

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 337**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.02.2010 PCT/EP2010/051563**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.08.2010 WO10089411**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2010 E 10705120 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2393835**

54 Título: **Anticuerpos contra PD-1 y anticuerpos contra PD-L1 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

09.02.2009 EP 09305119

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

08.08.2017

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE (33.3%) y
INSTITUT JEAN PAOLI & IRÈNE CALMETTES (33.3%)**

72 Inventor/es:

**OLIVE, DANIEL;
SERRIARI, NACER-EDDINE;
NUNES, JACQUES y
CHIOTTO, MARGUERITE**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 629 337 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra PD-1 y anticuerpos contra PD-L1 y usos de los mismos

5 Sector de la técnica

La invención se refiere a anticuerpos contra PD-1 y a anticuerpos contra PD-L1 y a usos de los mismos.

10 Estado de la técnica

La señalización de co-receptores es un mecanismo importante para coordinar y regular estrechamente las respuestas inmunitarias. El esquema habitual de activación de células T $\alpha\beta$ depende de señales positivas proporcionadas por antígenos peptídicos presentados por HLA de clase I o II. Las señales de los co-receptores aumentarán o evitarán esta activación.

Entre las moléculas de señalización negativa, aquellas que pertenecen a las familias CD28/B7 son con diferencia las más estudiadas. Se han descrito tres miembros de esta familia: el antígeno-4 asociado a CTL (CTLA-4), la proteína de muerte programada-1 (PD-1) y el atenuador de linfocitos B y T (BTLA). Todos desempeñan una función en el control de la tolerancia. Proporcionan señales negativas que limitan, terminan y/o atenúan las respuestas inmunitarias. PD-1 se aisló como un gen regulado positivamente en un hibridoma de células T que experimenta apoptosis y se llamó muerte programada 1. PD-1 o CD279 se expresa en células T y B activadas, así como en células mieloides activadas.

Su expresión es más amplia que CTLA-4 que se encuentra solamente en células T activadas. Tras el coligamiento con el receptor de células T (TcR), PD-1 provoca señales inhibitorias.

El dominio citoplasmático de PD-1 contiene dos tirosinas, una que constituye un receptor inhibitorio de tirosina de inmuno-receptor (ITIM) y el otro un motivo de cambio basado en tirosina de inmuno-receptor (ITSM). La fosforilación de la segunda tirosina da lugar al reclutamiento de las tirosina fosfatasas SHP2 y en algún grado SHP1. Estas fosfatasas desfosforilarán ZAP70, CD3 ζ y PKC θ y posteriormente atenuarán las señales de células T.

PD-1 inhibe principalmente la proliferación de células T y B causando la detención de la célula en G0/G1 e inhibiendo la producción de citoquinas en células T.

Se han descrito dos ligandos de PD-1, PD-L1/B7H1/CD274 y PD-L2/B7-DC/CD273. PD-L1 se expresa a bajos niveles en células inmunitarias tales como células B, células dendríticas, macrófagos y células T y se regula positivamente después de la activación. PD-L1 también se expresa en órganos no linfoides tales como células endoteliales, corazón, pulmón, páncreas, músculo, queratinocitos y placenta. La expresión en tejidos no linfoides sugiere que PD-L1 puede regular la función de células T y B auto-reactivas, así como células mieloides en tejidos periféricos o puede regular las respuestas inflamatorias en los órganos diana. La expresión de PD-L1 está principalmente regulada por interferón de tipo 1 y 2 que son reguladores principales de PD-L1 en células endoteliales y epiteliales. PD-L1 se expresa en muestras de tumor y está asociado a un mal pronóstico. Diversas infecciones víricas inducen la intensa expresión de PD-L1 en tejidos hospedadores.

La expresión en superficie celular de PD-L2/B7-DC está restringida a macrófagos y células dendríticas, aunque se encontró transcrito PD-L2 en tejidos no hematopoyéticos tales como corazón, hígado y páncreas. Su expresión superficial depende de la producción de las citoquinas IFN γ y Th2.

La expresión de PD-L1 y de PD-L2 depende también de distintos estímulos. En macrófagos, PD-L1 se induce por IFN γ mientras que PD-L2 se induce por IL-4. Se encuentra una regulación similar en DC aunque estas diferencias no son absolutas. Estos estudios tienden a sugerir que PD-L1 podría regular respuestas preferentemente Th1 mientras que PD-L2 regularía respuestas Th2.

Tanto PD-L1 como PD-L2 inhiben la proliferación de células T, la producción de citoquinas y la adhesión mediada por integrinas β 1 y β 2. Aunque algunos datos contradictorios han propuesto una función co-estimuladora. Sin embargo, PD-L2 pero no PD-L1 desencadena una señalización inversa en células dendríticas, que da lugar a producción de IL-12 y activación de células T.

Los patrones de expresión de PD-L1 y de PD-L2 sugieren funciones tanto solapantes como diferenciales en la regulación inmunitaria. PD-L1 es abundante en una diversidad de cánceres humanos (Dong et al., (2002) Nat. Med 8:787-9). La interacción entre PD-1 y PD-L1 provoca una disminución en los linfocitos de infiltración tumoral, una disminución en la proliferación mediada por el receptor de células T y evasión inmunitaria por las células cancerosas (Dong et al., (2003) J. Mol. Med. 81:281-7; Blank et al., (2005) Cancer Immunol. Immunother. 54:307-314; Konishi et al., (2004) Clin. Cancer Res. 10:5094-100). La supresión inmunitaria puede revertirse inhibiendo la interacción local de PD-1 con PD-L1, y el efecto es aditivo cuando la interacción de PD-1 con PD-L2 se bloquea también (Iwai., et al. (2002) Proc. Nat 7. Acad. Sci. USA 99:12293-7; Brown et al., (2003) J. Immunol. 170:1257-66).

Los animales deficientes de PD-1 desarrollan diversos fenotipos autoinmunitarios, incluyendo cardiomiopatía autoinmunitaria y un síndrome de tipo lupus con artritis y nefritis (Nishimura et al., (1999) *Immunity* H: 141-51; Nishimura et al., (2001) *Science* 291:319-22). Adicionalmente, se ha encontrado que PD-1 desempeña una función en la encefalomiелitis autoinmunitaria, el lupus sistémico eritematoso, la enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD), la diabetes de tipo I y la artritis reumatoide (Salama et al., (2003) *J Exp Med* 198:71-78; Prokunina y Alarcon-Riquelme (2004) *Hum Mol Genet* 13:R143; Nielsen et al., (2004) *Lupus* 11:510).

En modelos animales, el bloqueo de PD-L1 y de PD-L2 usando mAb de bloqueo evidencia funciones distintas en la susceptibilidad y la progresión crónica de la encefalitis autoinmunitaria experimental de una manera específica de cepa. En ratones pre-diabéticos NOD, el bloqueo de PD-L1 pero no el de PD-L2 precipita la diabetes. Usando el modelo de ratón RIP-mOVA de diabetes autoinmunitaria, Martin-Orozco et al., descubrieron que PD-L1 pero no PD-L2 mediaba la inhibición de la aparición de la diabetes (Martin-Orozco et al., (2006) *J Immunol.* 15;177(12):8291-5).

Hasta la fecha, no se ha demostrado ninguna estrategia satisfactoria para inducir potentes respuestas inmunitarias contra vacunas, especialmente en pacientes con cáncer. Aún tienen que idearse métodos para superar los mecanismos inmunosupresores observados en pacientes con cáncer y durante infecciones crónicas.

El tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y la prevención del rechazo de trasplantes en enfermedades de injerto contra hospedador (GVHD) depende de agentes inmunosupresores que tienen graves efectos secundarios y no siempre son eficaces. Se desean nuevos agentes inmunosupresores.

Martin-Orozco et al., (*J Immunol*, 2006, vol. 177, pág. 8291-8295) mencionan que anticuerpos antagonistas contra PD-1 provocaban diabetes autoinmunitaria destructiva en un modelo de ratón.

Koehn et al., (*J Immunol* 2008, vol. 181, pág. 5313-5322) describen que el bloqueo de la interacción de PD-1/PD-L1 con anticuerpos de bloqueo anti-PD-1 y anti-PD-L1 da lugar a rechazo de injertos.

Este documento describe el uso previo de una proteína de fusión (una inmunoglobulina dimérica contra PD-L1) para estimular células T que expresan PD-1 y, por tanto, para evitar el rechazo de injertos.

Objeto de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo contra PD-L1, que estabiliza la unión de PD-L1 a PD-1, como se define en las reivindicaciones.

