprender una o más fracciones que se transportan selectivamente en células u órganos específicos, potenciando por tanto la administración del fármaco dirigido (véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29: 685). Fracciones de direccionamiento a modo de ejemplo incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 5.416.016 de Low *et al.*); manósidos (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 tensioactiva (Briscoe *et al.* (1995) Am. J. Physiol. 1233:134), diferentes especies de las cuales puede comprender las formulaciones de las invenciones, así como componentes de las moléculas de la invención; p120 (Schreier *et al.* (1994) J. Biol. Chem. 269: 9090); véase también K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346: 123; J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4: 273. En una realización de la invención, los compuestos terapéuticos de la invención se formulan en liposomas; en otra realización, los liposomas incluyen una fracción de direccionamiento. En otra realización más, los compuestos terapéuticos en los liposomas de administran mediante inyección en embolada a un sitio próximo al tumor o infección. Las composiciones deben ser fluidas hasta el punto de que sean fácilmente inyectables. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y deben preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

25 La composición debe ser estéril y fluida hasta el grado en el que la composición puede administrarse por jeringa. Además de agua, el transportador puede ser una solución salina tamponada isotónica, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similar), y mezclas adecuadas de las mismas. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de la partícula necesaria en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede realizarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

35 Cuando el compuesto activo se protege adecuadamente, como se describe anteriormente, el compuesto puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un transportador comestible asimilable.

VIII. Uso y métodos de la invención

40 Los anticuerpos descritos en el presente documento (incluyendo derivados y conjugados de los anticuerpos) y composiciones que contienen los anticuerpos pueden usarse en diversas aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas *in vitro* e *in vivo* (por ejemplo, modulando positiva o negativamente la respuesta inmunitaria). Por ejemplo, la unión del ligando PD-1 a PD-1 o B7-1 transmite una señal inhibidora. Por tanto, la modulación de la interacción entre PD-1 y un ligando de PD-1, o entre un ligando de PD-1 y un polipéptido B7, da como resultado la modulación de la respuesta inmunitaria. Los ligandos PD-1 también coestimulan linfocitos T. Por tanto, en una realización, los anticuerpos que bloquean la interacción entre un ligando PD-1 y PD-1 o B7 pueden impedir la señalización inhibidora. En una realización, los anticuerpos que bloquean la señal coestimuladora del ligando PD-1 bloquean una señal coestimuladora contra una célula inmunitaria. Adicionalmente, el ligamiento de PD-L2 puede inducir secreción de citocinas y la supervivencia de células dendríticas. Por tanto, los anticuerpos que bloquean el ligamiento de PD-L2 pueden inhibir la supervivencia de las células dendríticas y reducir la expresión de citocinas por las células dendríticas, y a través de estos mecanismos inhibir una respuesta inmunitaria. En particular, los anticuerpos descritos en el presente documento son útiles para aplicaciones de diagnóstico, pronóstico, prevención y terapéutica relacionados con afecciones particulares mediadas por PD-1 y PD-L1, como se analiza, por ejemplo, en Keir *et al.* (2008) Annu. Rev. Immunol. 26: 677; Sharpe *et al.*, (2007) Nat. Immunol. 8: 239; Freeman *et al.* (2007) J. Exp. Med. 10: 2223.

60 Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de la presente invención pueden ser útiles para aplicaciones de diagnóstico, pronóstico, prevención y terapéuticas con respecto a enfermedades neurodegenerativas (geriopsicosis, enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeldt-jakob, neuropatía diabética, síndrome parkinsoniano, enfermedad de Huntington, enfermedad de Machado-Joseph, esclerosis lateral amiotrófica, neuropatía diabética y enfermedad Creutzfeldt Creutzfeldt-Jakob).

65 Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de la presente invención pueden ser útiles para aplicaciones de diagnóstico, pronóstico, prevención y terapéuticas (tales como el tratamiento y retraso de la aparición o progresión de las enfermedades) para enfermedades que aceleran la reacción inmunitaria, por ejemplo, asma, enfermedades autoinmunitarias (nefritis glomerular, artritis, enfermedad de tipo cardiomiopatía dilatada, colitis ulcerosa, síndrome

de Sjogren, enfermedad de Crohn, eritematosis sistémica, artritis reumatoide crónica, esclerosis múltiple, psoriasis, dermatitis alérgica por contacto, polimiositis, paquidermia, periarteritis nodosa, fiebre reumática, vitiligo vulgar, diabetes mellitus insulino dependiente, enfermedad de Behcet, enfermedad de Hashimoto, enfermedad de Addison, dermatomiositis, miastenia grave, síndrome de Reiter, enfermedad de Graves, anemia perniciosa, síndrome de Goodpasture, enfermedad de esterilidad, hepatitis activa crónica, pénfigo, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria y anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis crónica activa, enfermedad de Addison, síndrome anti-fosfolípido, alergia atópica, gastritis atópica autoinmunitaria, aclorhidra autoinmunitaria, enfermedad celiaca, síndrome de Cushing, dermatomiositis, lupus discoide, eritematosis, síndrome de Goodpasture, tiroiditis de Hashimoto, atrofia adrenal idiopática, trombocitopenia idiopática, diabetes insulino dependiente, síndrome de Lambert-Eaton, hepatitis lupoides, algunos casos de linfopenia, enfermedad de tejido conectivo mixta, penfigoide, pénfigo vulgaris, anemia perniciosa, uveítis facogénica, poliarteritis nodosa, autosíndromes poliglandulares, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, síndrome de Raynaud, policondritis recidivante, síndrome de Schmidt, esclerodermia limitada (o síndrome de crest), oftalmia simpática, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal, tirotoxicosis, resistencia a insulina de tipo b, colitis ulcerosa y granulomatosis de Wegener).

En una realización, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de la presente invención son útiles para aplicaciones de diagnóstico, pronóstico, prevención y terapéuticas (tales como tratamiento y retraso de la aparición o progresión de las enfermedades) para terapia y/o prevención de enfermedad infecciosa persistente (por ejemplo, enfermedades por infecciones víricas incluyendo HPV, HBV, Virus de la hepatitis C (HCV), retrovirus tales como virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1 y HIV-2), virus del herpes tal como virus de Epstein Barr (EBV), citomegalovirus (CMV), HSV-1 y HSV-2 y virus de la gripe. Otros antígenos asociados con patógenos que pueden utilizarse como se describe en el presente documento son antígenos de diversos parásitos, incluyen malaria, preferentemente péptido de malaria basada en repeticiones de NANP. Además, se incluyen enfermedades bacterianas, fúngicas y otros patógenos tales como *Aspergillus*, *Brugia*, *Candida*, *Chlamydia*, *Coccidia*, *Cryptococcus*, *Dirofilaria*, *Gonococcus*, *Histoplasma*, *Leishmania*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Paramecium*, *Pertussis*, *Plasmodium*, *Pneumococcus*, *Pneumocystis*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Toxoplasma* y *Vibrio cholerae*. Especies a modo de ejemplo incluyen *Neisseria gonorrhoea*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Trichomonas vaginalis*, *Haemophilus vaginalis*, Grupo B *Streptococcus* sp., *Microplasma hominis*, *Hemophilus ducreyi*, *Granuloma inguinale*, *Lymphopathia venereum*, *Treponema pallidum*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella canis*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter fetus intestinalis*, *Leptospira pomona*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella ovis*, *Chlamydia psittaci*, *Trichomonas foetus*, *Toxoplasma gondii*, *Escherichia coli*, *Actinobacillus equuli*, *Salmonella abortus ovis*, *Salmonella abortus equi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium equi*, *Corynebacterium pyogenes*, *Actinobacillus seminis*, *Mycoplasma bovis genitalium*, *Aspergillus fumigatus*, *Absidia ramosa*, *Trypanosoma equiperdum*, *Babesia caballi*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*; u hongos, tales como, por ejemplo, *Paracoccidioides brasiliensis*; u otros patógenos, por ejemplo, *Plasmodium falciparum*. También se incluyen patógenos prioritarios del National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). Estos incluyen, agentes de Categoría A, tales como variola mayor (viruela), *Bacillus anthracis* (ántrax), *Yersinia pestis* (peste), toxina de *Clostridium botulinum* (botulismo), *Francisella tularensis* (tularemia), filovirus (fiebre hemorrágica del Ebola, fiebre hemorrágica de Marburg), arenavirus (Lassa (fiebre de Lassa), Junin (fiebre hemorrágica argentina) y virus relacionados); agentes de Categoría B, tales como *Coxiella burnetii* (fiebre Q), especies de *Brucella* (brucelosis), *Burkholderia mallei* (muermo), alfavirus (encefalomielitis venezolana, encefalomielitis equina oriental y occidental), toxina de ricina de *Ricinus communis* (semillas de ricino), toxina épsilon de *Clostridium perfringens*; enterotoxina B de *Staphylococcus B*, especies de *Salmonella*, *Shigella dysenteriae*, cepa de *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio cholerae*, *Cryptosporidium parvum*; agentes de Categoría C, tales como virus nipah, hantavirus, virus de la fibra hemorrágica transmitida por garrapatas, virus de encefalitis transmitidos por garrapatas, fiebre amarilla y tuberculosis resistente a fármacos múltiples; helmintos, tales como *Schistosoma* y *Taenia*; y protozoos, tales como *Leishmania* (por ejemplo, *L. mexicana*) y *Plasmodium*.

En otra realización, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la presente invención son útiles para aplicaciones de diagnóstico, pronóstico, prevención y terapéuticas para rechazo de injerto de órganos, enfermedad de injerto frente a hospedador (GVHD), enfermedades alérgicas y enfermedades causadas por atenuación de la reacción inmunitaria, en la que participa PD-1, PD-L1 y/o PD-L2, por ejemplo, cáncer y enfermedades infecciosas.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento se administran a un sujeto de acuerdo con métodos conocidos tales como vías de administración intravenosa (por ejemplo, como una embolada o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo), subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, intra-articular, intrasinoval, intratecal o inhalación).

Un sujeto se trata si se obtienen uno o más resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados deseablemente clínicos. Para los fines de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: disminución de uno o más síntomas resultantes de la enfermedad, aumento de la calidad de vida de las personas que padecen la enfermedad, disminución de la dosis de otras medicaciones necesarias para tratar la enfermedad, retraso de la progresión de la enfermedad y/o prolongación de la supervivencia de los individuos.

1. Métodos de exploración

- Un aspecto de la presente divulgación se refiere a métodos de uso de anticuerpos de la presente divulgación para modular una respuesta inmunitaria modulando la coestimulación (tal como anticuerpos que modulan la función de PD-1, PD-L1 o PD-L2). Dichos métodos utilizan ensayos de exploración, incluyendo ensayos basados en células y no basados en células. En una realización los ensayos proporcionan un método para identificar anticuerpos que maduran la interacción de un PD-L1 y PD-1. En otra realización, los ensayos proporcionan un método para identificar anticuerpos que modulan la interacción entre un ligando de PD-1 y un polipéptido B7.
- En una realización, la divulgación se refiere a ensayos para explorar candidatos o anticuerpos de ensayo que se unen a, o modulan la actividad de PD-1, PD-L1 o PD-L2, por ejemplo, modulan la capacidad del polipéptido para interactuar con (por ejemplo, unirse a) su compañero de unión afín. En una realización, un método para identificar un anticuerpo para modular una respuesta inmunitaria conlleva determinar la capacidad del anticuerpo para modular, por ejemplo, potenciar o inhibir, la interacción entre PD-1 y un ligando de PD-1, y adicionalmente determinar la capacidad del anticuerpo para modular la interacción entre un ligando PD-1 y un polipéptido B7. En una realización, un anticuerpo que modula la interacción entre el ligando PD-1 y PD-1 (por ejemplo, sin modular la interacción entre ligando de PD-1 y el polipéptido B7 se selecciona). En otra realización, un anticuerpo que modula la interacción entre un ligando de PD-1 y un polipéptido B7 (por ejemplo, sin modular la interacción entre el ligando de PD-1 y PD-1) se selecciona.
- En otra realización, un método para identificar un anticuerpo para disminuir una respuesta inmunitaria conlleva determinar la capacidad de un anticuerpo candidato para potenciar la interacción entre un ligando PD-1 y un polipéptido B7 y seleccionar un anticuerpo que inhiba la interacción entre el ligando PD-1 y el polipéptido B7. En otra realización, un método para identificar un anticuerpo para disminuir una respuesta inmunitaria conlleva determinar la capacidad del anticuerpo candidato para potenciar la interacción entre un ligando PD-1 y PD-1 y seleccionar un anticuerpo que potencie la interacción entre el ligando PD-1 y PD-1.
- En otra realización, un ensayo basado en célula, que comprende poner en contacto una célula que exprese PD-1, PD-L1 o PD-L2, con un anticuerpo de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para modular (por ejemplo, estimular o inhibir) la unión de PD-1 o el ligando PD-1 diana con su compañero de unión. La determinación de la capacidad de PD-1, ligando de PD-1 o polipéptido B7 para unirse a, o interactuar con, su compañero de unión puede realizarse, por ejemplo, midiendo la unión directa o midiendo un parámetro de activación celular inmunitaria.
- Por ejemplo, en un ensayo de unión directa, PD-1 o la proteína ligando PD-1 (o sus respectivos polipéptidos diana) pueden acoplarse con un radioisótopo o marcador enzimático de tal manera que la unión de ligando PD-1 a PD-1 o al polipéptido B7 puede determinarse detectando la proteína marcada en un complejo. Por ejemplo, PD-1 o PD-L1 puede marcarse con ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C o ^3H , directa o indirectamente, y el radioisótopo detectarse mediante recuento directo de radioemisión o por recuento de centelleo. Como alternativa, PD-1 o el ligando de PD-1 puede marcarse enzimáticamente por ejemplo con peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o luciferasa, y el marcador enzimático puede detectarse por determinación de la conversión de un sustrato apropiado al producto.
- También se encuentra dentro del alcance de esta divulgación determinar la capacidad de un compuesto para modular la interacción entre PD-1 y un ligando PD-1 o entre un ligando PD-1 y un polipéptido B7 sin el marcaje de ninguno de los compuestos que interactúan. Por ejemplo, puede usarse un microfisiómetro para detectar la interacción de PD-1 y un ligando PD-1 o entre un ligando PD-1 y un polipéptido B7, con su polipéptido diana, sin marcar ninguno de PD-1, el ligando de PD-1, polipéptido B7, o el polipéptido diana (McConnell, H. M. *et al.* (1992) *Science* 257:1906-1912). Como se usa en el presente documento, un "microfisiómetro" (por ejemplo, Citosensor) es un instrumento analítico que mide la velocidad a la cual una célula acidifica su entorno usando un sensor potenciométrico dirigido por luz (LAPS). Los cambios en esta velocidad de acidificación pueden usarse como un indicador de la interacción entre un compuesto y un receptor.
- En otra realización, la determinación de la capacidad del anticuerpo para antagonizar la interacción entre un conjunto determinado de polipéptidos puede realizarse determinando la actividad de uno más miembros del conjunto de polipéptidos. Por ejemplo, la actividad de PD-1 o un ligando de PD-1 puede determinarse detectando la inducción de un segundo mensajero celular (por ejemplo, actividad tirosina quinasa), detectando la actividad catalítica/enzimática de un sustrato apropiado, detectando la inducción de un gen indicador (que comprende un elemento regulador sensible a diana unido operativamente a un ácido nucleico que codifica un marcador detectable, por ejemplo, cloranfenicol acetil transferasa), o detectando una respuesta celular regulada por PD-1 o el ligando de PD-1. La determinación de la capacidad del anticuerpo para unirse a o interactuar con dicho polipéptido puede realizarse, por ejemplo, midiendo la capacidad de un compuesto para modular la coestimulación o inhibición celular inmunitaria en un ensayo de proliferación, o por interferencia con la capacidad de dicho polipéptido para unirse a anticuerpos que reconocen una parte de los mismos.
- Los anticuerpos que bloquean o inhiben la interacción de un ligando PD-1 con un receptor coestimulador, así como anticuerpos que promueven una señal inhibitoria mediada por ligando de PD-1 pueden identificarse por su

capacidad para inhibir la proliferación celular inmunitaria y/o función efectora, o inducir anergia cuando se añade a un ensayo *in vitro*. Por ejemplo, las células pueden cultivarse en presencia de un agente que estimula la transducción de señal mediante un receptor de activación. Pueden emplearse diversas lecturas reconocidas de activación celular para medir la proliferación celular o función efectora (por ejemplo, producción de anticuerpos, producción de citocinas, fagocitosis) en presencia del agente activador. La capacidad de un anticuerpo de ensayo para bloquear esta activación puede determinarse fácilmente midiendo la capacidad del anticuerpo para afectar a una disminución en la proliferación o función efectora que se mide usando técnicas conocidas en la materia.

Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención pueden ensayarse por la capacidad de inhibir o potenciar la coestimulación en un ensayo en linfocitos T, como se describe en Freeman *et al.* (2000) *J. Exp. Med.* 192:1027 y Latchman *et al.* (2001) *Nat. Immunol.* 2:261. Los linfocitos T CD4⁺ pueden aislarse de PBMC humanas y estimularse con anticuerpo anti-CD3 de activación. La proliferación de linfocitos T puede medirse mediante incorporación de timidina 3H. Puede realizarse un ensayo con o sin coestimulación de CD28 en el ensayo. Pueden realizarse ensayos similares con células con linfocitos T Jurkat y blastos PHA de PBMC.

En otra realización adicional, un ensayo de la presente divulgación es un ensayo acelular en el que PD-1 o un ligando de PD-1 o una parte biológicamente activa de los mismos se pone en contacto con un anticuerpo de ensayo, y se determina la capacidad del anticuerpo de ensayo para unirse al polipéptido, o parte biológicamente activa del mismo. La unión del anticuerpo en ensayo con el polipéptido PD-1 o ligando de PD-1 puede determinarse directa o indirectamente como se ha descrito anteriormente. En otra realización más, el ensayo incluye poner en contacto el polipéptido, o parte biológicamente activa del mismo, con su compañero de unión para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un anticuerpo de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para interactuar con el polipéptido en la mezcla de ensayo, en el que la determinación de la capacidad del anticuerpo de ensayo para interactuar con el polipéptido comprende determinar la capacidad del anticuerpo de ensayo para unirse preferentemente al polipéptido o parte biológicamente activa del mismo, en comparación con el compañero de unión.

Por ejemplo, un ligando PD-1 y un polipéptido PD-1 puede usarse para formar una mezcla de ensayo y la capacidad de un anticuerpo de ensayo para bloquear esta interacción puede ensayarse determinando la capacidad de PD-1 para unirse al ligando PD-1 y determinar la capacidad del ligando PD-1 para unirse al polipéptido PD-1, mediante uno de los métodos descritos anteriormente para determinar la unión. La determinación de la capacidad de un polipéptido PD-1 para unirse a un ligando PD-1 y determinar la capacidad de un ligando PD-1 para unirse a un polipéptido B7 también puede realizarse usando una tecnología tal como análisis de interacción biomolecular en tiempo real (BIA) (Sjolander, S. y Urbaniczky, C. (1991) *Anal. Chem.* 63:2338-2345 y Szabo *et al.* (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705). Como se usa en el presente documento, "BIA" es una tecnología para estudiar interacciones biospecíficas en tiempo real, sin marcar ninguno de los compuestos que interactúan (por ejemplo, BIAcore). Pueden usarse cambios en el fenómeno óptico de resonancia del plasmón superficial (SPR) como una indicación de reacciones en tiempo real entre polipéptidos biológicos. PD-1, el ligando de PD-1 y polipéptido B7 pueden movilizarse en una microplaca BIAcore y los anticuerpos pueden ensayarse para unión a PD-1, el ligando de PD-1 y polipéptido B7. Un ejemplo del uso de la tecnología BIA lo describen Fitz *et al.* (1997) *Oncogene* 15:613.