La invención se refiere a un anticuerpo contra PD-L1 que estabiliza la unión de PD-L1 a PD-1 para su uso en un método para el tratamiento de un ser humano o de un organismo animal por terapia. La invención se refiere a un anticuerpo contra PD-L1 que estabiliza la unión de PD-L1 a PD-1 para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, el rechazo de trasplantes o una enfermedad de injerto contra hospedador.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

De acuerdo con la presente invención, "anticuerpo" o "inmunoglobulina" tienen el mismo significado, y se usarán por igual en la presente invención. El término "anticuerpo", como se usa en este documento, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno. Por tanto, el término anticuerpo abarca no solamente moléculas de anticuerpo completo, sino también fragmentos de anticuerpo o derivados. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, aunque sin limitación, Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂ y diacuerpos.

En los anticuerpos naturales, dos cadenas pesadas se unen entre sí por enlaces disulfuro y cada cadena pesada se une a una cadena ligera por un enlace disulfuro. Hay dos tipos de cadena ligera, lambda (λ) y kappa (κ). Hay cinco clases principales (o isotipos) de cadena pesada que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Cada cadena contiene distintos dominios de secuencia. La cadena ligera incluye dos dominios, un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). La cadena pesada incluye cuatro dominios, un dominio variable (VH) y tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3, mencionados colectivamente como CH). Las regiones variables tanto de la cadena ligera (VL) como de la cadena pesada (VH) determinan el reconocimiento de unión y la especificidad al antígeno. Los dominios de la región constante de la cadena ligera (CL) y pesada (CH) confieren importantes propiedades biológicas tales como asociación de cadena de anticuerpo, secreción, movilidad trans-placentaria, unión al complemento y unión a receptores Fc (FcR). El fragmento Fv es la parte N-terminal del fragmento Fab de una inmunoglobulina y consiste en las partes variables de una cadena ligera y una cadena pesada. La especificidad de los restos del anticuerpo en la complementariedad estructural entre el sitio de combinación de anticuerpo y el determinante antigénico. Los sitios de combinación de anticuerpo están compuestos de restos que son principalmente de las regiones hipervariables o determinantes de complementariedad

(CDR). Ocasionalmente, los restos de las regiones no hipervariables o flanqueantes (FR) influyen en la estructura global del dominio y, por tanto, el sitio de combinación. Las regiones determinantes de complementariedad o CDR se refieren a secuencias de aminoácidos que juntas definen la afinidad de unión y especificidad de la región Fv natural de un sitio de unión de inmunoglobulina nativa. La cadena ligera y pesada de una inmunoglobulina tiene cada una tres CDR, denominadas L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 y H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, respectivamente. Un sitio de unión a antígeno, por lo tanto, incluye seis CDR, que comprenden el conjunto de CDR de cada una de las regiones V de la cadena pesada y ligera. Las regiones flanqueantes (FR) se refieren a secuencias de aminoácidos interpuestas entre las CDR.

La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a una fusión modificada por ingeniería genética de partes de un anticuerpo de un animal, típicamente, un anticuerpo de ratón, con partes de un anticuerpo humano. Generalmente, los anticuerpos quiméricos contienen aproximadamente un 33 % de proteína de ratón y un 67 % de proteína humana. Desarrollados para reducir la respuesta humana anti-anticuerpos de animal provocada por anticuerpos de animales, combinan la especificidad del anticuerpo de animal con la interacción eficaz del sistema inmunitario humano de un anticuerpo humano.

De acuerdo con la invención, la expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que tiene una región flanqueante variable, regiones flanqueantes y constantes de un anticuerpo humano, pero que retiene las CDR del anticuerpo de animal.

El término "Fab" indica un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y una actividad de unión a antígeno, en que aproximadamente la mitad del lado N-terminal de la cadena H y la cadena L completa, entre los fragmentos obtenidos por tratamiento de la IgG con una proteasa, papaína, se unen juntos a través de un enlace disulfuro.

El término $F(ab')_2$ se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 100.000 y actividad de unión a antígeno, que es ligeramente más grande que el Fab unido a través de un enlace disulfuro de la región bisagra, entre los fragmentos obtenidos por tratamiento de la IgG con una proteasa, pepsina.

El término "Fab" se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y actividad de unión a antígeno, que se obtiene cortando un enlace disulfuro de la región bisagra del $F(ab')_2$.

Un polipéptido Fv de cadena sencilla ("scFv") es un heterodímero VH::VL unido covalentemente que habitualmente se expresa a partir de una fusión génica que incluye los genes codificantes de VH y VL unidos por un conector que codifica un péptido. "dsFv" es un heterodímero VH::VL estabilizado por un enlace disulfuro. Los fragmentos de anticuerpo divalentes y multivalentes pueden formarse espontáneamente por asociación de scFv monovalentes o pueden generarse por acoplamiento de scFv monovalentes por un conector peptídico, tal como $sc(Fv)_2$ divalente.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos pequeños de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, que son fragmentos que comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Usando un conector que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno.

Por "purificado" y "aislado" se entiende, cuando se hace referencia a un polipéptido (es decir, a un anticuerpo de acuerdo con la invención) o a una secuencia de nucleótidos, que la molécula indicada está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo. El término "purificado", como se usa en este documento, preferiblemente significa que están presentes al menos un 75 % en peso, más preferiblemente al menos un 85 % en peso, más preferiblemente aún al menos un 95 % en peso y mucho más preferiblemente al menos un 98 % en peso, de las macromoléculas biológicas del mismo tipo. Una molécula de ácido nucleico "aislada" que codifica un polipéptido particular se refiere a una molécula de ácido nucleico que está sustancialmente libre de otras moléculas de ácido nucleico que no codifican el polipéptido; sin embargo, la molécula puede incluir algunas bases o restos adicionales que no afectan de forma perjudicial a las características básicas de la composición.

En el contexto de la invención, el término "tratar" o "tratamiento", como se usa en este documento, significa revertir, aliviar, inhibir el progreso de o prevenir el trastorno o la afección al que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de dicho trastorno o afección. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende por una cantidad mínima de agente activo que es necesaria para conferir beneficio terapéutico a un sujeto. Por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente eficaz" para un mamífero es dicha cantidad que induce, mejora o causa de otro modo una mejora en los síntomas patológicos, la progresión de la enfermedad o las condiciones fisiológicas asociadas con o resistencia a sucumbir a un trastorno.

Como se usa en este documento, el término "prevención" se refiere a prevenir la aparición de la enfermedad o la afección en un sujeto que aún no se ha diagnosticado como teniéndola.

Como se usa en este documento, el término "sujeto" indica un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate. Preferiblemente, un sujeto de acuerdo con la invención es un ser humano.

Como se usa en este documento, los términos "cancerosa", "hiperproliferativa" y "neoplásica" se refieren a células que tienen la capacidad de crecimiento autónomo, es decir, un estado o condición anormal caracterizada por crecimiento celular de rápida proliferación. Los estados patológicos hiperproliferativos y neoplásicos pueden clasificarse como patológicos, es decir, que caracterizan o constituyen un estado patológico, o pueden clasificarse como no patológicos, es decir, una desviación de la normalidad pero no asociada con un estado patológico. Se entiende que término incluye todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos transformados malignos, independientemente del tipo histopatológico o fase de invasión. Los términos "cáncer" o "neoplasia" incluyen tumores malignos de los diversos sistemas orgánicos, tales como los que afectan al pulmón, mama, tiroides, linfoides, gastrointestinal y tracto genitourinario, así como adenocarcinomas que incluyen neoplasias tales como la mayoría de cánceres de colon, carcinoma de células renales, cáncer de próstata y/o tumores testiculares, carcinoma no microcítico del pulmón, cáncer del intestino delgado y cáncer del esófago.

Los autores de la presente invención han depositado un hibridoma que produce anticuerpo murino contra PD-1 (PD1.3) en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francia), de acuerdo con los términos del tratado de Budapest, el 4 de febrero de 2009. El hibridoma depositado tiene el número de depósito CNCM I-4122.

"PD1.3" se refiere a un anticuerpo aislado contra PD-1 que se puede obtener del hibridoma accesible en el número de depósito CNCM I-4122.

La expresión "un derivado de PD1.3" se refiere a un anticuerpo contra PD-1 que comprende las 6 CDR de PD1.3.

Los autores de la presente invención han depositado un hibridoma que produce anticuerpo murino contra PD-L1 (PDL1.1) en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francia), de acuerdo con los términos del tratado de Budapest, el 15 de octubre de 2008. El hibridoma depositado tiene el número de depósito CNCM I-4080.

"PDL1.1" se refiere a un anticuerpo aislado contra PD-L1 que se puede obtener del hibridoma accesible con el número de depósito CNCM I-4080.

La expresión "un derivado de PDL1.1" se refiere a un anticuerpo contra PD-L1 que comprende las 6 CDR de PDL1.1.

Los autores de la presente invención han depositado un hibridoma que produce anticuerpo murino contra PD-L1 (PDL1.2) en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francia), de acuerdo con los términos del tratado de Budapest, el 15 de octubre de 2008. El hibridoma depositado tiene el número de depósito CNCM I-4081.