Los ensayos acelulares de la presente divulgación se dirigen al uso de formas de proteínas solubles y/o unidas a membrana (por ejemplo, un ligando PD-1 o proteínas PD-1 o partes biológicamente activas de las mismas, o compañeros de unión a los cuales se une un ligando PD-1 o PD-1). En el caso de ensayos acelulares en los que se usa una proteína que forma una unión a membrana (por ejemplo, un receptor de PD-1 ligando PD-1 de superficie celular) puede ser deseable utilizar un agente solubilizante de tal manera que la forma unida a membrana de la proteína se mantenga en solución. Los ejemplos de dichos agentes solubilizantes incluyen detergentes no iónicos tales como n-octilglucósido, n-dodecilglucósido, n-dodecilmaltósido, octanoil-N-metilglucamida, decanoil-N-metilglucamida, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®, Isotridecipoil (éter de etilenglicol)_n, 3-[(3-colamidopropil)dimetilamino]-1-propano sulfonato (CHAPS), 3-[(3-colamidopropil)diethylamino]-2-hidroxi-1-propano sulfonato (CHAPSO), o N-dodecil=N,N-dimetil-3-amonio-1-propano sulfonato.

En una o más realizaciones de los métodos de ensayo descritos anteriormente, puede ser deseable inmovilizar bien PD-1, un ligando de PD-1 y un polipéptido B7, o un polipéptido diana apropiado para facilitar la separación de las formas que forman complejo de las que no forman complejo de una o ambas proteínas, así como acomodar la automatización del ensayo. La unión de un anticuerpo de ensayo o un ligando de PD-1 puede realizarse en cualquier recipiente adecuado para contener los reactantes. Los ejemplos de dichos recipientes incluyen placas de micotitulación, tubos de ensayo y tubos de microcentrifuga. En una realización, puede proporcionarse una proteína de fusión que añada un dominio que permita que una o ambas de las proteínas se unan a una matriz. Por ejemplo, proteínas de fusión glutatión-S-transferasa/PD-1, ligando de PD-1 o polipéptido B7 o proteínas de fusión glutatión-S-transferasa/diana, pueden absorberse sobre perlas de glutatión sefarosa (Sigma Chemical, St. Louis, MO) o placas de micotitulación derivatizadas con glutatión que después se combinan con el compuesto de ensayo, y la mezcla se incuba en condiciones que conducen a la formación del complejo (por ejemplo, a condiciones fisiológicas para sal y pH). Después de la incubación, las perlas o pocillos de la placa de micotitulación se lavan para retirar cualquier componente no unido, la matriz inmovilizada en el caso de perlas, determinado el complejo bien directa o indirectamente, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, los complejos pueden disociarse

de la matriz, y el nivel de unión o actividad de PD-1, ligando de PD-1 o polipéptido B7 determinarse usando técnicas convencionales.

5 En una realización alternativa, la determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para modular la actividad de PD-1 o ligando de PD-1 puede realizarse determinando la capacidad del anticuerpo de ensayo para modular la actividad de un polipéptido que actúa aguas abajo de PD-1 o ligando de PD-1, por ejemplo, un polipéptido que interacciona con el ligando PD-1, o un polipéptido que funciona aguas abajo de PD-1, por ejemplo, interaccionando con el dominio citoplasmático de PD-1. Por ejemplo, pueden determinarse niveles de segundos mensajeros, la actividad del polipéptido que interacciona sobre una diana apropiada puede determinarse, o la unión del compuesto que interacciona con una diana apropiada puede determinarse como se ha descrito anteriormente.

15 La presente divulgación también se refiere a nuevos anticuerpos identificados mediante los ensayos de exploración descritos anteriormente. Por consiguiente, está dentro del ámbito de la presente invención usar adicionalmente un anticuerpo identificado como se describe en el presente documento en un modelo animal apropiado. Por ejemplo, un anticuerpo identificado como se describe en el presente documento puede usarse en un modelo animal para determinar la eficacia, toxicidad o efectos secundarios del tratamiento con dicho anticuerpo. Como alternativa, un anticuerpo identificado como se describe en el presente documento puede usarse en un modelo animal para determinar el mecanismo de acción de dicho anticuerpo. Adicionalmente, la presente invención se refiere a usos de nuevos anticuerpos identificados por los ensayos de exploración descritos anteriormente para tratamientos como se describe en el presente documento.

2. Métodos profilácticos

25 Los anticuerpos de la presente invención y la divulgación pueden usarse para prevenir en un sujeto, una enfermedad o afección asociada con una respuesta inmunitaria no deseada, o no deseable. Los sujetos que están en riesgo de una enfermedad que podrían beneficiarse del tratamiento con los anticuerpos o métodos que se reivindican pueden identificarse, por ejemplo, mediante cualquiera o una combinación de ensayos de diagnóstico o pronóstico conocidos en la técnica. La administración de un anticuerpo profiláctico puede producirse antes de la manifestación de los síntomas asociados con una respuesta inmunitaria no deseada o no deseable. El anticuerpo apropiado usado para el tratamiento puede determinarse basándose en indicaciones clínicas y puede identificarse usando, por ejemplo, ensayos de exploración descritos en el presente documento.

3. Métodos terapéuticos

35 Los anticuerpos de la presente invención y divulgación pueden usarse en métodos terapéuticos de modulación de una respuesta inmunitaria, por ejemplo, modulando la interacción entre PD-1 y un ligando de PD-1 y/o un ligando de PD-1 y un polipéptido B7. Por ejemplo, la modulación de la interacción entre PD-1 y un ligando de PD-1, o entre un ligando de PD-1 y un polipéptido B7, da como resultado la modulación de la respuesta inmunitaria. Por tanto, en una realización, los anticuerpos que bloquean la interacción entre PD-1 y el ligando PD-1 pueden impedir la señalización inhibidora. Los ligandos de PD-1 también pueden potenciar señales coestimuladoras en linfocitos T. Por tanto, en otra realización, los anticuerpos que impiden que el ligando PD-L1 proporcione una señal coestimuladora que puede inhibir la coestimulación de linfocitos T.

45 Estos anticuerpos moduladores pueden administrarse *in vitro* (por ejemplo, poniendo en contacto la célula con un anticuerpo) o, como alternativa, *in vivo* (por ejemplo, administrando el agente a un sujeto). Como tales, los anticuerpos de la presente invención y divulgación pueden usarse en métodos de tratamiento de un individuo que padece una enfermedad o trastorno que podría beneficiarse de la modulación de una respuesta inmunitaria, por ejemplo, modulando la interacción entre un ligando de PD-1 y PD-1 o un polipéptido B7. La invención proporciona anticuerpos y fragmentos de los mismos para su uso en métodos de tratamiento, como se define en las reivindicaciones.

4. Regulación negativa de respuestas inmunitarias

55 Existen numerosas realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones de regulación positiva de la función inhibidora o regulación negativa de la función coestimuladora de un ligando de PD-1 para regular negativamente por tanto respuestas inmunitarias.

60 La regulación negativa puede ser en forma de inhibición o bloqueo de una respuesta inmunitaria ya en progreso o puede implicar la prevención de la inducción de una respuesta inmunitaria. Las funciones de las células inmunitarias activadas pueden inhibirse regulando negativamente las respuestas celulares inmunitarias, o induciendo anergia específica en células inmunitarias, o ambas cosas.

65 Por ejemplo, la respuesta inmunitaria puede modularse negativamente usando: anticuerpos anti-PD-L1 que bloquean la coestimulación mediante PD-L1 (por ejemplo, aunque no afecte o aumente la interacción entre PD-L1 y PD-1) o que promueva la unión de PD-L1 con PD-1 (por ejemplo, aunque no afecte o aunque inhiba la coestimulación por PD-L1).

En una realización de la invención, se induce tolerancia contra antígenos específicos coadministrando un antígeno con un anticuerpo que bloquea la coestimulación de PD-L1. Por ejemplo, la tolerancia puede inducirse en proteínas específicas. En una realización, pueden inhibirse las respuestas inmunitarias contra alérgenos, o contra proteínas exógenas en la que no es deseable una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, los pacientes que reciben factor VIII
 5 frecuentemente generan anticuerpos contra este factor de coagulación. La coadministración de un anticuerpo que bloquea una señal coestimuladora mediada por PD-L1 en combinación con el factor VIII recombinante (o mediante ligado físicamente al Factor VIII, por ejemplo, por reticulación) pueda dar como resultado la modulación negativa.

En una realización, dos agentes distintos que modulan negativamente respuestas inmunitarias pueden combinarse
 10 como una sola composición o administrarse individualmente (de manera simultánea o secuencial) para regular negativamente más eficazmente las respuestas inmunitarias mediadas por células inmunitarias en un sujeto. Adicionalmente, una cantidad terapéuticamente activa de uno o más de los anticuerpos del sujeto, pueden usarse junto con otros reactivos de modulación negativa para ejercer influencia en respuestas inmunitarias. Los ejemplos de otros reactivos inmunomoduladores incluyen, pero sin limitación, anticuerpos que bloquean una señal
 15 coestimuladora, (por ejemplo, contra CD28 o ICOS), anticuerpos que actúan como agonistas de CTLA4, y/o anticuerpos contra otros marcadores de células inmunitarias (por ejemplo, contra CD40, contra el ligando de CD40, o contra citocinas), proteínas de fusión (por ejemplo, CTLA4-Fc), y fármacos inmunosupresores, (por ejemplo, rapamicina, ciclosporina A o FK506).

La regulación negativa o prevención de una coestimulación del ligando PD-1, o la promoción de una interacción
 20 entre un ligando de PD-1 y PD-1 es útil para regular negativamente la respuesta inmunitaria, por ejemplo, en situaciones de trasplante de tejido, piel u órgano en enfermedad de injerto frente a hospedador (GVHD), o en enfermedades inflamatorias tales como lupus eritematoso sistémico, y esclerosis múltiple. Por ejemplo, el bloqueo de la función de las células inmunitarias da como resultado destrucción tisular reducida en trasplante tisular.
 25 Normalmente, en los trasplantes tisulares, el rechazo del trasplante se inicia a través de su reconocimiento como extraño por las células inmunitarias, seguido de una interacción inmunitaria que destruye el trasplante. La administración de un anticuerpo que inhibe la coestimulación del ligando PD-1 solo o junto con otro agente modulador negativo, antes de o en el momento del trasplante puede promover la generación de una señal inhibitoria. Además, la inhibición de señales coestimuladoras del ligando de PD-1 o la promoción de un ligando de PD-1 o
 30 señales inhibitorias de PD-1 también pueden ser suficientes para anergizar las células inmunitarias, induciendo de este modo tolerancia en un sujeto. La inducción de tolerancia prolongada bloqueando una señal coestimuladora mediada por ligando PD-1 puede impedir la necesidad de realizar una administración repetida de estos reactivos bloqueantes.

Para conseguir inmunosupresión o tolerancia suficiente en un sujeto, también puede ser deseable bloquear la
 35 función coestimuladora de otros polipéptidos. Por ejemplo, puede ser deseable bloquear la función de B7-1, B7-2 o B7-1 y B7-2 administrando una forma soluble de una combinación de péptidos que tienen actividad sobre cada uno de estos antígenos, bloqueando anticuerpos contra estos antígenos o bloqueando pequeñas moléculas (individualmente o juntos en una sola composición) antes de o en el momento del trasplante. Como alternativa,
 40 puede ser deseable promover la actividad inhibitoria de un ligando de PD-1 o PD-1 e inhibir una actividad coestimuladora de B7-1 y/o B7-2. Otros agentes moduladores negativos que pueden usarse junto con los métodos de modulación negativos de la invención incluyen, por ejemplo, agentes que transmiten una señal inhibitoria mediante CTLA4, formas solubles de CTLA4, anticuerpos que activan una señal inhibitoria mediante CTLA4, anticuerpos de bloqueo contra otros marcadores de células inmunitarias o formas solubles de otros pares de ligando
 45 receptor (por ejemplo, agentes que alteran la interacción entre CD40 y ligando de CD40 (por ejemplo, anticuerpos antiligando CD40)), anticuerpos contra citocinas o fármacos inmunosupresores.

La modulación negativa de las respuestas inmunitarias también es útil en el tratamiento de enfermedades
 50 autoinmunitarias. Muchos trastornos autoinmunitarios son el resultado de una activación inapropiada de células inmunitarias que son reactivas contra el propio tejido y que promueven la producción de citocinas y autoanticuerpos implicados en la patología de las enfermedades. La prevención de la activación de las células inmunitarias autorreactivas puede reducir o eliminar síntomas de enfermedades. La administración de reactivos que bloquean la coestimulación de células inmunitarias alterando interacciones entre ligando de PD-1 y polipéptidos B7, o
 55 promoviendo la interacción entre ligando de PD-1 y PD-1, sin modular o, aunque se module negativamente la interacción entre el ligando PD-1 y un polipéptido de B7, son útiles para inhibir la activación de células inmunitarias y prevenir la activación de autoanticuerpos o citocinas que pueden estar implicadas en procesos de enfermedad. Adicionalmente, agentes que promueven una función inhibitoria de un ligando de PD-1 o PD-1 pueden inducir tolerancia específica de antígenos de células inmunitarias autorreactivas, lo que podría conducir a alivio prolongado de la enfermedad. La eficacia de reactivos en la prevención o alivio de trastornos autoinmunitarios puede
 60 determinarse usando diversos modelos animales bien caracterizados de enfermedades autoinmunitarias humanas. Como ejemplos se incluyen encefalitis autoinmunitaria experimental murina, lupus eritematoso sistémico en ratones *MRLI/pr/pr* o ratones híbridos NZB, artritis inducida por colágeno autoinmunitario murino, diabetes mellitus en ratones NOD y ratas BB y miastenia grave experimental murina (véase, por ejemplo, Paul ed., *Fundamental Immunology*, Raven Press, Nueva York, tercera edición 1993, capítulo 30).

65

La inhibición de la activación de las células inmunitarias es terapéuticamente útil en el tratamiento de reacciones alérgicas y alergia, por ejemplo, inhibiendo la producción de IgE. Un anticuerpo que promueve un ligando PD-1 o la función inhibidora de PD-1 puede administrarse a un sujeto alérgico para inhibir las respuestas alérgicas mediadas por células inmunitarias en el sujeto. La inhibición de la coestimulación del ligando PD-1 de células inmunitarias o la estimulación de un ligando de PD-1 o la ruta inhibidora de PD-1 puede venir acompañada por la exposición al alérgeno junto con polipéptidos apropiados del MHC. Las reacciones alérgicas pueden ser sistémicas o locales en naturaleza, dependiendo de la vía de entrada del alérgeno y del patrón de deposición de IgE en mastocitos o basófilos. Por tanto, la inhibición de respuestas alérgicas mediadas por células inmunitarias local o sistémicamente por administración de una forma inhibidora de un agente que inhibe la interacción de un ligando de PD-1 con un receptor coestimulador, o un anticuerpo que promueve una función inhibidora de un ligando de PD-1 o PD-1.

La inhibición de la activación de células inmunitarias a través del bloqueo de la coestimulación del ligando PD-1, o a través de la promoción de la interacción entre un ligando PD-1 y PD-1, también puede ser terapéuticamente importante en infecciones víricas de células inmunitarias. Por ejemplo, en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la replicación viral se estimula mediante activación de células inmunitarias. La modulación de estas interacciones puede dar como resultado la inhibición de la replicación vírica y por tanto mejorar el transcurso del SIDA. La modulación de estas interacciones también puede ser útil en la promoción del mantenimiento del embarazo. El ligando de PD-1 normalmente se expresa a altos niveles en trofoblastos de placenta, la capa de células que forma la interfaz entre la madre y el feto y que puede desempeñar una función en la prevención de rechazo materno del feto. Las mujeres en riesgos de aborto espontáneo (por ejemplo, aquellas que ya han experimentado previamente un aborto o que tienen dificultad para concebir) debido al rechazo inmunológico del embrión o fetos pueden tratarse con agentes que modulan estas interacciones.

La regulación negativa de una respuesta inmunitaria por modulación de la coestimulación de un ligando PD-1 o por la modulación del ligando PD-1/unión PD-1 también puede ser útil en el tratamiento de ataque autoinmunitario de tejidos autólogos. Por ejemplo, el ligando PD-1 normalmente se expresa a altos niveles en el corazón y puede protegerlo de ataque autoinmunitario. Esto se pone de manifiesto por el hecho de que los ratones *knockout* Balb/c PD-1 presentan ataque autoinmunitario masivo en el corazón con trombosis. Por tanto, las afecciones que están ocasionadas o agravadas por ataque autoinmunitario (por ejemplo, en este ejemplo, cardiopatía, infarto de miocardio o aterosclerosis) pueden mejorarse o aumentarse por modulación de estas interacciones. Está por lo tanto dentro del ámbito de la invención modular afecciones agravadas por ataque autoinmunitario, tales como trastornos autoinmunitarios (así como afecciones tales como cardiopatía, infarto del miocardio y aterosclerosis).

5. Regulación positiva de respuestas inmunitarias

También es terapéuticamente útil es el bloqueo de la interacción de un ligando de PD-1 con PD-1 o B7-1 como un medio para regular positivamente una respuesta inmunitaria. La regulación positiva de las respuestas inmunitarias puede ser en forma de potenciación de una respuesta inmunitaria existente o desencadenamiento de una respuesta inmunitaria inicial. Por ejemplo, la potenciación de una respuesta inmunitaria usando las composiciones y métodos objeto es útil en caso de infecciones con microbios (por ejemplo, bacterias, virus o parásitos). En una realización, se usa un anticuerpo que bloquea la interacción de PD-L1 con PD-1 para potenciar la respuesta inmunitaria. Dicho anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo no activador que bloquea la unión de PD-L1 con PD-1) es terapéuticamente útil en situaciones en las que sería beneficiosa la regulación positiva de respuestas mediadas por células y anticuerpos. Como trastornos a modo de ejemplo se incluyen trastornos cutáneos víricos, tales como herpes o culebrillas, en cuyo caso dicho agente puede administrarse por vía tópica a la piel. Además, las enfermedades víricas sistémicas tales como gripe, resfriado común y encefalitis podrían aliviarse por la administración sistémica de dichos agentes.

Como alternativa, las respuestas inmunitarias pueden potenciarse en un paciente infectado a través de una estrategia *ex vivo*, por ejemplo, sustrayendo células inmunitarias del paciente, poniendo en contacto las células inmunitarias *in vitro* con un anticuerpo que bloquea la interacción de un ligando PD-1 con PD-1 y reintroduciendo las células inmunitarias estimuladas *in vitro* al paciente.

En determinados casos, sería deseable administrar adicionalmente otros agentes que regulen positivamente las respuestas inmunitarias, por ejemplo, formas de otros miembros de la familia B7 que transducen señales mediante receptores coestimuladores, para aumentar adicionalmente la respuesta inmunitaria.

Un anticuerpo que bloquea la interacción de un ligando PD-1 con PD-1 o B7-1 puede usarse profilácticamente en vacunas contra diversos polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos procedentes de patógenos). La inmunidad contra un patógeno (por ejemplo, un virus) puede inducirse vacunando con una proteína vírica junto con un anticuerpo que bloquea la interacción de un ligando PD-1 con PD-1 o B7-1 en un adyuvante apropiado.

En otra realización, la regulación positiva o potenciación de una función de una respuesta inmunitaria, como se describe en el presente documento, es útil en la inducción de inmunidad tumoral.

En otra realización, la respuesta inmunitaria puede estimularse por los métodos descritos en el presente documento,

- de tal manera que se supera la tolerancia preexistente. Por ejemplo, las respuestas inmunitarias contra antígenos contra los cuales un sujeto no puede crear una respuesta inmunitaria significativa, por ejemplo, contra un antígeno autólogo, tal como antígenos específicos de tumor pueden inducirse administrando un anticuerpo que bloquee la interacción de un ligando de PD-1 con PD-1. En una realización, un antígeno autólogo, tal como un antígeno específico de tumor, puede coadministrarse. En otra realización, puede estimularse una respuesta inmunitaria contra un antígeno (por ejemplo, un antígeno autólogo) para tratar un trastorno neurológico. En otra realización, los agentes objeto pueden usarse como adyuvantes para reforzar respuestas contra antígenos exógenos en el proceso de inmunización activa.
- 10 En una realización, se obtienen células inmunitarias de un sujeto y se cultivan *ex vivo* en presencia de un anticuerpo como se describe en el presente documento, para ampliar la población de células inmunitarias y/o potenciar la activación de células inmunitarias. En una realización adicional las células inmunitarias se administran después a un sujeto. Las células inmunitarias pueden estimularse *in vitro*, por ejemplo, proporcionando a las células inmunitarias una señal de activación primaria y una señal coestimuladora, como se sabe en la técnica. Para coestimular la proliferación de las células inmunitarias pueden usarse diversos agentes. En una realización las células inmunitarias se cultivan *ex vivo* de acuerdo con el método descrito en la Publicación PCT n.º WO 94/29436. El polipéptido coestimulador puede ser soluble, estar unido a una membrana celular, o unido a una superficie sólida, tal como una perla.
- 20 Otras realizaciones de la presente invención se describen en los siguientes Ejemplos. La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

- 25 Los ejemplos descritos a continuación describen la generación de anticuerpos monoclonales adecuados para propósitos terapéuticos que se dirigen a PD-1 humano, PD-L1 y PD-L2. Los anticuerpos compuestos humanos anti-PD-1, PD-L1 y PD-L2 humanos se generaron a partir de anticuerpos de ratón anti EH12.2H7, 29E.2A3 y 24F.10C12 humanos, respectivamente. Los segmentos de la secuencia de la región V humana se adquirieron de las bases de datos de secuencias de anticuerpos humanos no relacionadas (línea germinal y línea no germinal). Cada segmento de secuencia seleccionado (así como las uniones entre segmentos) se sometió a ensayo con respecto a la posibilidad de unirse al MHC de clase II usando algoritmos de predicción de unión. Todo los variantes de secuencia de anticuerpos humanos compuestos finales se diseñaron para impedir epítomos de linfocitos T. Las regiones de la región V de anticuerpo humano compuestas se generaron usando oligonucleótidos sintéticos que codifican combinaciones de segmentos de secuencia humana. Después estos se clonaron en vectores que contenían regiones constantes humanas, y se produjeron anticuerpos y ensayaron con respecto a la unión a antígenos diana por ELISA de competencia. Los anticuerpos anti PD-1 y anti PD-L2 desvelados en los ejemplos están fuera del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones, pero se conservan para información de fondo.

Ejemplo 1: Diseño de secuencias de región variable de anticuerpo humano, compuestas

- 40 Modelos estructurales de las regiones EH12.2H7, 29E.2A3 y 24F.10C12 V de ratón se produjeron usando Swiss Pdb y se analizaron para identificar aminoácidos importantes "de restricción" en las regiones V de ratón que podrían ser esenciales para las propiedades de unión de los anticuerpos. Únicamente los restos contenidos en las CDR se consideraron que eran importantes, incluyendo los restos de la CDR definidos en las definiciones de Kabat y Chothia.

- 50 A partir de los análisis anteriores, se consideró que las formas humanas compuestas de EH12.2H7, 29E.2A3 y 24F.10C12 podrían crearse sin una amplia latitud de secuencias fuera de las CDR pero con un menú estrecho de posibles restos alternativos dentro de las secuencias CDR. Análisis preliminares indicaron que los segmentos de secuencia correspondientes de diversos anticuerpos humanos podrían combinarse para crear CDR similares o idénticas a las de las secuencias de ratón. Para las regiones fuera de y que flanquean las CDR, se identificó una amplia selección de segmentos de secuencia humana como posibles componentes de las nuevas regiones variables de anticuerpo humano compuesto.

- 55 Basándose en los análisis anteriores, se seleccionó un gran conjunto preliminar de segmentos de secuencia que podrían usarse para crear variantes de anticuerpo humano compuesto EH12.2H7, 29E.2A3 y 24F.10C12 y se analizaron mediante algoritmos de predicción de unión de MHC de clase II y búsqueda con BLAST a través de una base de datos patentada de secuencia de anticuerpos conocida relacionada con epítomos de linfocitos T. Segmentos de secuencia en los que se identificaron posibles péptidos de unión al MHC de clase II o se puntuaron aciertos significativos contra la base de datos de epítomos de linfocitos T conocidos se descartaron. Esto produjo un conjunto reducido de segmentos, y las combinaciones de estos se analizaron de nuevo, como se ha indicado anteriormente, para garantizar que las uniones entre los segmentos no contenían posibles epítomos de linfocitos T. Después los segmentos seleccionados se combinaron para producir secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera para la síntesis. Para los tres anticuerpos, se construyeron cinco cadenas pesadas y cuatro cadenas ligeras con las secuencias detalladas a continuación:

Antígeno Secuencias VH Compuestas Secuencias VK Compuestas

PD-1	Figura 2 (A-E)	Figura 3 (A-D)
PD-L1	Figura 4 (A-E)	Figura 5 (A-D)
PD-L2	Figura 6 (A-E)	Figura 7 (A-D)

Los segmentos de secuencia usados para producir estas secuencias de anticuerpos humanos compuestas, se detallan en las Tablas 1, 2 y 3 para anticuerpos contra PD-1, PD-L1 y PD-L2, respectivamente.

5

Tabla 1. Derivación de segmentos de secuencia humana que comprenden los anticuerpos humanos, compuestos anti-PD-1

n.º de Registro Genbank	Secuencia VH3	(a)
BAA75018	QVQLVQSGHEVKQPGASVK (SEQ ID NO: 82)	
AAG00910	MSCKASGYSFTS (SEQ ID NO: 83)	
AAY18543	SGYSFTSSWI (SEQ ID NO: 84)	
AAY57105	WIHWV (SEQ ID NO: 85)	
AAG00910	KQ	
AAD16517	QAPGQGLEWIG (SEQ ID NO: 86)	
AAD53797	GLEWIGYIYPS (SEQ ID NO: 87)	
CAA08742	STGF (SEQ ID NO: 88)	
CAC87219	TEYN (SEQ ID NO: 89)	
AAT96419	QKF	
AAA17939	KDR	
AAR02530	DRAT (SEQ ID NO: 90)	
AAA17939	TLT	
AAM87977	TADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR (SEQ ID NO: 91)	
CAA78534	STAYMELSSLRSEDVAVYYCARWRD (SEQ ID NO: 92)	
AAV40096	DSSGY (SEQ ID NO: 93)	
AAR38557	YHA	
AAW29142	AMD	
IGHJ4	DYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 94)	
n.º de Registro Genbank	Secuencia VH4	(b)
BAA75018	QVQLVQSGHEVKQPGASVK (SEQ ID NO: 82)	
AAG00910	MSCKASGYSFTS (SEQ ID NO: 83)	
AAY18543	SGYSFTSSWI (SEQ ID NO: 84)	
AAA02616	HWVRQAPGQGLEWIG (SEQ ID NO: 95)	
AAD53797	GLEWIGYIYPS (SEQ ID NO: 87)	
CAA08742	STGF (SEQ ID NO: 88)	
CAC87219	TEYN (SEQ ID NO: 89)	
AAT96419	QKF	
AAA17939	KDR	
AAR02530	DRAT (SEQ ID NO: 90)	
AAA17939	TLT	
AAM87977	TADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR (SEQ ID NO: 91)	
CAA78534	STAYMELSSLRSEDVAVYYCARWRD (SEQ ID NO: 92)	
AAV40096	DSSGY (SEQ ID NO: 93)	
AAR38557	YHA	
AAW29142	AMD	
IGHJ4	DYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 94)	
n.º de Registro Genbank	Secuencia Vk3	(c)
AAY16615	EIVLTQSPATLSLSPGQR (SEQ ID NO: 96)	
AAD09377	RLTISCRASQ (SEQ ID NO: 97)	
AAA99362	TISCRASQSVST (SEQ ID NO: 98)	
AAL04518	SVSTSGYSYMHW (SEQ ID NO: 99)	
AAA58912	WYQQKPDQSPKLLIK (SEQ ID NO: 100)	
AAD16648	FGS	
AAD19478	SNLESG (SEQ ID NO: 101)	
AAL10884	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA (SEQ ID NO: 102)	
AAD16559	PEDFATYYCQHS (SEQ ID NO: 103)	

AAA99326	SW	
AAC16811	EIP	
human J2	YTFGQGTKT EIK (SEQ ID NO: 104)	
n.º de Registro Genbank	Secuencia Vκ4	(d)
AAB53267	DIVLTQSP (SEQ ID NO: 105)	
AAY16615	IVLTQSPATLSLSPGQR (SEQ ID NO: 106)	
AAD09377	RLTISCRASQ (SEQ ID NO: 97)	
AAA99362	TISCRASQSVST (SEQ ID NO: 98)	
AAL04518	SVSTSGYSYMHV (SEQ ID NO: 99)	
AAA58912	WYQQKPDQSPKLLIK (SEQ ID NO: 100)	
AAD16648	FGS	
AAD19478	SNLESG (SEQ ID NO: 101)	
AAL10884	GIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFA (SEQ ID NO: 102)	
AAD16559	PEDFATYYCQHS (SEQ ID NO: 103)	
AAA99326	SW	
AAC16811	EIP	
human J2	YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 104)	

Tabla 2. Derivación de los segmentos de secuencia humana que comprenden los anticuerpos humanos compuestos anti-PD-L1

n.º de Registro Genbank	Secuencia VH2	(a)
ABI50688	EVQLVQSGAEVKKPGASVK (SEQ ID NO: 107)	
AAG00910	MSCKASGY (SEQ ID NO: 108)	
ABI50688	SCKASGYTFTSY (SEQ ID NO: 109)	
AAC50839	SYVMHWV (SEQ ID NO: 110)	
CAC43594	WVKQ (SEQ ID NO: 111)	
AAA18267	QAPGQRLEWIG (SEQ ID NO: 112)	
ABF20472	GY	
AAD30737	VNPF (SEQ ID NO: 113)	
CAL06274	NDGT (SEQ ID NO: 114)	
CAC43212	KYN	
CAC87219	YNE	
CAD31770	EM	
AAR32413	FKGR (SEQ ID NO: 115)	
AAG30515	GRAT (SEQ ID NO: 116)	
ABA62048	TLT	
ABI50549	TSD	
AAR32572	DKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCA (SEQ ID NO: 117)	
AAC18225	AVYYCARQA (SEQ ID NO: 118)	
AAV39747	AWGY (SEQ ID NO: 119)	
IGHJ5*02	PWGQGLTVVSS (SEQ ID NO: 120)	
n.º de Registro Genbank	Secuencia VH4	(b)
ABI50688	EVQLVQSGAEVKKPGASVK (SEQ ID NO: 107)	
AAG00910	MSCKASGY (SEQ ID NO: 108)	
ABI50688	SCKASGYTFTSY (SEQ ID NO: 109)	
AAC50839	SYVMHWV (SEQ ID NO: 110)	
AAA18267	WVRQAPGQRLEWIG (SEQ ID NO: 121)	
ABF20472	GY	
AAD30737	VNPF (SEQ ID NO: 113)	
CAL06274	NDGT (SEQ ID NO: 114)	
CAC43212	KYN	
CAC87219	YNE	
CAD31770	EM	
AAR32413	FKGR (SEQ ID NO: 115)	
AAG30515	GRAT (SEQ ID NO: 116)	
ABA62048	TLT	
ABI50549	TSD	
AAR32572	DKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCA (SEQ ID NO: 117)	
AAC 18225	AVYYCARQA (SEQ ID NO: 118)	(b)

AAV39747	AWGY (SEQ ID NO: 119)	
IGHJ5*02	PWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 120)	
n.º de Registro Genbank	Secuencia Vκ1	(c)
CAA31193	DIVLTQSPASLALS (SEQ ID NO: 122)	
ABA26115	LSPGERAT (SEQ ID NO: 123)	
AAQ21828	ESV	
CAA51101	VE	
AAA58691	YYGTSL (SEQ ID NO: 124)	
AAV33369	VQWYQQKPGQ (SEQ ID NO: 125)	
ABI74051	WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO: 126)	
CAC39383	PKLLIYAASS (SEQ ID NO: 127)	
CAA38592	SVDS (SEQ ID NO: 128)	
AAK26833	DSGVPSRFGSGSGT (SEQ ID NO: 129)	
AAM46660	RFSGSGSGTDFTLTINSLE (SEQ ID NO: 130)	
AAI04518	EEEDAA (SEQ ID NO: 131)	
AAK68016	AMYFCQQ (SEQ ID NO: 132)	
CAK50767	SR	
AAP23227	RVPYTFG (SEQ ID NO: 133)	
Human J2	YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 104)	
n.º de Registro Genbank	Secuencia Vκ2	(d)
CAA31193	DIVLTQSPASLALS (SEQ ID NO: 122)	
CAE54363	IVLTQSPATLSLSPGE (SEQ ID NO: 134)	
ABA26115	LSPGERAT (SEQ ID NO: 123)	
AAQ21828	ESV	
CAA51101	VE	
AAA58691	YYGTSL (SEQ ID NO: 124)	
AAV33369	VQWYQQKPGQ (SEQ ID NO: 125)	
ABI74051	WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO: 126)	
CAC39383	PKLLIYAASS (SEQ ID NO: 127)	
CAA38592	SVDS (SEQ ID NO: 128)	
AAK26833	DSGVPSRFGSGSGT (SEQ ID NO: 129)	
AAM46660	RFSGSGSGTDFTLTINSLE (SEQ ID NO: 130)	
AAA58912	TINSLEAEDAA (SEQ ID NO: 135)	
AAK68016	AMYFCQQ (SEQ ID NO: 132)	
CAK50767	SR	
AAP23227	RVPYTFG (SEQ ID NO: 133)	
Human J2	YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 104)	
n.º de Registro Genbank	Secuencia Vκ4	(e)
CAA31193	DIVLTQSPASLALS (SEQ ID NO: 122)	
CAE54363	IVLTQSPATLSLSPGE (SEQ ID NO: 134)	
ABA26115	LSPGERAT (SEQ ID NO: 123)	
AAQ21828	ESV	
CAA51101	VE	
AAA58691	YYGTSL (SEQ ID NO: 124)	
AAV33369	VQWYQQKPGQ (SEQ ID NO: 125)	
ABI74051	WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO: 126)	
CAC39383	PKLLIYAASS (SEQ ID NO: 127)	
CAA38592	SVDS (SEQ ID NO: 128)	
AAK26833	DSGVPSRFGSGSGT (SEQ ID NO: 129)	
AAM46660	RFSGSGSGTDFTLTINSLE (SEQ ID NO: 130)	
AAA58912	TINSLEAEDAATYFC (SEQ ID NO: 136)	
AAK68016	AMYFCQQ (SEQ ID NO: 132)	
CAK50767	SR	
AAP23227	RVPYTFG (SEQ ID NO: 133)	
Human J2	YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 104)	

Tabla 3. Derivación de segmentos de secuencia humana que comprenden los anticuerpos humanos anti-PD-L2 compuestos

n.º de Registro Genbank	Secuencia VH2	(a)
ABF83419	QVQLVQSGAEVKKPGASVK (SEQ ID NO: 137)	
AAG00910	MSCKASGY (SEQ ID NO: 108)	
ABF83419	SCKASGYTFTGY (SEQ ID NO: 138)	
AAL17955	TMHWV (SEQ ID NO: 139)	
CAC43594	WVKQ (SEQ ID NO: 111)	
AAL17955	QAPG (SEQ ID NO: 140)	
AAF40162	GQGLEWIG (SEQ ID NO: 141)	
AAR02558	GYINP (SEQ ID NO: 142)	
AAR32283	INPRSG (SEQ ID NO: 143)	
AAR02553	GYT	
CAC87219	TEYN (SEQ ID NO: 89)	
AAT96419	QKF	
AAA17939	KDR	
AAB06403	RTT	
AAA17939	TLT	
AAG30529	TADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR (SEQ ID NO: 91)	
ABE66740	DTAVYYCARPW (SEQ ID NO: 144)	
ABK81281	WFAYWGQGT (SEQ ID NO: 145)	
IGHJ4	YWGQGLTIVTSS (SEQ ID NO: 146)	
n.º de Registro Genbank	Secuencia VH4	(b)
ABF83419	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTGY (SEQ ID NO: 147)	
AAL17955	TMHWVRQAPG (SEQ ID NO: 148)	
AAF40162	GQGLEWIG (SEQ ID NO: 141)	
AAR02558	GYINP (SEQ ID NO: 142)	
AAR32283	INPRSG (SEQ ID NO: 143)	
AAR02553	GYT	
CAC87219	TEYN (SEQ ID NO: 89)	
AAT96419	QKF	
AAA17939	KDR	
AAB06403	RTT	
AAA17939	TLT	
AAG30529	TADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR (SEQ ID NO: 91)	
ABE66740	DTAVYYCARPW (SEQ ID NO: 144)	
ABK81281	WFAYWGQGT (SEQ ID NO: 145)	
IGHJ4	YWGQGLTIVTSS (SEQ ID NO: 146)	
n.º de Registro Genbank	Secuencia Vκ2	(c)
AAD16249	DIVMTQSP (SEQ ID NO: 149)	
CAA31193	PASL (SEQ ID NO: 150)	
AAA58913	LSVTPGEKVTITC (SEQ ID NO: 151)	
AAQ99244	CKSSQSL (SEQ ID NO: 152)	
ABA71421	LNS	
AAD19451	GN	
AAS86065	QK	
AAD14073	KNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF (SEQ ID NO: 153)	
AAZ09126	RFTGSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYCQ (SEQ ID NO: 154)	
CAA31484	NDY	
CAC87582	YSYPL (SEQ ID NO: 155)	
human J1	TFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 156)	
n.º de Registro Genbank	Secuencia Vκ3	(d)
AAD16249	DIVMTQSP (SEQ ID NO: 149)	

AAA58913	VMTQSPAFLSVTPGEKVTITC (SEQ ID NO: 157)	
AAQ99244	CKSSQSLL (SEQ ID NO: 152)	
ABA71421	LNS	
AAD 19451	GN	
AAS86065	QK	
AAD14073	KNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF (SEQ ID NO: 153)	
AAZ09126	RFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ (SEQ ID NO: 154)	
CAA31484	NDY	
CAC87582	YSYPL (SEQ ID NO: 155)	
human J1	TFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 156)	
n.º de Registro Genbank	Secuencia Vκ4	(e)
AAD 16249	DIVMTQSP (SEQ ID NO: 149)	
AAA58913	VMTQSPAFLSVTPGEKVTITC (SEQ ID NO: 157)	
AAQ99244	CKSSQSLL (SEQ ID NO: 152)	
ABA71421	LNS	
AAD 19451	GN	
AAS86065	QK	
AAD14073	KNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF (SEQ ID NO: 153)	
CAD44754	RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ (SEQ ID NO: 158)	
CAA31484	NDY	
CAC87582	YSYPL (SEQ ID NO: 155)	
human J1	TFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 156)	

Ejemplo 2: generación y ensayo de los anticuerpos humanos, compuestos

5 Los genes de la región VH y VK del anticuerpo humano compuestos de variante 1 inicial, se sintetizaron para EH12.2H7, 29E.2A3 y 24F.10C12 usando una serie de oligonucleótidos solapantes que se hibridaron, se ligaron y se amplificaron por PCR para producir regiones V sintéticas de longitud completa (Figura 2A, Figura 3A, Figura 4A, Figura 5A, Figura 6A y Figura 7A). Para cada anticuerpo humano compuesto, se construyeron variantes de secuencia posteriores usando oligonucleótidos solapantes largos y PCR usando la variante 1 inicial como molde. Después las variantes ensambladas se clonaron directamente en vectores de expresión (Figura 1) y sus secuencias se verificaron.

10 Todas las combinaciones de las cadenas pesada y ligera quiméricas y compuestas (es decir un total de 20 emparejamientos para cada anticuerpo) se transfectaron de manera estable en células NS0 por electroporación y se seleccionaron en medios (DMEM alto contenido de glucosa con L-glutamina y Na piruvato, IgG FCS ultra bajo 5 %, pen/estrep - todos ellos de Invitrogen) que contenían metotrexato 200 nM. Se ensayaron diversas colonias resistentes a fármacos para cada construcción para los niveles de expresión y las líneas de mejor expresión se seleccionaron y congelaron con nitrógeno líquido.