"PDL1.2" se refiere a un anticuerpo aislado contra PD-L1 que se puede obtener del hibridoma accesible con el número de depósito CNCM I-4081.

La expresión "un derivado de PDL1.2" se refiere a un anticuerpo contra PD-L1 que comprende las 6 CDR de PDL1.2.

Anticuerpos de la invención y ácidos nucleicos que los codifican

La presente invención se refiere a un anticuerpo aislado contra PD-L1, que estabiliza la unión de PD-L1 a PD-1.

Típicamente, la estabilización de la unión de PD-L1 a PD-1 puede medirse de acuerdo con el método descrito en el ejemplo.

Los ejemplos de anticuerpos aislados contra PD-L1, que estabilizan la unión de PD-L1 a PD-1 son PDL 1.1 o PDL 1.2.

La presente invención también se refiere a los hibridomas accesibles con el número de depósito 1-4080 o 1-4081.

La descripción también se refiere a un anticuerpo que comprende las 6 CDR de PDL1.1 o las 6 CDR de PDL1.2.

En otro aspecto, la invención se refiere a un derivado de PDL1.1 o de PDL1.2 que comprende la cadena VL y la cadena VH de PDL1.1 o PDL1.2, respectivamente. En otra realización, la invención se refiere a un derivado de PDL1.1 o PDL1.2 que es un anticuerpo quimérico, que comprende los dominios variables de PDL1.1 o PDL1.2.

En una realización, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal.

En un aspecto, un anticuerpo de la descripción es un anticuerpo quimérico.

5 En otro aspecto, un anticuerpo de la descripción es un anticuerpo humanizado.

También se describe una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención. La memoria descriptiva también describe una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio VH o el dominio VL de un anticuerpo de la invención.

10 Típicamente, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o de ARN, que puede incluirse en cualquier vector adecuado, tal como un plásmido, cósmido, episoma, cromosoma artificial, fago o vector vírico.

15 Las expresiones "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el vehículo por el cual una secuencia de ADN o de ARN (por ejemplo, un gen foráneo) puede introducirse en una célula hospedadora, para transformar el hospedador y promover la expresión (por ejemplo, la transcripción y la traducción) de la secuencia introducida.

20 También se describe un vector que comprende un ácido nucleico de la invención.

Dichos vectores pueden comprender elementos de regulación, tales como un promotor, potenciador, terminador y similares, para causar o dirigir la expresión de dicho anticuerpo tras su administración a un sujeto. Los ejemplos de promotores y potenciadores usados en el vector de expresión para células animales incluyen el promotor temprano y el potenciador de SV40, el promotor y el potenciador LTR del virus de la leucemia murina de Moloney, el promotor y el potenciador de la cadena H de la inmunoglobulina y similares.

25 Puede usarse cualquier vector de expresión para células animales, siempre que pueda insertarse y expresarse un gen que codifica la región C del anticuerpo humano. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen pAGE107, pAGE103, pHSG274, pKCR, pSG1 beta d2-4- y similares.

30 Otros ejemplos de plásmidos incluyen plásmidos de replicación que comprenden un origen de replicación o plásmidos de integración tales como, por ejemplo, pUC, pcDNA, pBR y similares.

35 Otros ejemplos de vector vírico incluyen vectores adenovíricos, retrovíricos, del virus del herpes y de AAV. Dichos virus recombinantes pueden producirse por técnicas conocidas en la técnica, tales como por transfección de células de empaquetado o transfección transitoria con plásmidos o virus auxiliares. Los ejemplos típicos de células de empaquetado de virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GPenv+, células 293, etc. Pueden encontrarse protocolos detallados para producir dichos virus recombinantes de replicación defectuosa, por ejemplo, en los documentos WO 95/14785, WO 96/22378, US 5.882.877, US 6.013.516, US 4.861.719, US 5.278.056 WO 94/19478.

40 También se describe una célula que se ha transfectado, infectado o transformado por un ácido nucleico y/o por un vector de acuerdo con la invención. El término "transformación" significa la introducción de un gen, secuencia de ADN o de ARN "foráneo" (es decir, extrínseco o extracelular) en una célula hospedadora, de modo que la célula hospedadora exprese el gen o la secuencia introducida para producir una sustancia deseada, típicamente una proteína o una enzima codificada por el gen o la secuencia introducida. Una célula hospedadora que recibe y expresa ADN o ARN introducido se ha "transformado".

45 Los ácidos nucleicos descritos anteriormente pueden usarse para producir un anticuerpo de la invención en un sistema de expresión adecuado. La expresión "sistema de expresión" significa una célula hospedadora y un vector compatible en condiciones adecuadas, por ejemplo, para la expresión de una proteína codificada por el ADN foráneo portado por el vector e introducido en la célula hospedadora.

50 Los sistemas comunes de expresión incluyen células hospedadoras de *E. coli* y vectores plasmídicos, células hospedadoras de insecto y vectores de baculovirus y células hospedadoras de mamífero y vectores. Otros ejemplos de células hospedadoras incluyen, sin limitación, células procariotas (tales como bacterias) y células eucariotas (tales como células de levadura, células de mamífero, células de insecto, células vegetales, etc.). Los ejemplos específicos incluyen *E. coli*, las levaduras *Kluyveromyces* o *Saccharomyces*, líneas celulares de mamífero (por ejemplo, células Vero, células CHO, células 3T3, células COS, etc.), así como cultivos celulares de mamífero primarios o establecidos (por ejemplo, producidos a partir de linfoblastos, fibroblastos, células embrionarias, células epiteliales, células nerviosas, adipocitos, etc.). Los ejemplos también incluyen la célula SP2/0-Ag14 de ratón (ATCC CRL1581), la célula P3X63-Ag8.653 de ratón (ATCC CRL1580), la célula CHO en que el gen de la dihidrofolato reductasa (a partir de ahora mencionado como "gen DHFR") está defectuoso, célula YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 de rata (ATCC CRL1662, a partir de ahora en este documento mencionada como "célula YB2/0") y similares.

65

También se describe un método de producción de una célula hospedadora recombinante que expresa un anticuerpo de acuerdo con la invención, comprendiendo dicho método las etapas de: (i) introducir *in vitro* o *ex vivo* un ácido nucleico recombinante o un vector como se describe anteriormente competente, (ii) cultivar *in vitro* o *ex vivo* la célula hospedadora recombinante obtenida y (iii) opcionalmente, seleccionar las células que expresan y/o secretan dicho anticuerpo. Dichas células hospedadoras recombinantes pueden usarse para la producción de anticuerpos de la invención.

Métodos de producción de anticuerpos de la invención

Los anticuerpos de la invención pueden producirse por cualquier técnica conocida en la técnica, tal como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, en solitario o en combinación.

Conociendo la secuencia de aminoácidos de la secuencia deseada, un experto en la materia puede producir fácilmente dichos anticuerpos, por técnicas convencionales para la producción de polipéptidos. Por ejemplo, pueden sintetizarse usando el método bien conocido en fase sólida, preferiblemente usando un aparato disponible en el mercado de síntesis de péptidos (tal como el fabricado por Applied Biosystems, Foster City, California) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Como alternativa, los anticuerpos de la invención pueden sintetizarse por técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos pueden obtenerse como productos de expresión de ADN después de la incorporación de secuencias de ADN que codifican los anticuerpos en vectores de expresión y la introducción de dichos vectores en hospedadores eucariotas o procariotas adecuados que expresarán los anticuerpos deseados, a partir de los cuales pueden aislarse posteriormente usando técnicas bien conocidas.

En particular, la invención se refiere adicionalmente a un método de producción de un anticuerpo de la invención, comprendiendo dicho método las etapas que consisten en: (i) cultivar una célula hospedadora transformada de acuerdo con la invención en condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicho anticuerpo; y (ii) recuperar el anticuerpo expresado.

En otra realización particular, el método comprende las etapas de:

- (i) cultivar el hibridoma depositado como CNCM 1-4080 o CNCM 1-4081 en condiciones adecuadas para permitir la expresión del anticuerpo; y
- (ii) recuperar el anticuerpo expresado.

Los anticuerpos de la invención se separan adecuadamente del medio de cultivo por procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía en hidroxil apatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

En un aspecto particular, un anticuerpo quimérico humano puede producirse obteniendo secuencias de ácido nucleico que codifican los dominios VL y VH como se describe previamente, construyendo un vector de expresión de anticuerpo quimérico humano insertándolos en un vector de expresión para una célula animal que tiene células que codifican CH de anticuerpo humano y CL de anticuerpo humano, y expresando la secuencia codificante introduciendo el vector de expresión en una célula animal.

En cuanto al dominio CH de un anticuerpo quimérico humano, puede ser cualquier región que pertenezca a una inmunoglobulina humana, pero aquellas de la clase IgG son adecuadas y una cualquiera de las subclases que pertenezcan a la clase IgG, tal como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, también puede usarse. Además, en cuanto a la CL de un anticuerpo quimérico humano, puede ser cualquier región que pertenezca a Ig, y pueden usarse aquellas de la clase kappa o clase lambda.