20 Los sobrenadantes de las líneas que mejor se expresaron de cada combinación se cuantificaron usando una captura Fc, ELISA de detección de cadena ligera Kappa en comparación con un patrón IgG1/kappa. Después los sobrenadantes cuantificados se ensayaron en un ELISA de competencia para la unión con su antígeno diana. Noventa y seis pocillos de placas Maxisorb™ (Nunc) se recubrieron durante una noche a 4 °C con 50 µl/pocillo de Fc-PD-1, Fc-PD-L1 o Fc-PD-L2 humano 1 µg/ml (R & D Systems) en tampón carbonato pH 9,6. Se generaron titulaciones por duplicado del anticuerpo de referencia de ratón y muestras de anticuerpo humano compuesto (en el intervalo de 0,0078 µg/ml a 8 µg/ml) y se mezclaron con una concentración constante (40 ng/ml) de anticuerpo de referencia de ratón biotinilado en PBS pH 7,4/BSA al 2 %. Se añadieron las titulaciones, 100 µl/pocillo, a placas de ensayo lavadas (4x con PBS pH 7,4/Tween 20 al 0,05 %) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron como se ha indicado anteriormente, y se añadieron 100 µl/pocillo de una dilución 1/1000 de HRP estreptavidina (Sigma) en PBS pH 7,4/BSA al 2 % y se incubó durante 1 hora más a temperatura ambiente.

30 Después de un lavado adicional, el anticuerpo de referencia biotinilado unido se detectó con sustrato OPD 100 µl/pocillo. Se midió la absorbancia a 490 nm y las curvas de unión de los anticuerpos de ensayo se compararon con el patrón de referencia de ratón. La absorbancia se representó gráficamente frente a la concentración de muestra y las líneas rectas se ajustaron a través de cada uno de los conjuntos de datos. Las ecuaciones de las líneas se usaron para calcular la concentración necesaria para inhibir la unión de biotina-EH12.2H7 con PD-1, la unión de biotina-29E.2A3 con PD-L1 y la unión de biotina-24F.10C12 con PD-L2 humano al 50 % (CI₅₀).

35

Los anticuerpos con el mayor valor CI_{50} se seleccionaron y las líneas celulares de todas estas variantes de anticuerpos EH12.2H7, 29E.2A3 y 24F.10C12 se aumentaron de volumen a 100 ml y crecieron hasta la saturación. Los anticuerpos se purificaron de cada cultivo mediante cromatografía de afinidad con proteína A. En resumen, el pH de los sobrenadantes se ajustó con un volumen de 0,1 de PBS 10 x pH 7,4 y se pasaron sobre columnas de proteína A de 1 ml Mab Select Sure (GE Healthcare). Las columnas se lavaron con 10 volúmenes de PBS pH 7,4 antes de la elución con tampón citrato 50 mM pH 3,0. Se recogieron fracciones de 1 ml e inmediatamente se neutralizaron con 0,1 ml de Tris-HCl 1 M pH 9,0. Las fracciones que contenían proteína (según la absorbancia a 280 nm) se agruparon, el tampón se cambió en PBS pH 7,4 y los anticuerpos purificados se conservaron a + 4 °C. Las figuras 8A-C muestran un gel SDS-PAGE de 1 µg de cada anticuerpo, teñido con azul de coomassie. Las concentraciones de los anticuerpos se calcularon mediante absorción UV basándose en los coeficientes de extinción molar calculados de tal manera que $E_{0,1\%}$ a 280 nm = 1,61 para EH12.2H7, $E_{0,1\%}$ a 280 nm = 1,46 para 29E.2A3 y $E_{0,1\%}$ a 280 nm = 1,57 para 24F.10C12.

Los anticuerpos purificados se ensayaron con respecto a la unión a Fc-PD-1, Fc-PD-L1 o PD-Fc-L2 humano mediante ensayo de competición ELISA como se ha descrito anteriormente. Las titulaciones de los anticuerpos de ensayo se realizaron a partir de 0,0625 µg/ml a 8,0 µg/ml por duplicado. Se midió la absorbancia a 490 nm y esta se representó gráficamente frente a la concentración del anticuerpo de ensayo (Figuras 9A-C, 10A-C).

La Tabla 4 resume los resultados de las combinaciones de las secuencias variantes VH y VK del compuesto para los anticuerpos anti-PD-1, PD-L1 y PD-L2. Para EH12.2H7 todos los anticuerpos humanizados tenían un valor CI_{50} que se mejora en comparación con la referencia de ratón, particularmente VH4/VK3 que tenía un aumento de dos veces en cuanto a la unión. En el caso de 29E.2A3, las variantes VH2/VK1 y VH2/VK4 tenían equivalente unión con respecto a la referencia de ratón mientras que las variantes VH2/VK2 y VH4/VK2 tenían una unión reducida al 1,75 y 1,36 veces respectivamente. Para 24F.10C12, todas las variantes seleccionadas tenían una unión similar, aunque ligeramente reducida, en comparación con la referencia del ratón (1,13 veces).

Tabla 4: Valores CI_{50} para variantes de secuencia del anticuerpo humano, compuesto PD-1, PD-L1 y PD-L2

Anticuerpo EH12.2H7	CI_{50} µg/ml	Anticuerpo 29E.2A3	CI_{50} µg/ml	Anticuerpo 24F.10C12	CI_{50} µg/ml
ratón	1,23	ratón	0,28	ratón	0,52
VH3/VK3	0,93	VH2/VK1	0,27	VH2/VK2	0,58
VH3/VK4	0,74	VH2/VK2	0,49	VH2/VK3	0,59
VH4/VK3	0,57	VH4/VK2	0,38	VH4/VK2	0,60
VH4/VK4	0,91	VH2/VK4	0,29	VH4/VK4	0,58

Como resultado de estos experimentos, los anticuerpos humanos compuestos específicos para PD-1, PD-L1 y PD-L2 humanos se habían construido a partir de segmentos de secuencias de aminoácidos procedentes de regiones variables de anticuerpo humano no relacionadas. Todas las CDR y regiones marco conservadas en las variantes de anticuerpo humano compuestas comprendían más de un segmento de secuencia humana no relacionado (obtenido de la base de datos de secuencias humanas) y todos los anticuerpos humanos compuestos se diseñaron específicamente para impedir epítopos de linfocitos T. Cuatro candidatos principales se seleccionaron inicialmente para la unión a PD-1, PD-L1 o PD-L2 humano y, después de análisis posterior, se demostró que tenían unión con un factor de dos sobre el anticuerpo murino.

Ejemplo 5: Estimulación potenciada de la activación de linfocitos T por inhibición de la interacción entre PD-1: ligando PD

La ruta de señalización de PD-1 inhibe señales coestimuladoras moderadas de TCR/CD28, reduciéndose la producción de citocina primero sin una disminución en la proliferación de linfocitos T. A medida que las señales coestimuladoras de TCR/CD28 se debilitan, la ruta PD-1 domina, con una gran reducción en la producción de citocinas acompañada por una reducción en la proliferación. Por consiguiente, para confirmar que la inhibición de la ruta de PD-1 mediante la inhibición de la interacción con PD-L1 o PD-L2 usando los anticuerpos humanos compuestos de la invención potencia la activación de linfocitos T, se realizan reacciones mixtas de linfocitos (MLR).

Se aíslan células dendríticas mieloides inmaduras cultivando monocitos de sangre periférica humana en IL-4 y GM-CSF. La exposición de células dendríticas inmaduras a un cóctel inflamatorio de IL-1 β, TNF-α, IL-6 y PGE₂ suscita el desarrollo de células dendríticas maduras que funcionan como APC. Sin embargo, la adición de IL-10 a las citocinas inflamatorias dadas durante la fase de maduración produce APC que funcionan solo 1/6 a 1/3 también.

Se realizaron ensayos de activación de linfocitos T (MLR), usando células dendríticas tratadas con IL-10 como APC, en presencia de los anticuerpos humanos, compuestos contra PD-1, PD-L1 y/o PD-L2, o anticuerpos control. La adición de mAb anti-PD-1, anti-PD- L1 y/o PD-L2 a cultivos de células dendríticas tratadas con IL-1 0 más linfocitos T alogénicos se predice que produce un aumento en la proliferación de linfocitos T y expresión de citocinas, en comparación con cultivos tratados con IgG control. Una combinación de anticuerpos anti-PD-1 con anticuerpos anti-

PD-L1, anticuerpos anti-PD-L2, también puede producir un aumento en la estimulación mayor que el observado con cualquiera de los anticuerpos solos.

Ejemplo 6: Inhibición de la ruta de PD-1 en ratones crónicamente infectados

5 Ratones infectados con diversas cepas del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) se usaron para estudiar el efecto de infección vírica crónica sobre la función de linfocitos T CD8. La cepa Armstrong de LCMV causa una infección aguda que se elimina al cabo de 8 días, dejando atrás una población de larga vida de linfocitos T CD8 de memoria en reposo, muy funcionales. Por otro lado, la cepa CI-13 de LCMV, establece una infección persistente en el hospedador, caracterizada por una viremia de hasta tres meses.

15 Para confirmar que el bloqueo de la señalización de PD-1 restablece la función de linfocitos T y potencia el control vírico durante infección LCMV crónica, la señalización de PD-1 se interrumpe durante infección LCMV crónica usando anticuerpos anti-PD-1, anticuerpos anti-PD-L1 y/o anticuerpos anti-PD-L2 humanos compuestos de la invención. Los anticuerpos se administran cada tres días a ratones infectados con CI-13 de LCMV del día 23 al día 37 post-infección. Se esperaba que el día 37 hubiera varios aumentos más de linfocitos T CD8 específicos de LCMV en ratones tratados con respecto a los controles no tratados. También se esperaba que la inducción de la proliferación fuese específica contra linfocitos T CD8 dado y el número de linfocitos T CD4 en el bazo probablemente será el mismo en ambos ratones tratados y no tratados.

20 Además de un aumento en la proliferación de linfocitos T CD8, se esperaba que la inhibición de la señalización de PD-1 también produjese una producción aumentada de citocinas antivíricas en linfocitos T CD8 específicos de virus. La producción de IFN-gamma y TNF-alfa por linfocitos T CD8 sería posiblemente de varias veces más en ratones tratados en comparación con los no tratados. La eliminación vírica también debe acelerarse, y títulos virales reducidos deben observarse en pulmón y riñón el día 37 post-infección en ratones tratados, aunque probablemente los ratones no tratados presentasen niveles significativos de virus en todos estos tejidos.

30 Los linfocitos T CD4 desempeñan una función principal en la generación y mantenimiento de respuestas de linfocitos T CD8. En este sentido, los linfocitos T CD8 sensibilizados en ausencia de linfocitos T CD4 no pueden crear respuestas inmunitarias normales, y por tanto a menudo reciben el nombre de "linfocitos T indefensos". Adicionalmente, la infección crónica de LCMV-CI-13 es más grave en ausencia de linfocitos T CD4. Por consiguiente, los linfocitos T indefensos, generados durante infección LCMV-CI-13, presentan una disfunción funcional incluso más profunda que los linfocitos T generados en presencia de linfocitos TCD4.

35 Los linfocitos T CD4 se agotan en el momento de infección LCMV-CI-13 y los ratones se tratan con anticuerpos anti-PD-1, anticuerpos anti-PD-L1 y/o anticuerpos anti-PD-L2 humanos compuestos de la presente invención desde el día 46 al día 60 post-infección. Se espera que después de un tratamiento, los ratones tratados tengan varias veces más linfocitos T CD8 específicos de LCMV en su bazo que los ratones de control no tratados. Este aumento en los linfocitos T CD8 específicos de virus en los ratones tratados posiblemente produzca un aumento en la proliferación, detectado por incorporación de BrdU. El análisis de BrdU se realiza introduciendo BrdU 1 mg/ml en el agua potable durante el tratamiento y la tinción se realiza de acuerdo con el protocolo del fabricante (BD Biosciences, San Diego, Calif.).

45 Para confirmar que la inhibición de las señales PD-1 aumenta la actividad lítica de linfocitos T CD8 específicos de virus, agotados indefensos, la actividad lítica ex vivo de linfocitos T CD8 específicos de virus se detecta después del tratamiento usando un ensayo de liberación de ⁵¹Cr (Wherry *et al.*, 2003. J. Virol. 77:4911-27). Se espera que los títulos virales se reduzcan varias veces en el bazo, hígado, pulmón y suero después de dos semanas de tratamiento con respecto a los ratones no tratados.

50 **Ejemplo 7:** Administración de una vacuna con un inhibidor de señalización de PD-1.

Una estrategia para reforzar las respuestas de linfocitos T durante una infección persistente es la vacunación terapéutica. La lógica de esta estrategia es que los antígenos endógenos pueden no estar presentes en una manera óptima o inmunogénica durante la infección vírica crónica y que el suministro de antígenos en forma de una vacuna puede proporcionar un estímulo más eficaz para los linfocitos T y B específicos de virus. Usando el modelo de LCMV crónico, a los ratones se les administró un virus vaccinia recombinante que expresaba el epitopo GP33 de LCMV como una vacuna terapéutica (VVG33), que produce una potenciación modesta de respuestas de linfocitos T CD8 en algunos ratones crónicamente infectados. Esta vacunación terapéutica se combina con los anticuerpos anti-PD-1, anticuerpos anti-PD-L1 y anticuerpos y/o anticuerpos anti-PD-L2 humanos compuestos de la invención. Se espera que las respuestas de linfocitos T específicas de LCMV se refuercen a un mayor nivel en comparación con cualquier tratamiento en solitario y que el efecto del tratamiento combinado sea probablemente mucho más que aditivo.

Ejemplo 8: Chimpancés como modelo de inmunoterapia de infección HCV persistente.

65 Los chimpancés proporcionan un modelo de persistencia HCV en seres humanos. Los defectos en la inmunidad de linfocitos T que conducen a persistencia de virus prolongada incluyendo tanto un déficit en linfocitos T auxiliares CD4

específicos de HCV como actividad de linfocitos T efectores CD8 defectuosos o alterados. Los chimpancés persistentemente infectados se tratan con anticuerpos anti-PD-1, anticuerpos anti-PD-L1 y/o anticuerpos anti-PD-L2 humanos, compuestos, de la invención. Se determinó la eficacia del bloqueo de las rutas inhibitoras, combinada con la vacunación usando proteínas HCV recombinantes estructurales y no estructurales, y si dichas estrategias pueden

5 potenciar la frecuencia y longevidad de linfocitos T de memoria específicos de virus. El defecto en la inmunidad de linfocitos T es exclusivamente específico de HCV en seres humanos y chimpancés persistentemente infectados. La actividad antiviral puede después restablecerse suministrando a los chimpancés anticuerpos monoclonales humanizados que bloquean la señalización a través de estas moléculas.

10 Los chimpancés persistentemente infectados se trataron con anticuerpos anti-PD-1, anticuerpos anti-PD-L1 y/o anticuerpos anti-PD-L2 humanos, compuestos de la invención. Después del tratamiento con los anticuerpos, se determinaron las respuestas inmunitarias humoral y celular, así como la carga de ARN del ACV. Se recogieron muestras las semanas 1, 2, 3, 5 y 8, y después a intervalos mensuales. Las muestras incluyen: 1) suero para análisis de transaminasas, autoanticuerpos, anticuerpos neutralizantes contra HCV, y respuestas de citocina, 2)

15 plasma para carga viral y evolución del genoma, 3) PBMC para medidas in vitro de inmunidad, expresión y función del receptor coestimulador/inhibidor, 4) hígado reciente (no fijado) para aislamiento de linfocitos intrahepáticos y ARN, y 5) hígado fijado (incluido en formalina/parafina) para análisis histológicos e inmunohistoquímicos. También se recogerán ganglios linfáticos regionales en 2 o 3 momentos para evaluar la expresión de moléculas co-inhibidoras y variantes de corte y empalme mediante técnicas de inmunohistoquímica y molecular.

20 Para determinar si una vacunación con antígenos HCV potencia el efecto terapéutico de los anticuerpos, los chimpancés se trataron de la siguiente manera: 1) inmunización intramuscular con glucoproteínas de envoltura recombinante E1 y E2 (en adyuvante MF59) y otras proteínas (núcleo más NS 3, 4, y 5 formuladas con ISCOMS) las semanas 0, 4 y 24; 2) inmunización intramuscular con la vacuna usada en, aunque co-administrada con los

25 anticuerpos anti-PD-1, anticuerpos anti-PD-L1 y/o anticuerpos anti-PD-L2 humanos, compuestos de los anticuerpos de la invención. Las respuestas de linfocitos B y T específicas de HCV se monitorizaron a intervalos mensuales después de la inmunización durante un periodo de un año.

30 Los marcadores examinados en linfocitos T totales y positivos al tetrámero HCV en este análisis incluían marcadores de diferenciación (por ejemplo, CD45RA/RO, CD62L, CCR7 y CD27), activación (por ejemplo, CD25, CD69, CD38 y HLA-DR), supervivencia/proliferación (por ejemplo, bcl-2 y Ki67), potencial citotóxico (por ejemplo, granzimas y perforina) y receptores de citocina (CD122 y CD127). Existe una interesante correlación entre niveles pre-terapia de la quimiocina IP-10 y respuesta contra PEG IFN-gamma/rivabirina. Se midieron los niveles de IP-10 para investigar una posible correlación entre rutas reguladoras negativas o respuestas de linfocitos T específicas de HCV y niveles

35 de IP-10. La expresión en receptores y ligandos en PBMC se realizó mediante citometría de flujo.

Ejemplo 9: Potenciación de inmunidad específica de SIV *in vivo* mediante bloqueo de PD-1

40 El potencial de restablecimiento inmunitario del bloqueo de PD-1 durante la infección por virus de la inmunodeficiencia de simio (SIV) crónica se ensayó en macacos. Se estudiaron catorce macacos rhesus de la India (*Macaca mulatta*) infectados con SIV. Se usaron ocho macacos para la fase temprana crónica y se infectaron por vía intravenosa con una dosis infecciosa de cultivo tisular al 50 % de 200 (DICT₅₀) de SIV251. Se usaron seis macacos para la fase crónica tardía, tres se infectaron con SIV 251 por vía intrarrectal y tres se infectaron con SIV239 por vía intravenosa. Todos los macacos, excepto RDb11, fueron negativos para los alelos Mamu B08 y Mamu B17. RDb11 fue positivo para el alelo Mamu B17.

50 Tratamiento con anticuerpos *in vivo*: los macacos se infundieron con el anticuerpo anti PD-1 humano de ratón parcialmente humanizado (clon EH12-1540) (Dorfman *et al.*, Am. J. Surg. Pathol. 30:802-810, 2006) o un anticuerpo de control (SYNAGIS). El anticuerpo anti PD-1 tiene un dominio de cadena pesada variable de ratón ligado a IgG1 humana (mutado para reducir la unión del FcR y complemento) y un dominio de cadena variable de ratón ligado a κ humana. El clon EH12 se une a PD-1 de macaco y bloquea interacciones entre PD-1 y sus ligandos *in vitro*. SYNAGIS es un anticuerpo monoclonal de ratón humanizado (IgG1κ) específico contra la proteína F del virus respiratorio sincitial. Se administraron anticuerpos por vía intravenosa a 3 mg kg⁻¹ de peso corporal los días 0, 3, 7 y 10.

55 Respuestas inmunitarias: se aislaron células mononucleares de sangre periférica de sangre y linfocitos de biopsias de función rectal como se ha descrito anteriormente (Velu *et al.*, J. Virol. 81:5819-5828, 2007). La tinción de tetrámeros, producción de citocina intracelular y mediciones de anticuerpo de unión a la Env anti-SIV se realizaron como se ha descrito anteriormente (Amara *et al.*, Science 292:69-74, 2001; Kannanganat *et al.*, J. Virol. 81:8468-8476, 2007; Lai *et al.*, Virology 369:153-167, 2007).

60 El bloqueo de PD-1 se realizó durante la fase temprana (10 semanas) así como la tardía (aproximadamente 90 semanas) de infección SIV crónica. Nueve macacos (cinco durante la fase temprana y cuatro durante la fase tardía) recibieron el anticuerpo anti-PD-1 y cinco macacos (tres durante la fase temprana y dos durante la fase tardía) recibieron un anticuerpo de control isotipo (SYNAGIS, específico contra el virus respiratorio sincitial (RSV)).

El bloqueo de PD-1 durante infección SIV crónica produjo una expansión rápida de linfocitos T CD8 específicos de SIV en la sangre de todos los macacos. Las respuestas de linfocitos T CD8 contra dos epítomos inmunodominantes, Gag CM9 (Allen *et al.*, J. Immunol. 160:6062-6071, 1998) y Tat SL8/TL8 (Allen *et al.*, Nature 407:386-390, 2000), se estudiaron usando complejos tetraméricos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) I en siete de los macacos tratados con anticuerpo anti-PD-1 y tres de los macacos tratados con anticuerpo de control que expresaban la molécula de histocompatibilidad Mamu A*01. La mayoría de los linfocitos T CD8 específicos de tetrámero Gag-CM9 (>98 %) expresaron PD-1 antes del bloqueo. Después del bloqueo de PD-1, los linfocitos T CD8 específicos de tetrámero Gag-CM9 se expandieron rápidamente y alcanzaron un pico al cabo de 7-21 días. En la respuesta pico, estos niveles fueron de aproximadamente 2,5 a 11 veces mayores que sus niveles respectivos el día 0 (P = 0,007) y permanecieron elevados hasta los días 28-45. Se observaron resultados similares con bloqueo durante las fases temprana, así como tardía de infección por SIV crónica. También se observó un aumento de 3-4 veces en la frecuencia de linfocitos T CD8 positivos a interferón (IFN)- γ y específicos de Gag el día 14 después del bloqueo en dos animales negativos a Mamu A*01 (RTd11 y RDb11), demostrando que el bloqueo de PD-1 puede potenciar la frecuencia de linfocitos T CD8 específicos de virus que están restringidos por alelos no Mamu A*01. La expansión de linfocitos T CD8 específicos de SIV no se observó en macacos tratados con anticuerpo de control.

El bloqueo de PD-1 también se asoció con un aumento significativo en la frecuencia de linfocitos T CD8 específicos de virus que se sometieron a división celular activa *in vivo* con calidad funcional mejorada. Coherente con la rápida expansión de linfocitos T CD8 específicos de SIV, la frecuencia de los linfocitos CD8 específicos de tetrámero Gag-CM9 que coexpresaban Ki67 (marcador para células proliferativas) también aumentó tan pronto como el día 7 después del bloqueo (P= 0,01). De manera similar, se observó un aumento en las frecuencias de linfocitos T CD8 específicos de tetrámero Gag-CM9 que coexpresan perforina y granzima B (potencial citolítico; P= 0,001 y P= 0,03, respectivamente), CD28 (potencial de coestimulación; P= 0,001), CD127 (potencial proliferativo; P = 0,0003) y CCR7 (potencial buscador de ganglios linfáticos; 0,001). Se observó un aumento transitorio de 1,5 a 2 veces en la frecuencia de linfocitos T CD8 negativos a tetrámero y positivos a Ki67 después del bloqueo. Esto podía deberse a la expansión de linfocitos T CD8 específicos contra otros epítomos en Gag, así como contra otras proteínas de SIV y otras infecciones víricas crónicas en estos animales. No se observó potenciación significativa para estos marcadores en los tres macacos tratados con anticuerpo de control.

No se observó expansión para los linfocitos T CD8 específicos de Tat-TL8 después del bloqueo. Esto podía deberse al escape viral del reconocimiento por linfocitos T CD8 específicos de Tat-TL8, ya que se sabe que el bloqueo de PD-1 produce expansión de linfocitos T solo cuando reciben simultáneamente señales a través del receptor de linfocitos T. Para ensayar esta posibilidad, los genomas virales presentes en el plasma justo antes del inicio del bloqueo de los tres macacos positivos a Mamu A*01 que se infectaron con SIV 251 y recibieron el anticuerpo bloqueante durante la fase de infección temprana se secuenciaron. De hecho, se encontraron mutaciones en el genoma viral correspondiente a la región del epítipo Tat TL8. Todas estas mutaciones se había observado o predicho que reducían la unión del péptido Tat SL8/TL8 a la molécula MHC Mamu A*01 y producen un escape del reconocimiento por los linfocitos T CD8 específicos de Tat-SL8/TL8. Estos resultados sugieren que el bloqueo *in vivo* de PD-1 puede no dar como resultado la expansión de linfocitos T que son específicos para mutantes de escape de epítomos virales.

El bloqueo de PD-1 también da como resultado la expansión de linfocitos T CD8 específicos de Gag-CM9 en el tejido mucoso colorrectal (intestino), un sitio preferencial de replicación del SIV/HIV. No se observó expansión en dos de los siete macacos, aunque la expansión fue obvia para uno de ellos en sangre. A diferencia de la sangre, el intestino aumentó mucho más tarde el día 42 y varió de 2 a 3 veces en comparación con sus niveles en el día 0 respectivo (P= 0,003). Similar a la sangre, las células específicas de tetrámero Gag-CM9 que coexpresaban Ki67 (P = 0,01), perforina (P = 0,03), granzima B (P = 0,01) y CD28 (P = 0,01) también aumentaron en el intestino después del bloqueo.

Lo que es más importante, el bloqueo de PD-1 también potenció la calidad funcional de los linfocitos T CD8 antivirales y dio como resultado la generación de células polifuncionales capaces de producir conjuntamente las citocinas IFN- γ , factor de necrosis tumoral (TNF)- α e interleucina (IL-2). El día del inicio del bloqueo de PD-1 durante la fase crónica tardía de infección, la frecuencia de células positivas a IFN- γ específicas de Gag también fue baja y no consiguieron coexpresar TNF- α e IL-2. Sin embargo, después del bloqueo, la frecuencia de células positivas a IFN- γ aumentó en los cuatro macacos tratados con anticuerpo PD-1 (P= 0,03) y adquirieron la capacidad de coexpresar TNF- α e IL-2. La expansión de células positivas a IFN- γ aumentó a los 14-21 días y los niveles máximos fueron de 2-10 veces mayores que los niveles de día 0 respectivos. El día 21, aproximadamente el 16 % de las células específicas de Gag totales coexpresaron las 3 citocinas, y aproximadamente el 30 % coexpresó IFN- γ y TNF- α . Esto difiere de <1 % de las células específicas de Gag totales que coexpresan las tres citocinas (P= 0,01) y aproximadamente 14 % que coexpresan IFN- γ y TNF- α el día 0 (P= 0,04). También se observaron resultados similares después del bloqueo durante la fase de infección crónica temprana.

Para ensayar la función de PD-1 en la regulación de la función de linfocitos B durante infecciones por el virus de la inmunodeficiencia crónica, se caracterizaron las respuestas de linfocitos B después del bloqueo de PD-1 en macacos infectados por SIV. Análisis de expresión de PD-1 en subconjuntos de linfocitos B diferentes antes del bloqueo con PD-1 revelaron expresión preferencial de PD-1 por linfocitos B de memoria (CD20⁺CD27⁺CD21⁻) en

comparación con linfocitos B sin tratar (CD20⁺CD27⁺CD21⁺; $P < 0,001$). El bloqueo *in vivo* de PD-1 produjo un aumento de 2 a 8 veces en el título de anticuerpos de unión específicos a SIV el día 28 después del bloqueo ($P < 0,001$). Para entender esto adicionalmente, se realizaron experimentos contra la proliferación de linfocitos B de memoria en macacos infectados por SIV que se trataron simultáneamente con anticuerpo anti-PD-1 y terapia antirretroviral y se observó un aumento significativo en la memoria Ki67⁺ (proliferación), pero no linfocitos B sin tratar tan pronto como el día 3. Estos resultados demuestran que la ruta PD-1-PDL podría tener una función en la regulación de la alteración de linfocitos B durante infección del SIV crónica.

Los ensayos de neutralización revelaron un aumento de dos veces en títulos contra el SIV 251 adaptado al laboratorio fácilmente neutralizable y ningún aumento en los títulos contra el SIV 251 o SIV 239 de tipo silvestre difícil de neutralizar. En dos de los nueve animales tratados con anticuerpo anti-PD-1, solo una expansión mínima (<2 veces) de anticuerpo específico de SIV después del bloqueo. Notablemente, la frecuencia de linfocitos B de memoria totales en estos dos animales fue inferior (-40 % de linfocitos B totales) en comparación con los siete animales restantes (60-90 % de linfocitos B totales) antes del bloqueo, indicando que el nivel de linfocitos B de memoria específicos de SIV antes del bloqueo puede determinar el nivel de expansión de anticuerpos específicos de SIV después del bloqueo.

El bloqueo de PD-1 produce reducciones significativas en viremia en plasma ($P = 0,03$) y también prolonga la supervivencia de los macacos infectados por SW ($P = 0,001$). En dos de los cinco macacos tratados con anticuerpo anti-PD-1 durante la fase crónica temprana, la carga viral disminuyó el día 10 y persistió a o por debajo de este nivel hasta el día 90. En un macaco la carga viral disminuyó transitoriamente y en los otros dos macacos aumentó transitoriamente y volvió a niveles previos al bloqueo. A diferencia de la fase crónica temprana, los cuatro macacos tratados con el anticuerpo anti-PD-1 durante la fase crónica tardía mostraron un aumento transitorio en la viremia el día 7, pero rápidamente redujo la carga del virus el día 21 a niveles que estaban por debajo de sus niveles respectivos el día 0. Sin embargo, los niveles de ARN virales volvieron a niveles previos al bloqueo el día 43. Como se esperaba, no se observaron reducciones significativas en las cargas virales del plasma en ninguno de los 5 macacos tratados con el anticuerpo de control. A los 21-28 días después del bloqueo, los niveles de ARN virales en los animales tratados con anticuerpo anti-PD-1 eran de 2-10 veces menores que sus niveles el día 0 respectivos ($P = 0,03$). El día 150 después del bloqueo, 4 de los 5 macacos en el grupo de control murieron debido a síntomas relacionados con SIDA (por ejemplo, pérdida de apetito, diarrea, pérdida de peso), mientras que los 9 animales en el grupo tratado con anticuerpo anti-PD-1 sobrevivieron ($P = 0,001$).

El aumento inicial observado en los niveles de viremia en plasma en todos los animales tratados en fase tardía y algunos de la fase temprana podía deberse a un aumento en la frecuencia de linfocitos T CD4 activados. Para determinar esto, se midió el porcentaje de linfocitos T CD4 totales positivos a Ki67, así como la frecuencia de linfocitos T CD4 productores de IFN- γ y específicos de Gag del SIV (dianas preferenciales para la replicación del virus) después del bloqueo. Estos análisis revelaron un aumento transitorio en el porcentaje de linfocitos T CD4 positivos a Ki67 los días 7-14 después del bloqueo ($P = 0,002$) y este aumento fue mayor en animales tratados durante la fase tardía que en la fase de infección temprana ($P = 0,015$). De manera similar también se observó un aumento en la frecuencia de linfocitos T CD4 específicos de Gag, pero solo en los animales tratados durante la fase de infección tardía. No se observaron aumentos significativos para estos linfocitos T CD4 activados en los macacos tratados con anticuerpo control. Estos resultados sugieren que los linfocitos T CD4 activados podrían haber contribuido al aumento inicial observado en los niveles de viremia en plasma después del bloqueo.

Después del inicio del bloqueo de PD-1, el punto de referencia de la carga viral en plasma y linfocitos T CD4 totales en sangre e intestino era similar entre los grupos tratados con anticuerpo de control y tratados con anticuerpo anti-PD-1. Sin embargo, las frecuencias de células CM9⁺ Gag y células CM9⁺ Gag que coexpresaban perforina, granzima B o CD28 no eran similares entre los dos grupos de tratamiento antes del bloqueo *in vivo*. Esto aumenta la posibilidad de que estas diferencias puedan haber contribuido a la expansión de células CM9⁺ Gag después del bloqueo de PD-1. Para estudiar la influencia de la frecuencia de células CM9⁺ Gag antes del bloqueo sobre su expansión después del bloqueo, el grupo tratado con anticuerpos anti-PD-1 se dividió en dos subgrupos en función de la frecuencia de células CM9⁺ Gag antes del inicio del bloqueo de tal manera que un grupo tenía niveles similares y el otro grupo tenía niveles más altos de células CM9⁺ Gag en comparación con el grupo tratado con anticuerpo de control. Estos subgrupos se analizaron después con respecto a la expansión de células CM9⁺ Gag después del bloqueo. La expansión de células CM9⁺ Gag fue evidente en ambos subgrupos de animales después del bloqueo de PD-1, independientemente de si tenían niveles bajos o altos antes del bloqueo. También se observaron resultados similares con análisis del subgrupo basándose en la frecuencia de células CM9⁺ Gag que coexpresaban moléculas asociadas con una mejor función de linfocitos T tales como perforina, granzima B, CCR7, CD127 o CD28. Sin embargo, se observó una tendencia hacia una mejor expansión de linfocitos CM9⁺ CD28⁺ Gag en animales con niveles más altos de células CM9⁺ CD28⁺ Gag antes del bloqueo, lo que sugería que la expresión de CD28 puede servir como un biomarcador para predecir el resultado del bloqueo de PD-1 *in vivo*.

Los experimentos descritos anteriormente demuestran que el bloqueo de PD-1 usando un anticuerpo contra PD-1 produce una rápida expansión de linfocitos T CD8 específicos de virus con calidad funcional mejorada. Esta inmunidad de linfocitos T potenciada se observó en la sangre y también en el intestino, un depósito principal de infección SIV. El bloqueo de PD-1 también produjo la proliferación de linfocitos B de memoria y aumentos en el

anticuerpo específico de envoltura SIV. Estas respuestas inmunitarias mejoradas se asociaron con reducciones significativas en la carga viral plasmática y también prolongaron la supervivencia de macacos infectados por SIV. El bloqueo fue eficaz durante la fase temprana (semana 10) así como la fase tardía (aproximadamente semana 90) de infección crónica incluso en condiciones de linfopenia grave. Estos resultados demuestran potenciación de las respuestas inmunitarias tanto celulares como humorales durante una infección por el virus de la inmunodeficiencia patógeno bloqueando una sola ruta inhibidora e identifican una nueva estrategia terapéutica para el control de infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana.

Ejemplo 10: proliferación potenciada de linfocitos T CD8 específicos de SIV después del bloqueo *in vitro* de la ruta PD-1: PDL por un anticuerpo PD-1 humanizado y un anticuerpo PD-L1 humanizado.

El efecto de un anticuerpo anti-PD-1 humanizado procedente de EH-12.2H7 y un anticuerpo anti-PD-L1 humanizado procedente de 29E.2A3 sobre la capacidad proliferativa de linfocitos T CD8 específicos de Gag del SIV se ensayó *in vitro*. El anticuerpo anti-PD-1 humanizado tiene la secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 28, y la secuencia de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 32. El anticuerpo anti-PD-L1 humanizado tiene la secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 35 y la secuencia de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 42. La región constante de cadena pesada de los anticuerpos humanizados es de IgG4 humana con mutación de Ser 228 a Pro (de CPSCP a CPPCP) de tal manera que el anticuerpo forma dímeros, y la región constante de cadena ligera es la región constante de cadena ligera kappa humana. La numeración de aminoácidos para Ser 228 es de acuerdo con el sistema de numeración EU. Véase Aalberse *et al.*, Immunology 105:9-19, 2002. Las PBMC obtenidas de macacos infectados por SIV (entre 3 meses a 1,5 años después de infección) se tiñeron con éster de carboxifluoresceín diacetato succinimidilo (CFSE) y se estimularon con un conjunto de péptidos Gag SIV o medio de cultivo durante 6 días en presencia o en ausencia de un anticuerpo bloqueante. Al final de la estimulación, las células se tiñeron para CD3 y CD8 de superficie y Ki-67 intracelular. Después las células se adquirieron en un Calibur FACS y se analizaron usando un programa informático FlowJo. Los linfocitos se identificaron basándose en la dispersión, después se analizaron linfocitos T CD8 (CD3+, CD8+) para la cotinción por Ki-67 y CFSE. Las células con niveles bajos de CFSE, Ki-67+, se identificaron como células proliferativas.

Como se muestra en la Figura 14A, el bloqueo *in vitro* de la ruta ligando PD-1: PD-1 usando los Ab anti-PD-1 produce un aumento significativo en la proliferación de respuestas de linfocitos T CD8 específicas de SIV. El bloqueo *in vitro* usando el Ab anti-PD-L1 produce un aumento moderado en la proliferación de respuestas de linfocitos T CD8 específicos de SIV (Figura 14B).

Ejemplo 11: Restauración de proliferación de linfocitos T específicos de HCV mediante células mononucleares intrahepáticas de un chimpancé persistentemente infectado.

Se aislaron linfocitos intrahepáticos marcados con CFSE (2×10^6) del chimpancé 1564 que se había infectado crónicamente con la cepa H77 de genotipo 1a del HCV durante más de 10 años. Los linfocitos intrahepáticos se co-cultivaron durante 6 días con 4×10^6 PBMC con CD8 agotado, autólogas irradiadas que no se manipularon o se impulsaron con péptidos solapantes que abarcan toda la poliproteína del HCV (cepa H77 de genotipo 1a). Las células se cultivaron en medio RPMI complementado con L-glutamina y FCS al 10 %, con y sin un anticuerpo bloqueante anti-PD-L1 (10 μ g/ml, añadido el día 0 y día 2). El anticuerpo anti-PD-L1 humanizado tiene la secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 35 y la secuencia de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 42. La región constante de cadena pesada de los anticuerpos humanizados es de IgG4 humana con mutación de Ser 2228 a Pro (de CPSCP a CPPCP) de manera que el anticuerpo forma dímeros y la región constante de cadena ligera es la región constante de cadena ligera kappa humana. La numeración de aminoácidos para Ser 228 es de acuerdo con el sistema de enumeración EU. Véase Aalberse *et al.*, Immunology 105:9-19, 2002. El día 6, las células se tiñeron con CD8-PerCP, tetrámero A0701/P7(758)-PE, PD-1-Alexa 647, CD4-Alexa 700, CD14-Alexa 700, CD16-Alexa 700, CD19-Alexa 700 y colorante azul Live/Dead. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo BD LSR II y los datos se analizaron usando un el programa informático FlowJo.

Como se muestra en la Figura 15, el tratamiento con el anticuerpo anti-PD-L1 reestableció la proliferación de linfocitos T específicos de HCV mediante células mononucleares intrahepáticas de un chimpancé persistentemente infectado.