Los métodos para producir anticuerpos quiméricos implican técnicas convencionales de ADN recombinante y transfección génica que son bien conocidos en la técnica (véanse los documentos de patente US5.202.238; y US5.204.244).

Un anticuerpo humanizado puede producirse obteniendo secuencias de ácido nucleico que codifican dominios CDR, como se describe previamente, construyendo un vector de expresión de anticuerpo humanizado insertándolos en un vector de expresión para una célula animal que tiene genes que codifican (i) una región constante de cadena pesada idéntica a la de un anticuerpo humano y (ii) una región constante de cadena ligera idéntica a la de un anticuerpo humano, y expresando los genes introduciendo el vector de expresión en una célula animal.

El vector de expresión del anticuerpo humanizado puede ser de un tipo en que un gen que codifica una cadena pesada de anticuerpo y un gen que codifica una cadena ligera de anticuerpo existen en vectores diferentes o de un tipo en que ambos genes existen en el mismo vector (de tipo tándem). Respecto a la facilidad de construcción de un vector de expresión de anticuerpo humanizado, la facilidad de introducción en células animales y el equilibrio entre los niveles de expresión de las cadenas H y L del anticuerpo en células animales, el vector de expresión de anticuerpo humanizado del tipo tándem es preferido. Ejemplos de vector de expresión de anticuerpo humanizado de

tipo tándem incluyen pKANTEX93 (documento WO 97/10354), pEE18 y similares.

Los métodos para producir anticuerpos humanizados basados en técnicas convencionales de ADN recombinante y transfección génica son bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos pueden humanizarse usando una diversidad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo, por ejemplo, injerto de CDR (documento EP 239.400; publicación PCT WO91/09967; patentes de Estados Unidos n.º 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), rechapado o rebarnizado (documento EP 592.106; documento EP 519.596), y reordenamiento de cadena (patente de Estados Unidos n.º 5.565.332). La tecnología general de ADN recombinante para la preparación de dichos anticuerpos también es conocida (véase la solicitud de patente Europea EP 125023 y la solicitud de patente internacional WO 96/02576).

Las moléculas Fab pueden obtenerse tratando un anticuerpo que reacciona específicamente con PD-1 con una proteasa, papaína. Además, el Fab puede producirse insertando ADN que codifica el Fab del anticuerpo en un vector para un sistema de expresión procariota o para un sistema de expresión eucariota, e introduciendo el vector en un procariota o eucariota (según lo apropiado) para expresar el Fab.

Las moléculas $F(ab')_2$ pueden obtenerse tratando un anticuerpo que reacciona específicamente con PD1.3 con una proteasa, pepsina. Además, $F(ab')_2$ puede producirse uniendo el Fab' descrito a continuación a través de un enlace tioéter o un enlace disulfuro. Las moléculas Fab' pueden obtenerse tratando $F(ab')_2$ que reacciona específicamente con PD-1 humana con un agente reductor, ditiotreitól. Además, el Fab' puede producirse insertando ADN que codifica el fragmento Fab' del anticuerpo en un vector de expresión para procariotas, o un vector de expresión para eucariotas, e introduciendo el vector en un procariota o eucariota (según lo apropiado) para realizar su expresión.

Las moléculas scFv pueden producirse obteniendo el ADNc que codifica los dominios VH y VL como se describe previamente, construyendo el ADN que codifica scFv, insertando el ADN en un vector de expresión para procariotas, o un vector de expresión para eucariotas, y después introduciendo el vector de expresión en un procariota o eucariota (según lo apropiado) para expresar el scFv. Para generar un fragmento scFv humanizado, puede usarse una tecnología bien conocida llamada injerto de CDR, que implica seleccionar las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un fragmento scFv donante e injertándolas en una región flanqueante del fragmento scFv humano de estructura tridimensional conocida (véanse, por ejemplo, los documentos W098/45322; WO 87/02671; US5.859.205; US5.585.089; US4.816.567; EP0173494).

Se contemplan modificaciones de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en este documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se sabe que cuando un anticuerpo humanizado se produce injertando simplemente solamente las CDR en VH y en VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano en las FR de la VH y de la VL de un anticuerpo humano, se reduce la actividad de unión al antígeno en comparación con la del anticuerpo original derivado de un animal no humano. Se considera que varios restos de aminoácido de la VH y de la VL del anticuerpo no humano, no solamente en las CDR sino también en las FR, están directa o indirectamente asociados con la actividad de unión al antígeno. Por tanto, la sustitución de estos restos de aminoácido con diferentes restos de aminoácidos derivados de las FR de la VH y de la VL del anticuerpo humano reduciría la actividad de unión. Para resolver el problema, en anticuerpos injertados con CDR humanas, se han hecho intentos por identificar, entre las secuencias de aminoácidos de la FR de la VH y de la VL de anticuerpos humanos, un resto de aminoácido que esté directamente asociado con la unión al anticuerpo, o que interactúe con un resto de aminoácido de CDR, o que mantenga la estructura tridimensional del anticuerpo y que esté asociado directamente con la unión al anticuerpo. La actividad de unión al antígeno reducida podría aumentarse reemplazando los aminoácidos identificados con restos de aminoácidos del anticuerpo original derivado de un animal no humano.

Pueden hacerse modificaciones y cambios en la estructura de los anticuerpos de la presente invención, y en las secuencias de ADN que los codifican, y aun obtener una molécula funcional que codifique un anticuerpo con características deseables.

En la realización de los cambios en las secuencias de aminoácidos, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de los aminoácidos a la hora de conferir una función biológica interactiva en una proteína está generalmente comprendida en la técnica. Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos y similares. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático basándose en su hidrofobicidad y características de carga, que son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9) y arginina (-4,5).

También se describen variantes que conservan la función de los anticuerpos de la presente invención.

"Variantes que conservan la función" son aquellas en que un resto de aminoácido dado en una proteína o en una enzima se ha cambiado sin alterar la conformación global y función del polipéptido incluyendo, aunque sin limitación,

el remplazo de un aminoácido con uno que tiene propiedades similares (tal como, por ejemplo, polaridad, potencial de unión de hidrógeno, ácido, básico, hidrófobo, aromático y similares). Los aminoácidos diferentes a los indicados como conservados pueden diferir en una proteína de modo que el porcentaje de similitud de secuencia proteica o de aminoácidos entre dos proteínas cualesquiera de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, de un 70 % a un 99 % determinado de acuerdo con un esquema de alineación tal como por el método de agrupamiento, donde la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN. Una "variante que conserva la función" también incluye un polipéptido que tiene al menos un 60 % de identidad de aminoácidos determinada por los algoritmos BLAST o FASTA, preferiblemente al menos un 75 %, más preferiblemente al menos un 85 %, aún más preferiblemente al menos un 90 % e incluso más preferiblemente al menos un 95 %, y que tiene las mismas propiedades o funciones o propiedades funciones sustancialmente similares a la proteína nativa o precursora con la que se compara.

Dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando más de un 80 %, preferiblemente más de un 85 %, preferiblemente más de un 90 % de los aminoácidos son idénticos, o más de aproximadamente un 90 %, preferiblemente más de un 95 % son similares (funcionalmente equivalentes) sobre la longitud completa de la secuencia más corta.

Preferiblemente, las secuencias similares u homólogas se identifican por alineación usando, por ejemplo, el programa de apilamiento GCG (Genetics Computer Group, para el paquete GCG, Versión 7, Madison, Wisconsin) o cualquier algoritmo de comparación de secuencias tal como BLAST, FASTA, etc.

Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una estructura proteica sin pérdida apreciable de actividad. Como la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína definen la actividad funcional biológica de la proteína, pueden hacerse ciertas sustituciones de aminoácido en una secuencia proteica y, por supuesto, en su ADN que codifica la secuencia, obteniendo al mismo tiempo, no obstante, una proteína con propiedades similares.

Por tanto, se contempla que pueden hacerse diversos cambios en las secuencias de los anticuerpos de la invención, o en las secuencias de ADN correspondientes que codifican dichos anticuerpos, sin pérdida apreciable de su actividad biológica.

Se sabe en la técnica que ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen un índice o valor hidropático similar y que aún producen una proteína con actividad biológica similar, es decir, aún obtienen una proteína biológicamente funcional equivalente.

Como se resume anteriormente, las sustituciones de aminoácido, por lo tanto, generalmente se basan en la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral del aminoácido, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño y similares. Las sustituciones ejemplares que tienen en consideración diversas características anteriores son bien conocidas para los expertos en la materia e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina. Otro tipo de modificación de aminoácido del anticuerpo de la invención puede ser útil para alterar el patrón original de glucosilación del anticuerpo.