REIVINDICACIONES

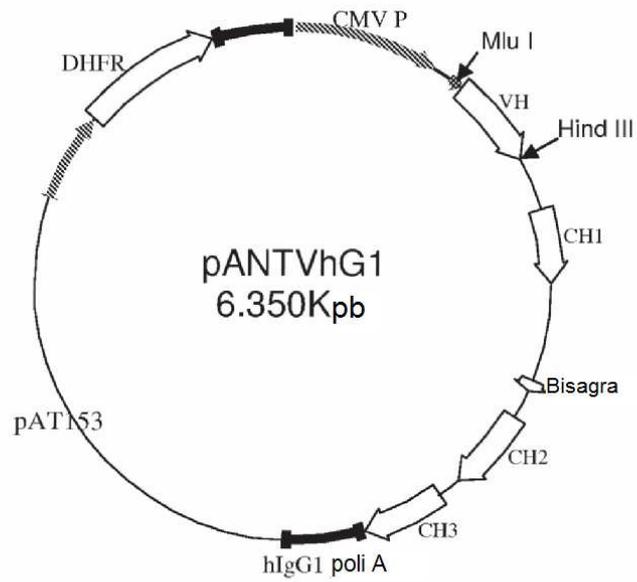
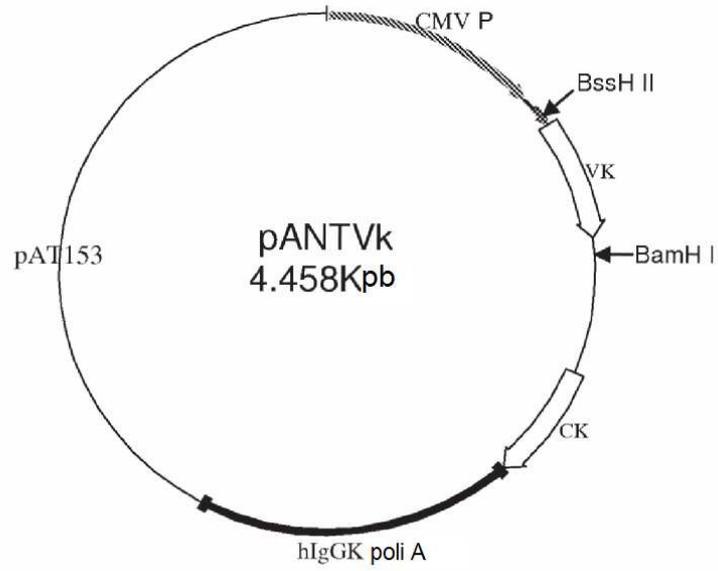
1. Un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:
 - 5 a) una secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 34-38; y
 - b) una secuencia de región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 39-42,
 - 10 en donde el anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a una proteína PD-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, y el anticuerpo aislado, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, está humanizado o es compuesto.
 - 15 2. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo aislado comprende:
 - a) una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende las SEQ ID NO: 35 o 37; y
 - b) una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende las SEQ ID NO: 39, 40 o 42.
 - 20 3. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno del mismo inhiben la unión del anticuerpo 29E2A3 a Fc-PD-L1, en donde el anticuerpo 29E2A3 comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 78, y una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 79.
 - 25 4. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno del mismo inhiben una señal mediada por PD-L1.
 - 30 5. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
 6. Un vector que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 5.
 7. Una célula hospedadora que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
 - 35 8. La célula hospedadora de la reivindicación 7 que produce el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno codificado por el ácido nucleico.
 9. Un animal no humano transgénico que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
 - 40 10. Una composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
 - 45 11. Un método de reactivación de linfocitos T agotados, que comprende:

poner en contacto una población de células en la que al menos algunas células expresan PD-L1, con una cantidad eficaz de una composición que comprende un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4,

 - 50 en donde la etapa de la puesta en contacto se realiza *in vitro* o *ex vivo*.
12. Un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para su uso en:
 - 55 (1) un método de tratamiento de un sujeto que padece una infección persistente; o
 - (2) un método de tratamiento de un sujeto que padece una infección viral, en donde la infección viral se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus del herpes, virus de la inmunodeficiencia humana, virus linfotrópico T humano, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus respiratorio sincitial y/o rinovirus; o
 - 60 (3) un método de tratamiento de un sujeto que padece una infección bacteriana, en donde la infección bacteriana se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en *Helicobacter*, *Mycobacterium*, *Porphyromonas* y *Chlamydia*; o
 - (4) un método de tratamiento de un sujeto que padece una infección helmíntica, en donde el helminto se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en *Schistosoma* y *Taenia*; o
 - 65 (5) un método de tratamiento de un sujeto que padece una infección protozoaria, en donde la infección protozoaria se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en *Leishmania mexicana* y *Plasmodium*; o

- 5 (6) un método de tratamiento de un sujeto que padece cáncer, en donde el cáncer se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en un tumor sólido, un cáncer hematológico, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer gástrico, glioma, cáncer de cabeza, leucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfoma, mieloma, cáncer de cuello, cáncer de ovario, melanoma, cáncer pancreático, cáncer renal, cáncer salival, cáncer de estómago, cáncer del epitelio tímico y cáncer tiroideo; o
- (7) un método de tratamiento de un sujeto que padece un cáncer que sobreexpresa PD-L1.
- 10 13. El anticuerpo para su uso de la reivindicación 12, parte (7), que induce citotoxicidad mediada por anticuerpos.
- 10 14. El anticuerpo para su uso de la reivindicación 13, que está modificado para aumentar la citotoxicidad inducida por anticuerpo.
- 15 15. El anticuerpo para su uso de la reivindicación 14, que está conjugado a un agente seleccionado del grupo que consiste en una toxina y un agente formador de imágenes.
- 15 16. Un método de producción del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende cultivar una célula que produce el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno y recuperar del cultivo celular el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno.

Figura 1. Diagramas de vectores de expresión.



ES 2 592 216 T3

Figura 2. Variantes de secuencias de anticuerpos humanos, compuestos, de cadenas pesadas anti-PD-1 (Figura 2A) Cadena pesada VH1

```

      10      20      30      40      50
CAGGTC CAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAACTGAAACAGCCTGGGGCCTC
  Q V Q L V Q S G A E L K Q P G A S

      60      70      80      90     100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGTTTTACTAGCTCCTGGA
  V K M S C K A S G Y S F T S S W
                               CDR1

     110     120     130     140     150
TACACTGGGTGAAACAGGCTCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
I H W V K Q A P G Q G L E W I G Y

     160     170     180     190     200
ATTTATCCTAGCACTGGTTTTACTGAGTACAATCAGAAGTTCAAGGACAG
I Y P S T G F T E Y N Q K F K D R
                               CDR2

     210     220     230     240     250
GGCCACATTGACTGCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAAGTGA
  A T L T A D K S T S T A Y M E L

     260     270     280     290     300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATGGAGG
  S S L R S E D S A V Y Y C A R W R

     310     320     330     340     350
GACAGCTCGGGCTACCATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGT
D S S G Y H A M D Y W G Q G T S V
                               CDR3

     360
CACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:1)
  T V S S (SEQ ID NO:25)
```

ES 2 592 216 T3

(Figura 2B) Cadena pesada VH2

10 20 30 40 50
CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAAACAGCCTGGGGCCTC
Q V Q L V Q S G A E V K Q P G A S

60 70 80 90 100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGTTTTACTAGCTCCTGGA
V K M S C K A S G Y S F T S S W
CDR1

110 120 130 140 150
TACACTGGGTGAAACAGGCTCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
I H W V K Q A P G Q G L E W I G Y

160 170 180 190 200
ATTTATCCTAGCACTGGTTTTACTGAGTACAATCAGAAGTTCAAGGACAG
I Y P S T G F T E Y N Q K F K D R
CDR2

210 220 230 240 250
GGCCACATTGACTGCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAAGTGA
A T L T A D K S T S T A Y M E L

260 270 280 290 300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATGGAGG
S S L R S E D T A V Y Y C A R W R

310 320 330 340 350
GACAGCTCGGGCTACCATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGT
D S S G Y H A M D Y W G Q G T S V
CDR3

360
CACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:3)
T V S S (SEQ ID NO:26)

ES 2 592 216 T3

(Figura 2C) Cadena pesada VH3

10 20 30 40 50
CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAAACAGCCTGGGGCCTC
Q V Q L V Q S G H E V K Q P G A S

60 70 80 90 100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGTTTTACTAGCTCCTGGA
V K M S C K A S G Y S F T S S W
CDR1

110 120 130 140 150
TACACTGGGTGAAACAGGCTCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
I H W V K Q A P G Q G L E W I G Y

160 170 180 190 200
ATTTATCCTAGCACTGGTTTTACTGAGTACAATCAGAAGTTCAAGGACAG
I Y P S T G F T E Y N Q K F K D R
CDR2

210 220 230 240 250
GGCCACATTGACTGCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAAGTGA
A T L T A D K S T S T A Y M E L

260 270 280 290 300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATGGAGG
S S L R S E D T A V Y Y C A R W R

310 320 330 340 350
GACAGCTCGGGCTACCATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGT
D S S G Y H A M D Y W G Q G T L V
CDR3

360
CACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:5)
T V S S (SEQ ID NO:27)

ES 2 592 216 T3

(Figura 2D) Cadena pesada VH4

10 20 30 40 50
CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGCATGAAGTGAAACAGCCTGGGGCCTC
Q V Q L V Q S G H E V K Q P G A S

60 70 80 90 100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGTTTTACTAGCTCCTGGA
V K M S C K A S G Y S F T S S W
CDR1

110 120 130 140 150
TACTGTTGGGTGAGACAGGCTCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
I H W V R Q A P G Q G L E W I G Y

160 170 180 190 200
ATTTATCCTAGCACTGGTTTTACTGAGTACAATCAGAAGTTCAAGGACAG
I Y P S T G F T E Y N Q K F K D R
CDR2

210 220 230 240 250
GGCCACATTGACTGCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAAGTGA
A T L T A D K S T S T A Y M E L

260 270 280 290 300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACTGCGAGTCTATTACTGTGCAAGATGGAGG
S S L R S E D T A V Y Y C A R W R

310 320 330 340 350
GACAGCTCGGGCTACCATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGT
D S S G Y H A M D Y W G Q G T L V
CDR3

360
CACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:52)
T V S S (SEQ ID NO:28)

ES 2 592 216 T3

(Figura 2E) Cadena pesada VH5

```

          10          20          30          40          50
CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGCATGAAGTGAAACAGCCTGGGGCCTC
  Q  V  Q  L  V  Q  S  G  H  E  V  K  Q  P  G  A  S

          60          70          80          90          100
AGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGTTTTACTAGCTCCTGGA
  V  K  V  S  C  K  A  S  G  Y  S  F  T  S  S  W
                                     CDR1

          110          120          130          140          150
TACTACTGGGTGAGACAGGCTCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
I  H  W  V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

          160          170          180          190          200
ATTTATCCTAGCACTGGTTTTACTGAGTACAATCAGAAGTTCAAGGACAG
I  Y  P  S  T  G  F  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                                     CDR2

          210          220          230          240          250
GGCCACAATCACTGCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAAGTGA
  A  T  I  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

          260          270          280          290          300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATGGAGG
  S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  W  R

          310          320          330          340          350
GACAGCTCGGGCTACCATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGT
D  S  S  G  Y  H  A  M  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V
                                     CDR3

          360
CACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:53)
  T  V  S  S (SEQ ID NO:29)
```

Figura 3. Variantes de secuencias de anticuerpos humanos, compuestos, de cadenas ligeras anti-PD-1 (Figura 3A) Cadena ligera VK1

```

      10      20      30      40      50
GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAACTCTGTCTCCAGGGCA
D I V L T Q S P A S L T L S P G Q

      60      70      80      90      100
GAGGCTCACCATCTCATGCAGGGCCAGCCAAAGTGTGTCAGTACATCTGGCT
R L T I S C R A S Q S V S T S G
                CDR1

      110      120      130      140      150
ATAGTTATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGACCAGTCCCCCAAATC
Y S Y M H W Y Q Q K P D Q S P K L

      160      170      180      190      200
CTCATCAAGTTTGGCTCCAACCTAGAATCTGGCATCCCTGCCAGGTTTCAG
L I K F G S N L E S G I P A R F S
                CDR2

      210      220      230      240      250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCTTCTCTGGAGG
G S G S G T D F T L T I S S L E

      260      270      280      290      300
AGGAGGATTTTGCAACATATTACTGTCAGCACAGTTGGGAGATTCCGTAC
E E D F A T Y Y C Q H S W E I P Y
                CDR3

      310      320      330
ACGTTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO:54)
T F G Q G T K L E I K (SEQ ID NO:30)
    
```

ES 2 592 216 T3

(Figura 3B) Cadena ligera VK2

10 20 30 40 50
GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTACCTTATCTCTGTCTCCAGGGCA
D I V L T Q S P A T L S L S P G Q

60 70 80 90 100
GAGGCTCACCATCTCATGCAGGGCCAGCCAAAGTGTCAGTACATCTGGCT
R L T I S C R A S Q S V S T S G
CDR1

110 120 130 140 150
ATAGTTATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGACCAGTCCCCAAACTC
Y S Y M H W Y Q Q K P D Q S P K L

160 170 180 190 200
CTCATCAAGTTTGGCTCCAACCTAGAATCTGGCATCCCTGCCAGGTTGAG
L I K F G S N L E S G I P A R F S
CDR2

210 220 230 240 250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCTCTTCTCTGGAGC
G S G S G T D F T L T I S S L E

260 270 280 290 300
CTGAGGATTTTGCAACATATTACTGTCAGCACAGTTGGGAGATTCCGTAC
P E D F A T Y Y C Q H S W E I P Y
CDR3

310 320 330
ACGTTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGAAAATAAAA (SEQ ID NO:55)
T F G Q G T K L E I K (SEQ ID NO:31)

ES 2 592 216 T3

(Figura 3C) Cadena ligera VK3

```

      10      20      30      40      50
GAGATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTACCTTATCTCTGTCTCCAGGGCA
  E  I  V  L  T  Q  S  P  A  T  L  S  L  S  P  G  Q

      60      70      80      90     100
GAGGCTCACCATCTCATGCAGGGCCAGCCAAAGTGTTCAGTACATCTGGCT
  R  L  T  I  S  C  R  A  S  Q  S  V  S  T  S  G
                                 CDR1

      110     120     130     140     150
ATAGTTATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGACCAGTCCCCAAACTC
Y  S  Y  M  H  W  Y  Q  Q  K  P  D  Q  S  P  K  L

      160     170     180     190     200
CTCATCAAGTTTGGCTCCAACCTAGAAATCTGGCATCCCTGCCAGGTTTCAG
  L  I  K  F  G  S  N  L  E  S  G  I  P  A  R  F  S
                                 CDR2

      210     220     230     240     250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCTCTTCTCTGGAGC
  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  E

      260     270     280     290     300
CTGAGGATTTTGCACATATTACTGTCAGCACAGTTGGGAGATTCCGTAC
  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  H  S  W  E  I  P  Y
                                 CDR3

      310     320     330
ACGTTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO:56)
T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K (SEQ ID NO:32)
```

ES 2 592 216 T3

(Figura 3D) Cadena ligera VK4

10 20 30 40 50
GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTACCTTATCTCTGTCTCCAGGGCA
D I V L T Q S P A T L S L S P G Q

60 70 80 90 100
GAGGCTCACCATCTCATGCAGGGCCAGCCAAAGTGTGAGTACATCTGGCT
R L T I S C R A S Q S V S T S G
CDR1

110 120 130 140 150
ATAGTTATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGACCAGTCCCCAAACTC
Y S Y M H W Y Q Q K P D Q S P K L

160 170 180 190 200
CTCATCAAGTTTGGCTCCAACCTAGAATCTGGCATCCCTGCCAGGTTTCAG
L I K F G S N L E S G I P A R F S
CDR2

210 220 230 240 250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCTCTTCTCTGGAGC
G S G S G T D F T L T I S S L E

260 270 280 290 300
CTGAGGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCACAGTTGGGAGATTCCGTAC
P E D F A V Y Y C Q H S W E I P Y
CDR3

310 320 330
ACGTTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO:57)
T F G Q G T K L E I K (SEQ ID NO:33)

Figura 4. Variantes de secuencias de anticuerpos humanos, compuestos, de cadenas pesadas anti-PD-L1 (Figura 4A) Cadena pesada VH1

```

      10      20      30      40      50
GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAAAAGCCTGGGGCTTC
  E V Q L V Q S G P E L K K P G A S

      60      70      80      90      100
AGTGAAGATGCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGCTAGCTATGTTA
  V K M S C K A S G Y T F T S Y V
                                 CDR1

      110     120     130     140     150
TGCAC TGGGTGAAGCAGGCCCTGGGCAGCGCCTTGAGTGGATTGGATAT
M H W V K Q A P G Q R L E W I G Y

      160     170     180     190     200
GTAAATCCTTTCAATGATGGTACTAAGTACAATGAGATGTTCAAAGGCAG
  V N P F N D G T K Y N E M F K G R
                                 CDR2

      210     220     230     240     250
GGCCACACTGACTTCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCA
  A T L T S D K S T S T A Y M E L

      260     270     280     290     300
GCAGCCTGAGGTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACAGGCT
  S S L R S E D S A V Y Y C A R Q A

      310     320     330     340
TGGGGTTACCCCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCT (SEQ ID NO:58)
W G Y P W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO:34)
                                 CDR3

```

ES 2 592 216 T3

(Figura 4B) Cadena pesada VH2

```

      10      20      30      40      50
GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAAAAGCCTGGGGCTTC
  E  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S

      60      70      80      90      100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATAACACATTCAGCTAGCTATGTTA
  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  S  Y  V
                                           CDR1

      110     120     130     140     150
TGCACTGGGTGAAGCAGGCCCTGGGCAGCGCCTTGAGTGGATTGGATAT
M  H  W  V  K  Q  A  P  G  Q  R  L  E  W  I  G  Y

      160     170     180     190     200
GTTAATCCTTTCAATGATGGTACTAAGTACAATGAGATGTTCAAAGGCAG
  V  N  P  F  N  D  G  T  K  Y  N  E  M  F  K  G  R
                                           CDR2

      210     220     230     240     250
GGCCACACTGACTTCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCA
  A  T  L  T  S  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

      260     270     280     290     300
GCAGCCTGAGGTCTGAGGACACTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACAGGCT
  S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  Q  A

      310     320     330     340
TGGGGTTACCCCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCT (SEQ ID NO:59)
W  G  Y  P  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S (SEQ ID NO:35)
CDR3
```

ES 2 592 216 T3

(Figura 4C) Cadena pesada VH3

```

      10      20      30      40      50
GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAAAAGCCTGGGGCTTC
  E  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S

      60      70      80      90      100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTCTATGTTA
  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  S  Y  V
                                     CDR1

      110     120     130     140     150
TGCACTGGGTGAGGCAGGCCCTGGGCAGCGCCTTGAGTGGATTGGATAT
M  H  W  V  R  Q  A  P  G  Q  R  L  E  W  I  G  Y

      160     170     180     190     200
GTTAATCCTTTCAATGATGGTACTAAGTACAATGAGATGTTCAAAGGCAG
V  N  P  F  N  D  G  T  K  Y  N  E  M  F  K  G  R
                                     CDR2

      210     220     230     240     250
GGCCCACTGACTTCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCA
  A  T  L  T  S  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

      260     270     280     290     300
GCAGCCTGAGGTCTGAGGACACTGCGGCTCTATTACTGTGCAAGACAGGCT
  S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  Q  A

      310     320     330     340
TGGGGTTACCCCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCT (SEQ ID NO:60)
W  G  Y  P  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S (SEQ ID NO:36)
  CDR3
```

ES 2 592 216 T3

(Figura 4D) Cadena pesada VH4

```

      10      20      30      40      50
GAGGTC CAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAAAAGCCTGGGGCTTC
  E V Q L V Q S G A E V K K P G A S

      60      70      80      90     100
AGTGAAGG TGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGCTATGTTA
  V K V S C K A S G Y T F T S Y V
                                 CDR1

     110     120     130     140     150
TGCACTGGG TGAGGCAGGCCCTGGGCAGCGCCTTGAGTGGATTGGATAT
M H W V R Q A P G Q R L E W I G Y

     160     170     180     190     200
GTTAATCCTTTCAATGATGGTACTAAGTACAATGAGATGTTCAAAGGCAG
V N P F N D G T K Y N E M F K G R
                                 CDR2

     210     220     230     240     250
GGCCACACTGACTTCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCA
  A T L T S D K S T S T A Y M E L

     260     270     280     290     300
GCAGCCTGAGGCTGAGGACACTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACAGGCT
  S S L R S E D T A V Y Y C A R Q A

     310     320     330     340
TGGGGTTACCCCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCT (SEQ ID NO:61)
W G Y P W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO:37)
  CDR3
```

ES 2 592 216 T3

(Figura 4E) Cadena pesada VH5

```

      10      20      30      40      50
GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAAAAGCCTGGGGCTTC
  E  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S

      60      70      80      90      100
AGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGCTAGCTATGTTA
  V  K  V  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  S  Y  V
                                           CDR1

      110     120     130     140     150
TGCACTGGGTGAGGCAGGCCCTGGGCAGCGCCTTGAGTGGATTGGATAT
M  H  W  V  R  Q  A  P  G  Q  R  L  E  W  I  G  Y

      160     170     180     190     200
GTTAATCCTTTCAATGATGGTACTAAGTACAATGAGATGTTCAAAGGCAG
V  N  P  F  N  D  G  T  K  Y  N  E  M  F  K  G  R
                                           CDR2

      210     220     230     240     250
GGCCACAATCACTTCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCA
  A  T  I  T  S  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

      260     270     280     290     300
GCAGCCTGAGGTCTGAGGACACTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACAGGCT
  S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  Q  A

      310     320     330     340
TGGGGTTACCCCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCT (SEQ ID NO:62)
W  G  Y  P  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S (SEQ ID NO:38)
CDR3
```