Por "alterar" se entiende deleccionar uno o más restos de carbohidrato encontrados en el anticuerpo, y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glucosilación de los anticuerpos está típicamente ligada a N. "Ligada a N" se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la adhesión enzimática del resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio potencial de glucosilación. La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glucosilación ligados a N).

Otro tipo de modificación covalente implica el acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al anticuerpo. Estos procedimientos son ventajosos porque no requieren la producción del anticuerpo en una célula hospedadora que tenga capacidades de glucosilación para glucosilación ligada a N u O. Dependiendo del modo de acoplamiento usando, el azúcar o azúcares pueden unirse a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfidrido libres tales como los de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina, (e) restos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano, o (f) el grupo amida de glutamina. Por ejemplo, dichos métodos se describen en el documento W087/05330.

La eliminación de cualquier resto de carbohidrato presente en el anticuerpo puede conseguirse química o enzimáticamente. La desglucosilación química requiere la exposición del anticuerpo al compuesto ácido trifluorometanosulfónico o un compuesto equivalente.

Este tratamiento provoca la escisión de la mayoría o de todos los azúcares excepto el azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando al mismo tiempo el anticuerpo intacto. La escisión enzimática de los restos de carbohidrato en los anticuerpos puede conseguirse por el uso de una diversidad de endo y exoglucosidasas.

5 Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende la unión del anticuerpo a uno de una diversidad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, propilenglicol o polioxialquilenos, de la manera expuesta en las patentes de Estados Unidos n.º 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337.

10 También puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, para potenciar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento del anticuerpo. Esto puede conseguirse introduciendo una o más sustituciones de aminoácido en una región Fc del anticuerpo. Como alternativa o adicionalmente, puede introducirse uno o más restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de ese modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región.

15 El anticuerpo homodimérico así generado puede tener capacidad de internalización mejorada y/o eliminación celular mediada por el complemento y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) aumentada (Caron PC. Et al., J Exp Med. 1 de octubre de Caron PC. et al., J Exp Med. 1 de octubre de 1992;176(4):1191-5 y Shopes B. J Immunol. 1 de mayo de 1992;148(9):2918-22). 1;176(4):1191-5 y Shopes B. J Immunol. 1 de mayo de 20 1992;1;148(9):2918-22).

Usos terapéuticos de los anticuerpos de la invención

25 Loa autores de la presente invención han demostrado que PD1.3 inhibe la unión de PD-L1 y PD-L2 a PD-1 y de ese modo pueden usarse para superar los mecanismos inmunosupresores mediados por PD-1 observados en pacientes con cáncer y durante infecciones crónicas.

También se describe PD1.3 o un derivado del mismo para su uso en un método para el tratamiento de un organismo humano o animal por terapia.

30 También se describe PD1.3 o un derivado del mismo para el tratamiento de un cáncer o una infección crónica.

También se describe un método para tratar un cáncer o una infección crónica donde dicho método comprende la etapa de administrar un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de PD1.3 o de un derivado del mismo.

40 Los ejemplos de cánceres incluyen, aunque sin limitación, neoplasias hemáticas tales como neoplasia linfóide de células B, neoplasia linfóide de células T, linfoma no Hodgkin (NHL), B-NHL, T-NHL, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocito pequeño (SLL), linfoma de células del manto (MCL), neoplasia linfóide de células NK y neoplasia de linaje de células mieloides. Ejemplos de cánceres no hemáticos incluyen, aunque sin limitación, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer pulmonar, cáncer cerebral, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer colorrectal, cáncer de huesos, cáncer cervical, cáncer hepático, cáncer oral, cáncer esofágico, cáncer de tiroides, cáncer renal, cáncer de estómago, cáncer testicular y cáncer de piel.

45 Los ejemplos de infecciones crónicas incluyen, aunque sin limitación, infecciones víricas, bacterianas, parasitarias o fúngicas tales como hepatitis crónica, infecciones pulmonares, infecciones de las vías respiratorias inferiores, bronquitis, gripe, neumonía y enfermedades transmitidas por vía sexual. Los ejemplos de infecciones víricas incluyen, aunque sin limitación, hepatitis (HAV, HBV, HCV), herpes simple (HSV), herpes zoster, HPV, gripe (Flu), SIDA y el complejo relacionado con el SIDA, varicela (varicella), catarro común, infección por citomegalovirus (CMV), viruela (variola), fiebre del Colorado por garrapatas, fiebre por dengue, fiebre hemorrágica por ébola, enfermedad de 50 pie y boca, fiebre de Lassa, sarampión, fiebre hemorrágica de Marburgo, mononucleosis infecciosas, paperas, norovirus, poliomielitis, leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML), rabia, rubeola, SARS, encefalitis vírica, gastroenteritis vírica, meningitis vírica, neumonía vírica. Enfermedad del Nilo occidental y fiebre amarilla. Los ejemplos de infecciones bacterianas incluyen, aunque sin limitación, neumonía, meningitis bacteriana, cólera, difteria, tuberculosis, ántrax, botulismo, brucelosis, campilobacteriosis, tifus, gonorrea, listeriosis, enfermedad de 55 Lyme, fiebre reumática, pertussis (tos ferina), peste, salmonelosis, fiebre escarlata, sigelosis, sífilis, tétano, tracoma, tularemia, fiebre tifoide e infecciones del tracto urinario. Los ejemplos de infecciones parasitarias incluyen, aunque sin limitación, malaria, leishmaniasis, tripanosomiasis, enfermedad de Chagas, criptosporidiosis, fascioliasis, filariasis, infecciones amebicas, giardiasis, infección por oxiuros, esquistosomiasis, teniasis, toxoplasmosis, 60 triquinelosis y tripanosomiasis. Los ejemplos de infecciones fúngicas incluyen, aunque sin limitación, candidiasis, aspergilosis, coccidioidomicosis, criptococcosis, histoplasmosis y tinea pedis.

PD1.3 o un derivado del mismo puede usarse como adyuvante de vacuna para el tratamiento de un cáncer o de una infección crónica.

65

También se describe una vacuna para el tratamiento de un cáncer o de una infección crónica que comprende PD1.3 o un derivado del mismo.

También se describe un kit para el tratamiento de un cáncer o de una infección crónica, que comprende:

- a) PD1.3 o un derivado del mismo; y
- b) una vacuna para el tratamiento de un cáncer o de una infección crónica.

Los dos elementos del kit pueden administrarse de forma simultánea o secuencial en el tiempo.

Los ejemplos de vacunas para el tratamiento de un cáncer o de una infección crónica son:

incluyendo aunque sin limitación, vacunas contra infecciones víricas, bacterianas, parasitarias o fúngicas tales como VIH y VBH y vacunas contra cánceres asociados a virus (por ejemplo, VPH o VBH) o vacunas antineoplásicas, por ejemplo, usadas para tratar a pacientes con melanoma, leucemia, cánceres de mama, cánceres pulmonares.

Además, los autores de la presente invención han generado anticuerpos contra PD-L1, que estabilizan la unión de PD-L1 a PD-1 y de ese modo pueden usarse para estimular los mecanismos inmunosupresores mediados por PD-1. Estos anticuerpos contra PD-L1 pueden usarse como agentes inmunosupresores.

En una realización adicional, la invención se refiere a un anticuerpo contra PD-L1, que estabiliza la unión de PD-L1 a PD-1 para su uso en un método para el tratamiento de un organismo humano o animal por terapia.

En particular, la invención se refiere a un anticuerpo contra PD-L1, que estabiliza la unión de PD-L1 a PD-1 para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, el rechazo de trasplantes o una enfermedad de injerto contra hospedador.

También se describe un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria, el rechazo de trasplantes o una enfermedad de injerto contra hospedador, donde dicho método comprende la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo contra PD-L1, que estabiliza la unión de PD-L1 a PD-1. Típicamente, los anticuerpos contra PD-L1, que estabilizan la unión de PD-L1 a PD-1 pueden ser PDL1.1 o PDL1.2.

Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias que pueden tratarse incluyen, aunque sin limitación, artritis reumatoide (RA), diabetes mellitus insulino dependiente (diabetes de tipo 1), esclerosis múltiple (MS), enfermedad de Crohn, lupus sistémico eritematoso (SLE), esclerodermia, síndrome de Sjögren, pénfigo vulgar, penfigoide, enfermedad de Addison, espondilitis anquilosante, anemia aplásica, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad celiaca, dermatomiositis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Grave, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hashimoto, leucopenia idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática, infertilidad masculina, enfermedad de mixta del tejido conectivo, miastenia grave, anemia perniciosa, uveítis facogénica, cirrosis biliar primaria, mixoedema primario, síndrome re Reiter, síndrome del hombre rígido, tirotoxicosis, colitis ulcerante y granulomatosis de Wegener.