Figura 5: Variantes de secuencias de anticuerpos humanos, compuestos, de cadenas ligeras anti-PD-L1 (Figura 5A) Cadena ligera VK1

```

          10          20          30          40          50
GACATTGTGCTCACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTCTGTCTCCCGGGGA
D I V L T Q S P A S L A L S P G E

          60          70          80          90          100
GAGAGCCACCCCTCTCCTGCAGAGCCACTGAAAGTGTTGAATACTATGGCA
R A T L S C R A T E S V E Y Y G
                      CDR1

          110          120          130          140          150
CAAGTTTAGTGCAGTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTC
T S L V Q W Y Q Q K P G Q P P K L

          160          170          180          190          200
CTCATCTATGCTGCATCCAGCGTAGATTCTGGGGTCCCTTCCAGGTTTAG
L I Y A A S S V D S G V P S R F S
                      CDR2

          210          220          230          240          250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCAATTCTCTGGAGG
G S G S G T D F T L T I N S L E

          260          270          280          290          300
AGGAGGATGCTGCAATGTATTTCTGTCAGCAAAGTAGGAGGGTTCCGTAC
E E D A A M Y F C Q Q S R R V P Y
                      CDR3

          310          320          330
ACGTTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGAGATAAAA (SEQ ID NO:63)
T F G Q G T K L E I K (SEQ ID NO:39)
    
```

ES 2 592 216 T3

(Figura 5B) Cadena ligera VK2

```

      10      20      30      40      50
GACATTGTGCTCACCCAATCTCCAGCTACTTTGTCTCTGTCTCCCGGGGA
D I V L T Q S P A T L S L S P G E

      60      70      80      90      100
GAGAGCCACCCTCTCCTGCAGAGCCACTGAAAGTGTTGAATACTATGGCA
R A T L S C R A T E S V E Y Y G
                                     CDR1

      110     120     130     140     150
CAAGTTTAGTGCAGTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTC
T S L V Q W Y Q Q K P G Q P P K L

      160     170     180     190     200
CTCATCTATGCTGCATCCAGCGTAGATTCTGGGGTCCCTTCCAGGTTTAG
L I Y A A S S V D S G V P S R F S
                                     CDR2

      210     220     230     240     250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCAATTCTCTGGAGG
G S G S G T D F T L T I N S L E

      260     270     280     290     300
CCGAGGATGCTGCAATGTATTTCTGTCAGCAAAGTAGGAGGGTTCCGTAC
A E D A A M Y F C Q Q S R R V P Y
                                     CDR3

      310     320     330
ACGTTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGAGATAAAA (SEQ ID NO:64)
T F G Q G T K L E I K (SEQ ID NO:40)

```

ES 2 592 216 T3

(Figura 5C) Cadena ligera VK3

10 20 30 40 50
GAGATTGTGCTCACCCAATCTCCAGCTACTTTGTCTCTGTCTCCCGGGGA
E I V L T Q S P A T L S L S P G E

60 70 80 90 100
GAGAGCCACCCTCTCCTGCAGAGCCACTGAAAGTGTTGAATACTATGGCA
R A T L S C R A T E S V E Y Y G
CDR1

110 120 130 140 150
CAAGTTTAGTGCAGTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTC
T S L V Q W Y Q Q K P G Q P P K L

160 170 180 190 200
CTCATCTATGCTGCATCCAGCGTAGATTCTGGGGTCCCTTCCAGGTTTAG
L I Y A A S S V D S G V P S R F S
CDR2

210 220 230 240 250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCAATTCTCTGGAGG
G S G S G T D F T L T I N S L E

260 270 280 290 300
CCGAGGATGCTGCAATGTATTTCTGTCAGCAAAGTAGGAGGGTTCCGTAC
A E D A A M Y F C Q Q S R R V P Y
CDR3

310 320 330
ACGTTCCGGACAGGGGACCAAGCTGGAGATAAAA (SEQ ID NO:65)
T F G Q G T K L E I K (SEQ ID NO:41)

ES 2 592 216 T3

(Figura 5D) Cadena ligera VK4

10 20 30 40 50
GACATTGTGCTCACCCAATCTCCAGCTACTTTGTCTCTGTCTCCCCGGGGA
D I V L T Q S P A T L S L S P G E

60 70 80 90 100
GAGAGCCACCCTCTCCTGCAGAGCCACTGAAAGTGTTGAATACTATGGCA
R A T L S C R A T E S V E Y Y G
CDR1

110 120 130 140 150
CAAGTTTGTAGTGCAGTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTC
T S L V Q W Y Q Q K P G Q P P K L

160 170 180 190 200
CTCATCTATGCTGCATCCAGCGTAGATTCTGGGGTCCCTTCCAGGTTTAG
L I Y A A S S V D S G V P S R F S
CDR2

210 220 230 240 250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCAATTCTCTGGAGG
G S G S G T D F T L T I N S L E

260 270 280 290 300
CCGAGGATGCTGCAACCTATTTCTGTGTCAGCAAAGTAGGAGGGTTCCGTAC
A E D A A T Y F C Q Q S R R V P Y
CDR3

310 320 330
ACGTTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGAGATAAAA (SEQ ID NO:66)
I F G Q G T K L E I K (SEQ ID NO:42)

Figura 6. Variantes de secuencias de anticuerpos humanos, compuestos, de cadenas pesadas anti-PD-L2 (Figura 6A) Cadena pesada VH1

```

      10      20      30      40      50
CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAACTGAAGAAACCTGGGGCCTC
  Q V Q L V Q S G A E L K K P G A S

      60      70      80      90      100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTGGCTACACGA
  V K M S C K A S G Y T F T G Y T
                                  CDR1

      110     120     130     140     150
TGCACTGGGTAAAAACAGGCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
M H W V K Q A P G Q G L E W I G Y

      160     170     180     190     200
ATTAATCCTAGAAGTGGATATACTGAGTATAATCAGAAGTTCAAGGACAG
  I N P R S G Y T E Y N Q K F K D R
                                  CDR2

      210     220     230     240     250
GACCACATTGACTGCAGACAAATCTACCAGCACAGCCTACATGGAACTGA
  T T L T A D K S T S T A Y M E L

      260     270     280     290     300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTGCAAGACCCTGG
  S S L R S E D S A V Y Y C A R P W

      310     320     330     340
TTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA (SEQ ID NO:67)
F A Y W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO:43)
  CDR3
  
```

ES 2 592 216 T3

(Figura 6B) Cadena pesada VH2

```

      10      20      30      40      50
CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAACCTGGGGCCTC
  Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S

      60      70      80      90      100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTGGCTACACGA
  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  G  Y  T
                                           CDR1

      110     120     130     140     150
TGCACTGGGTAAAACAGGCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
M  H  W  V  K  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

      160     170     180     190     200
ATTAATCCTAGAAGTGGATATACTGAGTATAATCAGAAGTTCAAGGACAG
I  N  P  R  S  G  Y  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                                           CDR2

      210     220     230     240     250
GACCACATTGACTGCAGACAAATCTACCAGCACAGCCTACATGGAAGTGA
  T  T  L  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

      260     270     280     290     300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCGGTCTATTATTGTGCAAGACCCTGG
  S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  P  W

      310     320     330     340
TTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA (SEQ ID NO:68)
F  A  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S (SEQ ID NO:44)
CDR3

```

ES 2 592 216 T3

(Figura 6C) Cadena pesada VH3

```

      10      20      30      40      50
CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAACCTGGGGCCTC
  Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S

      60      70      80      90      100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTGGCTACACGA
  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  G  Y  T
                                     CDR1

      110     120     130     140     150
TGCACTGGGTAAGACAGGCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
M  H  W  V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

      160     170     180     190     200
ATTAATCCTAGAAGTGGATATACTGAGTATAATCAGAAGTTCAAGGACAG
  I  N  P  R  S  G  Y  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                                     CDR2

      210     220     230     240     250
GACCACATTGACTGCAGACAAATCTACCAGCACAGCCTACATGGAAGTGA
  T  T  L  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

      260     270     280     290     300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCGGTCTATTATTGTGCAAGACCCTGG
  S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  P  W

      310     320     330     340
TTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA (SEQ ID NO:69)
F  A  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S (SEQ ID NO:45)
CDR3

```

(Figura 6D) Cadena pesada VH4

```

      10      20      30      40      50
CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAACCTGGGGCCTC
  Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S

      60      70      80      90      100
AGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTGGCTACACGA
  V  K  V  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  G  Y  T
                                           CDR1

      110     120     130     140     150
TGCACTGGGTAAGACAGGCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
M  H  W  V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

      160     170     180     190     200
ATTAATCCTAGAAGTGGATATACTGAGTATAATCAGAAGTTCAAGGACAG
I  N  P  R  S  G  Y  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                                           CDR2

      210     220     230     240     250
GACCACATTGACTGCAGACAAATCTACCAGCACAGCCTACATGGAAGTGA
  T  T  L  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

      260     270     280     290     300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCGGTCTATTATTGTGCAAGACCCTGG
  S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  P  W

      310     320     330     340
TTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA (SEQ ID NO:70)
F  A  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S (SEQ ID NO:46)
  CDR3
  
```

ES 2 592 216 T3

(Figura 6E) Cadena pesada VH5

```

      10          20          30          40          50
CAGGTC CAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAACCTGGGGCCTC
  Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S

      60          70          80          90          100
AGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTGGCTACACGA
  V  K  V  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  G  Y  T
                                           CDR1

      110         120         130         140         150
TGCACTGGGTAAGACAGGCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
  M  H  W  V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

      160         170         180         190         200
ATTAATCCTAGAAGTGGATATACTGAGTATAATCAGAAGTTCAAGGACAG
I  N  P  R  S  G  Y  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                                           CDR2

      210         220         230         240         250
GACCACAATCACTGCAGACAAATCTACCAGCACAGCCTACATGGAAGTGA
  T  T  I  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

      260         270         280         290         300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCGGTCTATTATTGTGCAAGACCCTGG
  S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  P  W

      310         320         330         340
TTTGCTTACTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA (SEQ ID NO:71)
F  A  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S (SEQ ID NO:47)
CDR3
```

Figura 7. Variantes de secuencias de anticuerpos humanos, compuestos, de cadenas ligeras anti-PD-L2 (Figura 7A) Cadena ligera VK1

```

      10      20      30      40      50
GACATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCTCCCTGACTGTGACACCAGGAGA
  D I V M T Q S P A S L T V T P G E

      60      70      80      90      100
GAAGGTCACTATCACCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTAAACAGTGGAA
  K V T I T C K S S Q S L L N S G
                        CDR1

      110     120     130     140     150
ATCAAAAGAACTACTTGACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCT
N Q K N Y L T W Y Q Q K P G Q P P

      160     170     180     190     200
AAACTGTTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCG
  K L L I Y W A S T R E S G V P D R
                        CDR2

      210     220     230     240     250
CTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC
  F T G S G S G T D F T L T I S S

      260     270     280     290     300
TGCAGGCTGAAGACGTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATTATAGTTAT
  L Q A E D V A V Y Y C Q N D Y S Y
                        CDR3

      310     320     330
CCTCTCACGTTTCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (SEQ ID NO:72)
P L T F G Q G T K L E I K (SEQ ID NO:48)

```

ES 2 592 216 T3

(Figura 7B) Cadena ligera VK2

```

      10      20      30      40      50
GACATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCTCCCTGTCTGTGACACCAGGAGA
  D I V M T Q S P A S L S V T P G E

      60      70      80      90     100
GAAGGTCACTATCACCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTAAACAGTGGAA
  K V T I T C K S S Q S L L N S G
                        CDR1

     110     120     130     140     150
ATCAAAAGAACTACTTGACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCT
N Q K N Y L T W Y Q Q K P G Q P P

     160     170     180     190     200
AAACTGTTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCG
  K L L I Y W A S T R E S G V P D R
                        CDR2

     210     220     230     240     250
CTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC
  F T G S G S G T D F T L T I S S

     260     270     280     290     300
TGCAGGCTGAAGACGTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATTATAGTTAT
  L Q A E D V A V Y Y C Q N D Y S Y
                        CDR3

     310     320     330
CCTCTCACGTTTCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (SEQ ID NO:73)
P L T F G Q G T K L E I K (SEQ ID NO:49)

```

ES 2 592 216 T3

(Figura 7C) Cadena ligera VK3

```

      10      20      30      40      50
GACATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCTTCCTGTCTGTGACACCAGGAGA
  D I V M T Q S P A F L S V T P G E

      60      70      80      90     100
GAAGGTCACTATCACCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAAACAGTGGAA
  K V T I T C K S S Q S L L N S G
                                 CDR1

      110     120     130     140     150
ATCAAAGAAGTACTTGACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCT
N Q K N Y L T W Y Q Q K P G Q P P

      160     170     180     190     200
AAACTGTTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCG
  K L L I Y W A S T R E S G V P D R
                                 CDR2

      210     220     230     240     250
CTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC
  F T G S G S G T D F T L T I S S

      260     270     280     290     300
TGCAGGCTGAAGACGTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATTATAGTTAT
  L Q A E D V A V Y Y C Q N D Y S Y
                                 CDR3

      310     320     330
CCTCTCACGTTTCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAAA (SEQ ID NO:74)
P L T F G Q G T K L E I K (SEQ ID NO:50)

```

ES 2 592 216 T3

(Figura 7D) Cadena ligera VK4

10 20 30 40 50
GACATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCTTCCTGTCTGTGACACCAGGAGA
D I V M T Q S P A F L S V T P G E

60 70 80 90 100
GAAGGTCACTATCACCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAAACAGTGGAA
K V T I T C K S S Q S L L N S G
CDR1

110 120 130 140 150
ATCAAAAGAACTACTTGACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCT
N Q K N Y L T W Y Q Q K P G Q P P

160 170 180 190 200
AAACTGTTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCG
K L L I Y W A S T R E S G V P D R
CDR2

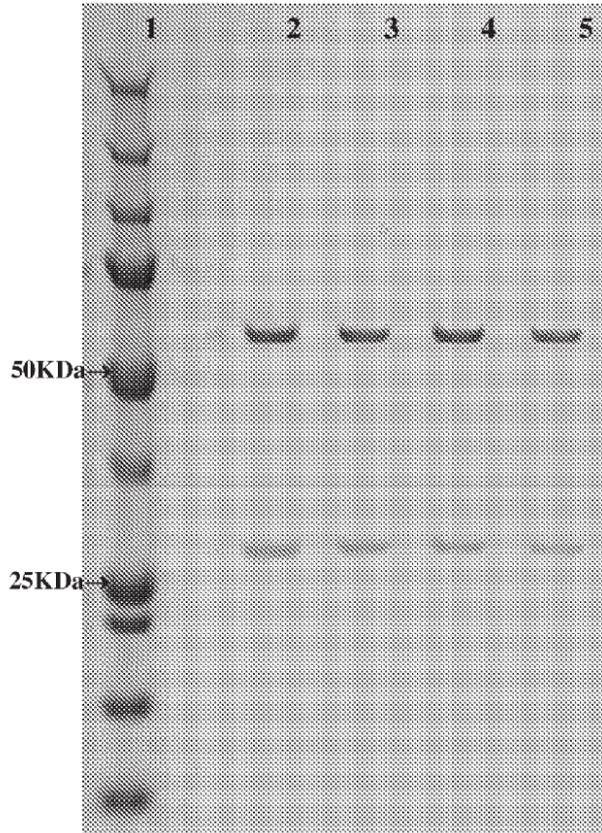
210 220 230 240 250
CTTCTCCGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC
F S G S G S G T D F T L T I S S

260 270 280 290 300
TGCAGGCTGAAGACGTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATTATAGTTAT
L Q A E D V A V Y Y C Q N D Y S Y
CDR3

310 320 330
CCTCTCACGTTTCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (SEQ ID NO:75)
P L T F G Q G T K L E I K (SEQ ID NO:51)

Figura 8. Purificación de anticuerpos humanos compuestos, EH12.2H7

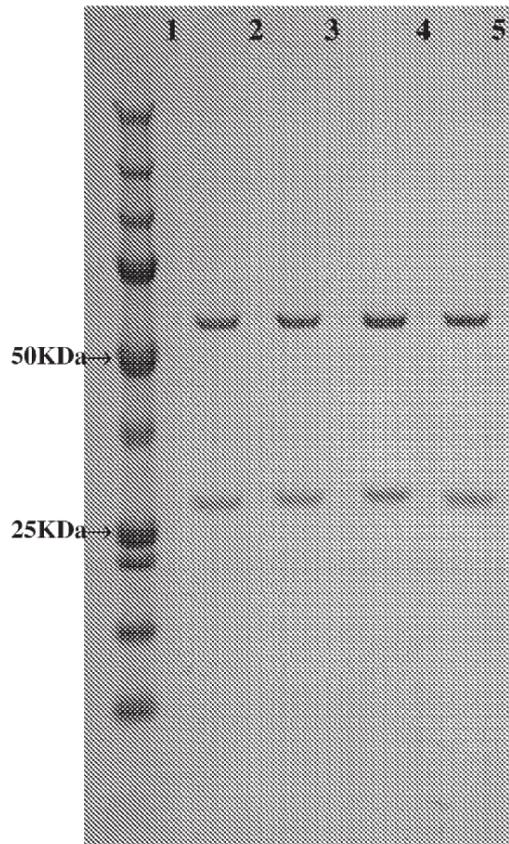
(Figura 8A) SDS-PAGE de anticuerpos EH12.2H7 purificados teñidos con azul de coomassie:



Carril 1: Marcador de precisión Bio-Rad
Carril 2: VH4/Vκ4
Carril 3: VH4/Vκ3
Carril 4: VH3/Vκ4
Carril 5: VH3/Vκ3

Se cargó 1µg de cada anticuerpo

(Figura 8B) SDS-PAGE de anticuerpos 29E.2AE purificados teñidos con azul de coomassie:



Carril 1: Marcador de precisión Bio-Rad

Carril 2: VH4/Vκ2

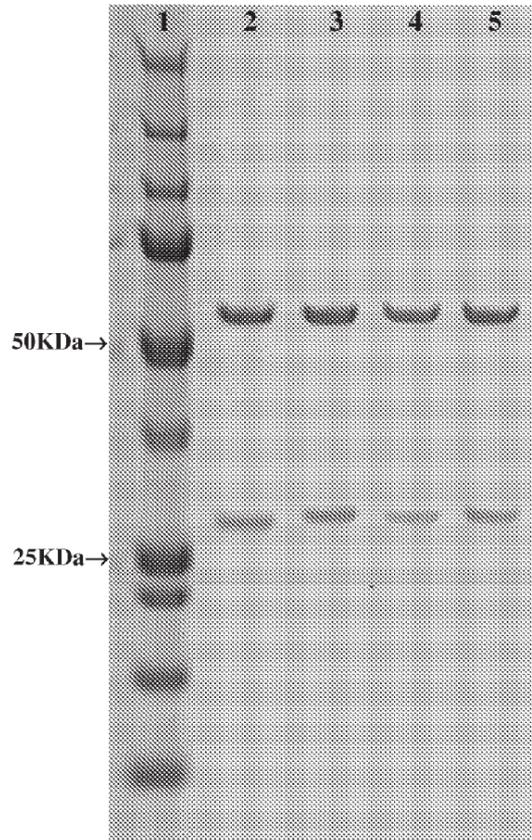
Carril 3: VH2/Vκ4

Carril 4: VH2/Vκ1

Carril 5: VH2/Vκ2

Se cargó 1µg de cada anticuerpo

(Figura 8C) SDS-PAGE de anticuerpos 24F.10C12 purificados teñidos con azul de coomassie:

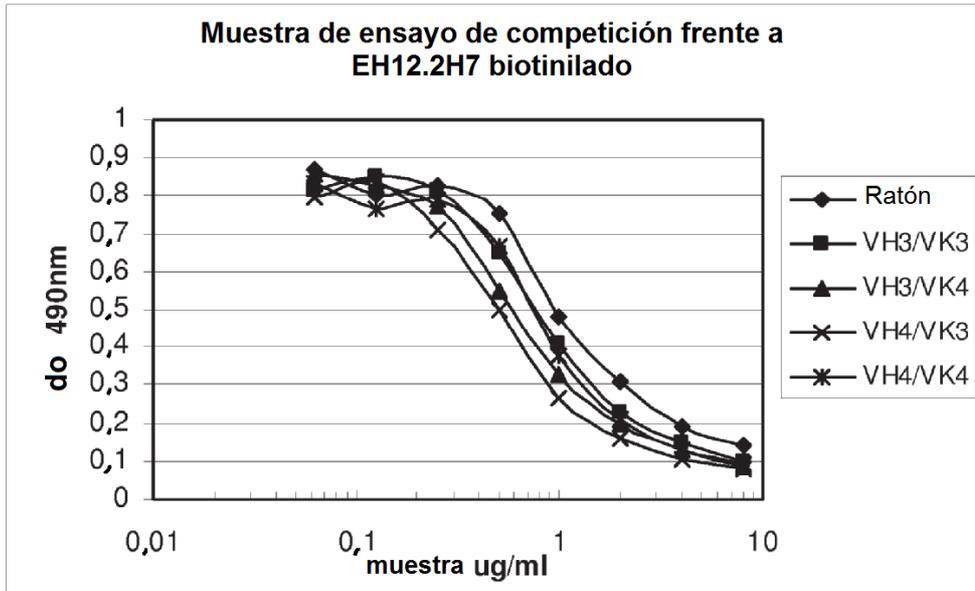


Carril 1: Marcador de precisión Bio-Rad
Carril 2: VH4/Vκ4
Carril 3: VH4/Vκ2
Carril 4: VH2/Vκ3
Carril 5: VH2/Vκ2

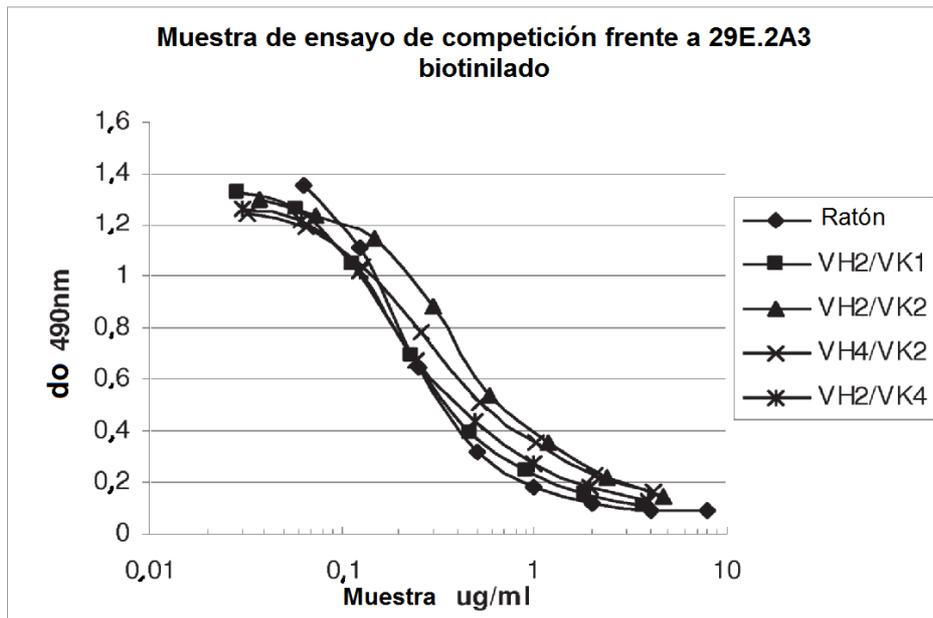
Se cargó 1µg de cada anticuerpo

Figura 9. Comparación de actividades de anticuerpos humanos, compuestos, con anticuerpos de referencia de ratón

(Figura 9A) ELISA de competición de PD-1 humano :



(Figura 9B) ELISA de competición de PD-L1 humano:



(Figura 9C) ELISA de competición de PD-L2 humano:

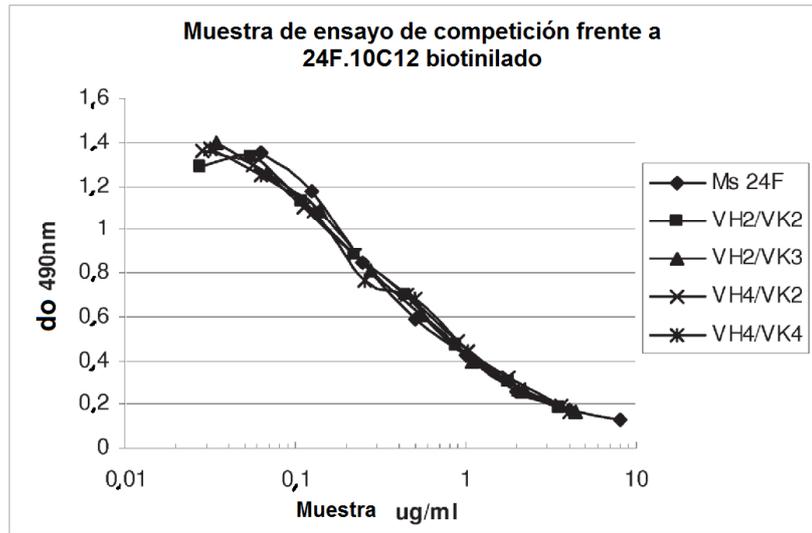


Figura 10: Comparación de la CI_{50} de unión de los anticuerpos anti-humano de ratón con los anticuerpos humanos compuestos

(Figura 10A) Competición con EH12.2H7 por la unión a PD-1

	VH1	VH2	VH3	VH4	VH5
VK1	0,82	0,78	0,82	0,77	ND
VK2	0,66	0,98	0,82	0,98	ND
VK3	0,82	0,98	0,76	0,46	ND
VK4	ND	0,90	0,60	0,74	ND

(Figura 10B) Competición con 20E.283 por la unión a PD-L1

	VH1	VH2	VH3	VH4	VH5
VK1	3,61	0,96	3,21	2,10	5,96
VK2	3,34	1,75	1,68	3,00	7,8
VK3	2,26	2,26	1,92	3,16	9,16
VK4	5,10	1,04	1,64	2,96	7,04

(Figura 10C) Competición con 24F.10C12 por la unión a PD-L2

	VH1	VH2	VH3	VH4	VH5
VK1	0,82	0,78	0,82	0,77	ND
VK2	0,66	0,98	0,82	0,98	ND
VK3	0,82	0,98	0,76	0,46	ND
VK4	ND	0,90	0,60	0,74	ND

Figura 11: Secuencias de aminoácidos de PD-1, PD-L1 y PD-L2

Secuencia de aminoácidos de PD-1 (SEQ ID NO: 2)

```

MQIPQAPWPV  VWAVLQLGWR  PGWFLDSPDR  PWNPPTFSPA  LLVVTEGDNA  50
TFTCSFSNTS  ESFVLNWYRM  SPSNQTDKLA  AFPEDRSQPG  QDCRFRVTQL 100
PNGRDFHMSV  VRARRNDSGT  YLCGAISLAP  KAQIKESLRA  ELRVTERRAE 150
VPTAHPSPSP  RPAGQFQTLV  VGVVGGLLGS  LVLLVWVLAV  ICSRAARGTI 200
GARRTGQPLK  EDPSAVPVFS  VDYGELDFQW  REKTPEPPVP  CVPEQTEYAT 250
IVFPSGMGTS  SPARRGSADG  PRSAQPLRPE  DGHCSWPL    288
    
```

Secuencia de aminoácidos de PD-L1 (SEQ ID NO: 4)

```

MRIFAVFIFM  TYWHLLNAFT  VTVPKDLYVV  EYGSNMTIEC  KFPVEKQLDL  50
AALIVYWEME  DKNIIQFVHG  EEDLKVQHSS  YRQRARLLKD  QLSLGNAALQ 100
ITDVKLQDAG  VYRCMISYGG  ADYKRITVKV  NAPYNKINQR  ILVVDPTSE 150
HELTCQAEGY  PKAEVIWTSS  DHQVLSGKTT  TTNSKREEKL  FNVSTLRIN 200
TTTNEIFYCT  FRRLDPEENH  TAEIUIPELP  LAHPPNERTH  LVILGAILLC 250
LGVALTFIFR  LRKGRMMDVK  KCGIQDTNSK  KQSDTHLEET  290
    
```

Secuencia de aminoácidos de PD-L2 (SEQ ID NO: 6)

```

MIFLLLMLSL  ELQLHQIAAL  FTVTVPKELY  IIEHGSNVTL  ECNFDTGSHV  50
NLGAITASLQ  KVENDTSPHR  ERATLLEEQL  PLGKASFHIP  QVQVRDEGQY 100
QCIIIIYVAV  DYKYLTLKVK  ASYRKINTHI  LKVPETDEVE  LTCQATGYPL 150
AEVSWPNVSV  PANTSHSRTP  EGLYQVTSVL  RLKPPPGRNF  SCVFWNTHVR 200
ELTLASIDLQ  SQMEPRTHPT  WLLHIFIPFC  IIAFIFIATV  IALRKQLCQK 250
LYSSKDITKR  PVTITKREVN  SAI    273
    
```

Figura 12: Secuencias de aminoácidos de CDR para los anticuerpos humanos compuestos

Anticuerpo	Cadena	CDR	Secuencia	SEQ ID NO.
Anti-PD-1	Pesada	CDR1	SSWIH	7
		CDR2	YIYPSTIGFTEYNQKFKD	8
		CDR3	WRDSSGYHAMDY	9
	Ligera	CDR1	RASQSVSTSGYSYMH	10
		CDR2	FGSNLES	11
		CDR3	QHSWEIPYT	12
Anti-PD-L1	Pesada	CDR1	SYVMH	13
		CDR2	YVNPFDGTYNEMFKG	14
		CDR3	QAWGYP	15
	Ligera	CDR1	RATESVEYYGTSLVQ	16
		CDR2	AASSVDS	17
		CDR3	QQSRRVPYT	18
Anti-PD-L2	Pesada	CDR1	GYTMH	19
		CDR2	YINPRSGYTEYNQKFKD	20
		CDR3	PWFAY	21
	Ligera	CDR1	KSSQSLNLSGNQKNYLT	22
		CDR2	WASTRES	23
		CDR3	QNDYSYPLT	24

Figura 13: Las secuencias de aminoácidos para las cadenas pesada y ligera de las regiones variables de anticuerpos humanos compuestos

Cadena pesada VH1 anti-PD-1 (SEQ ID NO 25)

QVQLVQSGAELKQPGASVKMSCKASGYSFTSSWIHWVKQAPGQGLEWIGYIYPSTGFTEYNQKFKDRA
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDSAVYYCARWRDSSGYHAMDYWGQGTSTVTVSS

Cadena pesada VH2 anti-PD-1 (SEQ ID NO 26)

QVQLVQSGAEVKQPGASVKMSCKASGYSFTSSWIHWVKQAPGQGLEWIGYIYPSTGFTEYNQKFKDRA
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRDSSGYHAMDYWGQGTSTVTVSS

Cadena pesada VH3 anti-PD-1 (SEQ ID NO 27)

QVQLVQSGHEVKQPGASVKMSCKASGYSFTSSWIHWVKQAPGQGLEWIGYIYPSTGFTEYNQKFKDRA
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRDSSGYHAMDYWGQGTSTVTVSS

Cadena pesada VH4 anti-PD-1 (SEQ ID NO 28)

QVQLVQSGHEVKQPGASVKMSCKASGYSFTSSWIHWVQAPGQGLEWIGYIYPSTGFTEYNQKFKDRA
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRDSSGYHAMDYWGQGTSTVTVSS

Cadena pesada VH5 anti-PD-1 (SEQ ID NO 29)

QVQLVQSGHEVKQPGASVKVSKASGYSFTSSWIHWVQAPGQGLEWIGYIYPSTGFTEYNQKFKDRA
TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRDSSGYHAMDYWGQGTSTVTVSS

Cadena ligera VK1 anti-PD-1 (SEQ ID NO 30)

DIVLTQSPASLTLSLSPGQRLTISCRASQSVSTSGYSYMHWYQQKPDQSPKLLIKFGSNLESGIPARFSG
SGSGTDFTLTISLSEEDFATYYCQHSWEIPYTFGQGTKLEIK

Cadena ligera VK2 anti-PD-1 (SEQ ID NO 31)

DIVLTQSPATLSLSPGQRLTISCRASQSVSTSGYSYMHWYQQKPDQSPKLLIKFGSNLESGIPARFSG
SGSGTDFTLTISLSEPEDFATYYCQHSWEIPYTFGQGTKLEIK

Cadena ligera VK3 anti-PD-1 (SEQ ID NO 32)

EIVLTQSPATLSLSPGQRLTISCRASQSVSTSGYSYMHWYQQKPDQSPKLLIKFGSNLESGIPARFSG
SGSGTDFTLTISLSEPEDFATYYCQHSWEIPYTFGQGTKLEIK

Cadena ligera VK4 anti-PD-1 (SEQ ID NO 33)

DIVLTQSPATLSLSPGQRLTISCRASQSVSTSGYSYMHWYQQKPDQSPKLLIKFGSNLESGIPARFSG
SGSGTDFTLTISLSEPEDFAVYYCQHSWEIPYTFGQGTKLEIK

Cadena pesada VH1 anti-PD-L1 (SEQ ID NO 34)

EVQLVQSGPELKKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQAPGQRLEWIGYVNPFDGDKYNEMFKGRA
TLTSDKSTSTAYMELSSLRSEDSAVYYCARQAWGYPWGQGTSTVTVSS

Cadena pesada VH2 anti-PD-L1 (SEQ ID NO 35)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQAPGQRLEWIGYVNPFDGDKYNEMFKGRA
TLTSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQAWGYPWGQGTSTVTVSS

Figura 13 (Continuación)

Cadena pesada VH3 anti-PD-L1 (SEQ ID NO 36)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWIGYVNPFDNDGTYNEMFKGRA
TLTSDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARQAWGYPWGQGLVTVSS

Cadena pesada VH4 anti-PD-L1 (SEQ ID NO 37)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWIGYVNPFDNDGTYNEMFKGRA
TLTSDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARQAWGYPWGQGLVTVSS

Cadena pesada VH5 anti-PD-L1 (SEQ ID NO 38)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWIGYVNPFDNDGTYNEMFKGRA
TITSDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARQAWGYPWGQGLVTVSS

Cadena ligera VK1 anti-PD-L1 (SEQ ID NO 39)

DIVLTQSPASLALSPGERATLSCRATESVEYYGTSLVQWYQQKPGQPPKLLIYAASSVDSGVP SRFSG
SGSGTDFTLTINSLEEEAAMYFCQQSRRVPYTFGQGTKLEIK

Cadena ligera VK2 anti-PD-L1 (SEQ ID NO 40)

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRATESVEYYGTSLVQWYQQKPGQPPKLLIYAASSVDSGVP SRFSG
SGSGTDFTLTINSLEAEADAAMYFCQQSRRVPYTFGQGTKLEIK

Cadena ligera VK3 anti-PD-L1 (SEQ ID NO 41)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRATESVEYYGTSLVQWYQQKPGQPPKLLIYAASSVDSGVP SRFSG
SGSGTDFTLTINSLEAEADAAMYFCQQSRRVPYTFGQGTKLEIK

Cadena ligera VK4 anti-PD-L1 (SEQ ID NO 42)

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRATESVEYYGTSLVQWYQQKPGQPPKLLIYAASSVDSGVP SRFSG
SGSGTDFTLTINSLEAEADAAMYFCQQSRRVPYTFGQGTKLEIK

Cadena pesada VH1 anti-PD-L2 (SEQ ID NO 43)

QVQLVQSGAELKKPGASVKMSCKASGYTFTGYTMHWVKQAPGQGLEWIGYINPRSGYTEYNQKFKDRT
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDSAVYYCARPWFAYWGQGLVTVSS

Cadena pesada VH2 anti-PD-L2 (SEQ ID NO 44)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTGYTMHWVKQAPGQGLEWIGYINPRSGYTEYNQKFKDRT
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARPWFAYWGQGLVTVSS

Cadena pesada VH3 anti-PD-L2 (SEQ ID NO 45)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTGYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPRSGYTEYNQKFKDRT
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARPWFAYWGQGLVTVSS

Cadena pesada VH4 anti-PD-L2 (SEQ ID NO 46)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPRSGYTEYNQKFKDRT
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARPWFAYWGQGLVTVSS

Figura 13 (Continuación)

Cadena pesada VH5 anti-PD-L2 (SEQ ID NO 47)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPRSGYTEYNQKFKDRT
TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPWFAYWGQGLVTVSS

Cadena ligera VK1 anti-PD-L2 (SEQ ID NO 48)

DIVMTQSPASLTVTPGEKVTITCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF
TSGSGTDFLTITISLQAEDVAVYYCQNDYSYPLTFGQGTKLEIK

Cadena ligera VK2 anti-PD-L2 (SEQ ID NO 49)

DIVMTQSPASLSVTPGEKVTITCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF
TSGSGTDFLTITISLQAEDVAVYYCQNDYSYPLTFGQGTKLEIK

Cadena ligera VK3 anti-PD-L2 (SEQ ID NO 50)

DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF
TSGSGTDFLTITISLQAEDVAVYYCQNDYSYPLTFGQGTKLEIK

Cadena ligera VK4 anti-PD-L2 (SEQ ID NO 51)

DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF
SGSGTDFLTITISLQAEDVAVYYCQNDYSYPLTFGQGTKLEIK

Figura 14

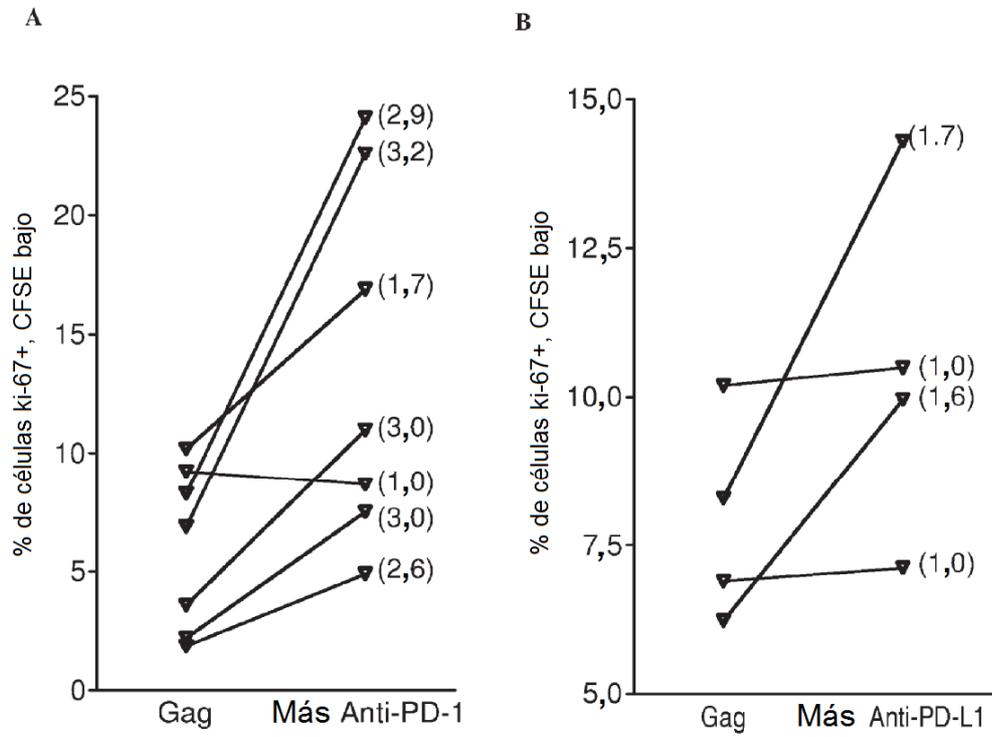


Figura 15