Típicamente, un anticuerpo contra PD-L1, que estabiliza la unión de PD-L1 a PD-1 puede usarse en combinación con otros agentes inmunosupresores y quimioterapéuticos tales como, aunque sin limitación, prednisona, azatrioprina, ciclosporina, metotrexato y ciclofosfamida.

También se describe una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención.

Por lo tanto, un anticuerpo de la invención puede combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

"Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica o indeseada de otro modo cuando se administran a un mamífero, especialmente un ser humano, según lo apropiado. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga sólida, semi-sólida o líquido no tóxico, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo.

La forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración, la dosificación y el régimen dependen de forma natural de la afección a tratar, de la gravedad de la enfermedad, de la edad, del peso y del género del paciente, etc.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para administración tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraocular y similares.

- 5 Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación con capacidad de inyectarse. Estos pueden ser, en particular, soluciones isotónicas, estériles, salinas (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de dichas sales) o composiciones secas, especialmente liofilizadas que tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o de solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables.
- 10 Las dosis usadas para la administración pueden adaptarse como una función de diversos parámetros y, en particular, como una función del modo de administración usado, de la patológica relevante o, como alternativa, de la duración deseada del tratamiento.
- 15 Para preparar composiciones farmacéuticas, puede disolverse o dispersarse una cantidad eficaz del anticuerpo en un vehículo o medio acuoso farmacéuticamente aceptable.
- 20 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación improvisada de soluciones o de dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida que exista una facilidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y de almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de los microorganismos, tales como bacterias y hongos.
- 25 Las soluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.
- 30 Un anticuerpo de la invención puede formularse en una composición en una forma neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden obtenerse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxido sódico, potásico, de amonio, de calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.
- 35 El vehículo también puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede conseguirse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse por el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.
- 40
- 45 Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los componentes activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con otros diversos ingredientes enumerados anteriormente, según lo necesario, seguido por esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y secado por congelación que producen un polvo del ingrediente más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución filtrada a esterilidad previamente del mismo.
- 50
- 55 También se contempla la preparación de soluciones más concentradas o altamente concentradas para inyección directa, donde se prevé el uso de DMSO como disolvente para producir una penetración extremadamente rápida, suministrando altas concentraciones de los agentes activos a un área de tumor pequeña.
- 60 Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una diversidad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también pueden emplearse cápsulas de liberación de fármacos y similares.
- 65 Para administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe tamponarse adecuadamente si fuera necesario y el diluyente líquido primero tiene que volverse isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse

serán conocidos para los expertos en la materia a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, una dosificación podría disolverse en 1 ml de solución isotónica de NaCl y añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermoclisión o inyectarse en el sitio propuesto de infusión (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Necesariamente se producirá alguna variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto que se esté tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual.

Los anticuerpos de la invención pueden formularse en una mezcla terapéutica para que comprenda aproximadamente de 0,0001 a 1,0 miligramos, o aproximadamente de 0,001 a 0,1 miligramos, o aproximadamente de 0,1 a 1,0 o incluso aproximadamente 10 miligramos por dosis o similar. También pueden administrarse múltiples dosis.

Además de los compuestos formulados para administración parenteral, tales como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; cápsulas de liberación temporizada; y cualquier otra forma actualmente usada.

En ciertos aspectos, el uso de liposomas y/o de nanopartículas se contempla para la introducción de anticuerpos en células hospedadoras. La formación y el uso de liposomas y/o de nanopartículas es conocida para los expertos en la materia.

Las nanocápsulas generalmente pueden atrapar compuestos de una manera estable y reproducible. Para evitar los efectos secundarios debidos a la sobrecarga de polímeros intracelulares, dichas partículas ultra finas (con tamaño de aproximadamente 0,1 μm) generalmente se diseñan usando polímeros capaces de degradarse *in vivo*. Se contemplan nanopartículas de polialquil-cianoacrilato biodegradables que cumplen estos requisitos, para su uso en la presente invención y dichas partículas pueden prepararse fácilmente.

Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas de bicapas concéntricas multilamelares (también llamadas vesículas multilamelares (MLV)). Las MLV generalmente tienen diámetros de 25 nm a 4 μm . La sonicación de las MLV provoca la formación de vesículas unilamelares pequeñas (SUV) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 Å, que contienen una solución acuosa en el centro. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, de la fuerza iónica y de la presencia de cationes divalentes.

La invención se ilustrará adicionalmente en vista de las siguientes figuras y ejemplo.

Descripción de las figuras

Figura 1: análisis de SPR usando Biacore de unión competitiva de PD-L1 y PD-L2 a PD-1.

- (A) Una representación esquemática de la inhibición de la unión competitiva superficial usada en (B).
 (B) Los chips de PD-1 se pre-incubaron con una cantidad creciente de PD-L2 (de 0 a 1000 UR) y PD-L1 se inyectó a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 2 minutos a un caudal de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ sin retirar PD-L2 unido. Los sensogramas que muestran la unión de PD-L1 a diferente nivel de ocupación de PD-L2 están superpuestos.
 (C) Una representación esquemática de la inhibición en solución usada en (D).
 (D) Las proteínas recombinantes PD-1 a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se pre-incubaron con concentraciones crecientes de PD-L2 (de 0 a 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se inyectaron durante 2 minutos a un caudal de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ en el chip de PD-L1. Los valores UR controlados 10 segundos después del final de la inyección se representaron como una función de la concentración de PD-L2 (escala logarítmica).

Figura 2: El anticuerpo PD1.3 bloquea la unión de PD-1 tanto a PD-L1 como a PD-L2 y potencia la activación de células T.

- (A) Una representación esquemática de la inhibición de unión competitiva superficial usada en (B) y en (C). En una primera etapa las proteínas PD-1 inmovilizadas se saturan usando los Fab de anticuerpo y los ligandos PD-1 correspondientes se inyectan como un analito soluble en una segunda etapa.
 (B y C) Las proteínas PD-L1Ig (B) y PD-L2Ig (C) se inyectaron a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 2 minutos a un caudal de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ en un chip de PD-1 (ninguno) o un chip de PD-1 pre-incubado con Fab anti-PD-1, PD1.3 o PD1.6. Los sensogramas que muestran la unión de los ligandos de PD-1 en las diferentes situaciones están superpuestos. Los datos mostrados son representativos de dos experimentos diferentes.
 (D) Los mAb PD1.3 evitan la unión de PD-L1 Fc y PD-L2 Fc a células que expresan PD-1.
 (E y F) El mAb PD1.3 es capaz de inducir la producción de IFN- γ e IL-10 en células T CD4 tras la interacción con DC. Se co-cultivaron iDC alogénicas con células T CD4+ con anti-PD1.3, PD1.6 o control de isotipo. Los cultivos se incubaron durante 5 días, los sobrenadantes se retiraron para el análisis de citoquinas. Se determinaron los niveles de producción de IFN- γ (E) y la producción de IL-10 (F) por duplicado por detección ELISA. Los datos mostrados son representativos de dos experimentos diferentes.

Figura 3: PD-L1 y PD-L2 no se unen a PD-1 con el mismo mecanismo molecular.

(A) Sensogramas superpuestos representativos de la unión de PD-L1 y de PD-L2 al chip de PD-1, PD-L1 y CTLA-4 que se unen al chip de CD80. Las proteínas a 10 µg/ml se inyectaron durante 30 segundos a un caudal de 10 µl/min en un chip de PD-1 y se dejaron disociar durante 120 segundos más.

(B) Sensogramas superpuestos que muestran inyecciones cortas (azul) y largas (rojo) de PD-L1 (superior) y PD-L2 (inferior) en un chip de PD-1 respectivamente. Las proteínas a 10 µg/ml se inyectaron durante 1 o 7 minutos a un caudal de 10 µl/min en el chip de PD-1. Los sensogramas se normalizaron en el eje Y y se alinearon el eje X al final de la inyección.

Figura 4: Los anticuerpos contra PD-L1 PDL1.1 y PDL1.2 estabilizan la unión de PD-L1 a PD-1.

(A) Sensogramas superpuestos que muestran las inyecciones de proteínas recombinantes de Ig contra PD-L1 (gris) o las inyecciones de proteínas recombinantes de Ig contra PD-L1 pre-incubadas con anticuerpos contra PD-L1 (negro) en un chip de PD-1. Las proteínas recombinantes de Ig contra PD-L1 a 10 µg/ml se pre-incubaron con Fab de anticuerpo contra PDL1.1, PDL1.2 o PDL1.3 a una concentración de saturación de 100 µg/ml y se inyectaron durante 10 minutos a un caudal de 10 µl/min en el chip de PD-1. Los sensogramas se normalizaron en el eje Y y se alinearon en el eje X al final de la inyección.

(B) Análisis FACS sobre células COS que expresan PD-L1. Se incubaron los mAb Fab PDL1.1, PDL1.2 y PDL1.3 con células que expresan PD-L1 durante 5 o 30 minutos. La unión de Ig contra PD-1 se reveló con anticuerpo de cabra anti-humano (GAH) conjugado con PE, la relación de MFI se indicó en el eje Y. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos diferentes.

Figura 5: Mecanismos probables de interacción de PD-L1 con PD-1**Ejemplo****Resumen**

La molécula de muerte programada 1 (PD-1) está implicada en la tolerancia periférica y en la regulación de infecciones víricas persistentes, así como un mecanismo de escape del tumor del sistema inmunitario. Se han descrito dos ligandos, PD-L1 y PD-L2, que difieren en la distribución tisular, la regulación de la expresión y los restos implicados en su unión a PD-1. Se investigó adicionalmente los mecanismos moleculares de las interacciones de PD-1 con sus ligandos usando proteínas recombinantes y mAb por resonancia de plasmón superficial y unión a superficie celular. Se pudo demostrar que tanto PD-L1 como PD-L2 compiten de forma cruzada por la unión a PD-1. De forma interesante y en la misma línea, un mAb contra PD-1 seleccionado podía impedir la unión tanto de PD-L1 como de PD-L2. PD-L1 y PD-L2 se unían a PD-1 con afinidades comparables pero permanecían diferencias notables a nivel de características de asociación y disociación. Por tanto, PD-L1 pero no PD-L2 tenían una interacción retardada reminiscente de un fenómeno de transición conformacional. Estos mecanismos se confirmaron adicionalmente gracias a los mAb contra PD-L1 que podían retardar la disociación de PD-L1 de PD-1. Este mecanismo no estaba restringido a la interacción de PD-1 ya que PD-L1 se comporta de una manera similar con su segundo ligando CD80.

Finalmente, CTLA-4 y PD-L1 se unían a distintos sitios no solapantes sobre CD80. Estos datos enfatizan adicionalmente los mecanismos moleculares diferenciales de interacción de ambos ligandos a PD-1 que identifican nuevas posibilidades para idear una terapia de mAb que pueda prevenir la unión de ambos ligandos a PD-1 para permitir un bloqueo óptimo de la inhibición inmunitaria en infección crónica, cáncer y trasplante.

Materiales y métodos**Construcciones**

Se generó el ADNc de PD-1 y de CTLA-4 humano por RT-PCR a partir de células T activadas (CD3 + CD28) usando los cebadores mostrados en la tabla 1 y posteriormente se subclonó en un vector DNA4 (Yang WC et al., Int. Immunol. 2000). La región extracelular de PD-1 y de CTLA-4 humano (aminoácido 1 a aminoácido 152) se amplificó a partir de este plásmido usando los cebadores mostrados en la tabla 1 y se clonó en fase con el fragmento Fc de la secuencia de IgG1 humana usando el vector Cos Fc Link (SmithKline Beecham Pharmaceuticals, King of Prussia, PA). Se generaron los ADNc de PD-L1 y de PD-L2 humanos por RT-PCR a partir del ARN total humano de cerebro y pulmón (Clontech Laboratories, Inc) respectivamente usando los cebadores mostrados en la tabla 1. Se ha usado el mismo protocolo de clonación que para PD-1 para generar los PD-L de longitud completa y sus partes extracelulares como proteínas de fusión de Ig.

Tabla 1 - Secuencias de cebadores usadas en este estudio

Nombre	Cebadores	Secuencias
PD1 de longitud completa	Codificante	ATGCAGATCCCACAGGGCGCCCTGGCC (SEQ ID NO:1)
	No codificante	TCAGAGGGGGCCAAGAGCAGTGTCCATC (SEQ ID NO:2)
PD1 extracelular	Codificante	GCGAATTCATGCAGATCCCACAGGGCGCCC (SEQ ID NO:3)
	No codificante	CTTCCCGTCTTCACGGGAGCCGGCTG (SEQ ID NO:4)
PD-L1 de longitud completa	Codificante	ATGAGGATATTTGCTGTCTTTATATTC (SEQ ID NO:5)
	No codificante	TTACGTCTCCTCCAAATGTGT (SEQ ID NO:6)
PD-L1 extracelular	Codificante	GCGAATTCATGCAGGATATTTGCTGTCTTTAT (SEQ ID NO:7)
	No codificante	CCGGTACCTTCTGGGATGACCAATTCAGCTG (SEQ ID NQ:8)
PD-L2 de longitud completa	Codificante	ACGCCAAATTTTGAGTGCTT (SEQ ID NO:9)
	No codificante	TGAAAAGTGCAAATGGCAAG (SEQ ID NO:10)
PD-L2 extracelular	Codificante	GCGAATTCATGATCTTCTCCTGCTAATGTTG (SEQ ID NO:11)
	No codificante	CCGGTACCGTCAATGCTGGCCAAAGTAAG (SEQ ID NO:12)

Proteínas de fusión de IgG humana solubles de PD1, PD-L, PD-L2, CTLA-4 y CD80

- 5 Se construyó el ADNc quimérico ligando el dominio extracelular de PD1, PD-L1, PD-L2 y CTLA-4 con el fragmento Fc de la secuencia de IgG1 humana usando el vector Cos Fc Link.

Se cultivaron células Cos en DMEM con FBS al 10 % con L-glutamina 2 mM y se transfectaron en medio CHO-S-SFM II (de Invitrogen) con FBS con la construcción plasmídica de ADN en el vector CFL con el reactivo de transfección FuGENE 6 de acuerdo con el protocolo del fabricante (ROCHE). El sobrenadante de cultivo se recogió 7 días después de la transfección, se filtró y se cargó en una columna de proteína A Affigel de 5 ml de acuerdo con el protocolo del fabricante (Bio-rad, Hercules, CA). Después del lavado, las proteínas se eluyeron con un tampón citrato de 0,1 mol/l, pH 3,5, se concentraron y se dializaron frente a solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las etapas de purificación se controlaron por ELISA usando un sistema de revelado de tipo sándwich compuesto por anticuerpo recubierto contra IgG humana-UNLB e IgG humana-AP (Southern Biotechnology Associates) y se revelaron por el sustrato pNPP (Sigma). Se controló la pureza y la calidad de las proteínas de fusión de Ig humana por electroforesis en gel y por tinción de superficie celular sobre líneas celulares COS transfectadas con PD1, PD-L1, PD-L2 o CTLA-4 humano respectivamente. El Fc de CD80 se adquirió de R&D.

20 Generación de anticuerpo monoclonal anti-PD1, PD-L1, PD-L2 y CD80 humano y fragmentación Fab

Se produjeron mAb contra PD1, PD-L1 y PD-L2 humano de forma similar. Se inmunizaron ratones BALB/c hembra por inyección IP con 10 µg de proteína de fusión de Ig humana con adyuvante de Freund. La inmunización se repitió tres veces a intervalos de 2 semanas, la cuarta inmunización se hizo por inyección IV con 10 µg de la proteína de fusión de Ig en la cola. Tres días después, las células esplénicas se fusionaron con células de mieloma X63Ag8 con PEG 1500 (Roche) y se clonaron con selección HAT (Sigma) y factor de clonación de hibridoma (HCF de origen). Los sobrenadantes del hibridoma se exploraron por tinción de superficie celular de las líneas de células COS transfectadas con PD1, PD-L1 o PD-L2 humano respectivamente y para la ausencia de reactividad con células COS no transfectadas. Los clones PD1.3 (ratón, IgG2b) y PD1.6 (ratón, IgG1), PDL1.1, PDL1.2 y PDL1.3 (ratón, IgG1) y PD-L2 (ratón, IgG1) se produjeron por producción de fluido ascítico, se purificaron con columna de afinidad de proteína A y se eligieron como reactivos por análisis FACS y Biacore y estudios funcionales. Las células COS transfectadas de forma transitoria se obtuvieron con el reactivo de transfección FuGENE 6 de acuerdo con el protocolo del fabricante (ROCHE). El mAb contra CD80 2D10.4 se ha presentado previamente.

35 La fragmentación Fab se realizó usando papaína con el kit de preparación de Fab ImmunoPure de acuerdo con el protocolo del fabricante (PIERCE). Los mAb completos y Fab se sometieron a SDS-PAGE reductor y el gel se tiñó con azul de Coomassie, no había mAb completo contaminante presente en la preparación de Fab (datos no mostrados). El Fab retenía su capacidad de unirse a los receptores respectivos. El análisis FACS con los mAb completos y sus Fab reveló aproximadamente la misma intensidad de fluorescencia media tras la unión a células COS transfectadas con PD-1, PD-L1 o PD-L2.

Análisis FACS

45 La línea celular Cos-7 se cultivó en DMEM con FBS al 10 % con L-glutamina 2 mM (Invitrogen). La tinción de células COS transfectadas de forma transitoria siguió el procedimiento básico. En resumen, las células se incubaron con dilución optimizada de los mAb, se lavaron en PBS frío con FBS al 2 % y acida sódica al 0,02 % y se incubaron con anticuerpo de cabra anti-ratón (GAM) conjugado con FITC (Beckman Coulter). Después de los lavados, las células se analizaron en un citómetro de flujo FACS CANTO (Becton Dickinson).

50 Para ensayar el efecto de los anticuerpos no bloqueantes anti-PD-L1 PDL1.1 y PDL1.2 sobre la unión de PD-L1 a PD-1, se añadieron 4 µg/ml de proteína PD-1 Ig sobre células COS transfectadas con PD-L1 tratadas o preincubadas durante 5 o 30 minutos con 7,5 µg/ml de los mAb Fab PDL1.1, PDL1.2 o PDL1.3. La unión de PD-1 Ig se

reveló con anticuerpo de cabra anti-humano (GAH) conjugado con PE. Los resultados se expresan como la intensidad de fluorescencia media (MFI). La relación de MFI se calculó por la MFI de células pre-incubadas con Fab/MFI de células no tratadas.

5 Experimentos Biacore

Se realizaron mediciones de resonancia de plasmón superficial en un aparato mejorado Biacore 1000 (Biacore GE Healthcare) a 25 °C. En todos los experimentos Biacore, el tampón HBS-EP (Biacore GE Healthcare) sirvió como tampón de ejecución y los sensogramas se analizaron con el software Biaevaluation 4.1.

Para la inmovilización de las proteínas, las proteínas recombinantes se inmovilizaron covalentemente a grupos carboxilo en la capa de dextrano en un chip de detección CM5. La superficie del chip de detección se activó con EDC/NHS clorhidrato de (N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida y N-hidroxisuccinimida (Biacore GE Healthcare)).

Las proteínas se diluyeron hasta 10 µg/ml en tampón de acoplamiento (acetato 10 mM, pH 5,2) y se inyectaron hasta que se alcanzó el nivel apropiado de inmovilización (es decir, 1000 a 1200 UR).

La desactivación de los grupos activados restantes se realizó usando etanolamina 100 mM pH 8 (Biacore GE Healthcare).

Para determinar la afinidad de las diluciones en serie de la proteína de 0,3 a 30 nM y de 1,37 a 90 nM de los anticuerpos solubles y las proteínas recombinantes respectivamente, se inyectaron durante 2 minutos a un caudal constante de 40 µl/min en capas de dextrano que contenían proteínas dianas recombinantes inmovilizadas y se dejaron disociar durante 3 minutos antes de la regeneración por una inyección de 8 segundos de NaCl 500 mM y tampón NaOH 10 mM.

Los sensogramas resultantes se analizaron por ajuste global usando el modelo apropiado.

Para experimentos de inhibición de la unión competitiva superficial, los analitos solubles se inyectaron a una concentración constante de 10 µg/ml sobre capas de dextrano que contenían proteínas diana recombinantes inmovilizadas apropiadas. Cada ciclo de competición consistía en 3 etapas de inyección de 2 minutos a 10 µl/min de caudal constante. En primer lugar, se inyecta un analito dos veces. En segundo lugar, sin retirar el primer analito, se inyecta un segundo analito y se controlan los sensogramas y los valores UR. El sensograma del segundo analito se compara con el sensograma obtenido cuando este analito se inyecta directamente en proteínas diana recombinantes desnudas. Se determinó el porcentaje de inhibición de la unión del segundo analito por el primer analito (I_{2-1}) a partir de los valores UR obtenidos 10 segundos después del final de las inyecciones, usando la siguiente fórmula: $I_{2-1} = (1 - (UR_{2-1}/UR_2)) * 100$. UR_{2-1} y UR_2 son los valores UR del segundo analito controlados en presencia y en ausencia del primer analito, respectivamente. Después de cada ciclo, se regeneraron los chips de detección por inyección de 8 segundos de NaCl 500 mM y tampón NaOH 10 mM a un caudal de 40 µl/min.

Para los experimentos de inhibición en solución, se pre-incubaron proteínas recombinantes solubles a una concentración constante de 10 µg/ml con concentraciones crecientes de ligandos recombinantes equivalentes (de 0 a 60 µg/ml) o anticuerpos (de 0 a 80 µg/ml y de 0 a 120 µg/ml para los mAb contra PD-1, los mAb contra PD-L2 y los mAb contra PD-L1 respectivamente) y se inyectaron durante 2 minutos a un caudal de 10 µl/min en los chips apropiados. Los valores UR se controlaron 10 segundos después del final de la inyección. Después de cada ciclo, se regeneraron los chips de detección por inyección de 8 segundos de NaCl 500 mM y tampón NaOH 10 mM a un caudal de 40 µl/min.

Para medir el efecto de estabilización de los anticuerpos PDL1.1 y PDL1.2 sobre la unión de PD-L1 a PD-1, se pre-incubaron las proteínas PD-L1 Ig recombinantes solubles a una concentración constante de 10 µg/ml con una concentración de saturación de 100 µg/ml de los Fab de anticuerpo PDL1.1 y PDL1.2 y se inyectaron durante 10 minutos a un caudal de 10 µl/min en los chips de PD-1. Los sensogramas se controlaron, se normalizaron a 100 UR en el eje Y y se compararon con los obtenidos sin pre-incubación con los Fab de anticuerpo anti-PD-L1.

Preparación de DC derivadas de monocitos inmaduros (iDC)

Las iDC se prepararon a partir de monocitos de acuerdo con protocolos previamente establecidos (Charbonnier et al., Eur J Immunol. 1999;29(8):2567-78) con modificaciones. Se obtuvieron PBMC de voluntarios individuales sanos y se aislaron por fraccionamiento sobre centrifugación en gradiente de Lymphoprep™ Axis-Shield (ABCys). Los monocitos se obtuvieron de las PBMC por selección negativa con un kit de aislamiento de monocitos para seres humanos de acuerdo con el protocolo del fabricante (Miltenyl Biotec). Los monocitos se cultivaron en placas de 6 pocillos a $2,5 \times 10^6$ células/pocillo (Falcon, BD Biosciences) en medio RPMI 1640 (Invitrogen) que contenía FBS al 10 % y se diferenciaron 5 días con 20 ng/ml de interleuquina 4 (IL-4) humana recombinante y 100 ng/ml de GM-CSF humano recombinante (ABCys French society). Las iDC eran constantemente CD14 y CD83 negativas, >92 % CD1a, >96 % CD11b, >80 % HLADR, >20 % células CD80.

Estimulación alogénica de células T CD4⁺ con iDC

Las células T CD4⁺ se aislaron de PBMC con selección negativa con el kit de aislamiento de células T CD4⁺ para seres humanos de acuerdo con el protocolo del fabricante (Miltenyl Biotec). Las células T CD4⁺ eran rutinariamente >95 % puras. Las células T CD4⁺ (2×10^5 /pocillo) se co-cultivaron con 2×10^4 iDC/pocillo por triplicado en placas de fondo plano de 96 pocillos (Falcon; BD Biosciences) en 200 μ l de RPMI 1640 (Invitrogen) al que se había suministrado FBS al 10 %, con los mAb contra PD-1, PD-L1 y PD-L2 a diversas concentraciones. Se usaron mAb de isotipo coincidente (B9.3, IgG1 de ratón y B9.4, IgG2b de ratón) como controles negativos. Los cultivos se incubaron durante 5 días.

ELISA para el análisis de citoquinas

Después se recogieron los sobrenadantes, se detectó la producción de IFN- γ e IL-10 en los sobrenadantes de cultivo por detección ELISA usando el conjunto de IFN- γ e IL-10 humana OptEIA™ de acuerdo con el protocolo del fabricante (BD Biosciences). El límite de detección fue 4 pg/ml.

Resultados

Caracterización de los mAb contra PD-1, PD-L1, PD-L2 y las proteínas de fusión PD-1 Ig, PD-L1 Ig y PD-L2 Ig

Para realizar este estudio, se prepararon mAb dirigidos contra PD-1 y sus ligandos y se usaron como Fab y proteínas de fusión solubles correspondientes al dominio extracelular de PD-1, PDL-1 y PDL-2 y la parte Fc de IgG1 humana. Se investigaron las características tanto de los fragmentos Fab de los mAb como de las proteínas de fusión por SPR usando un BiacoreT100 y citometría de flujo sobre las células transfectadas (datos no mostrados).

Por análisis cinético usando fragmentos Fab SPR de los mAb la KD variaba de 0,26 a 41 nM.

Los dos mAb contra PD-1, PD1.3 y PD1.6 no se unían de forma cruzada (datos no mostrados). Los tres mAb contra PD-L1 delimitaban dos grupos con PDL1.1 y PDL1.2 que se unen de forma cruzada por un lado mientras que el epítipo PDL1.3 es independiente de los otros dos mAb (datos no mostrados).

A continuación se investigó si PD-L1 y PD-L2 podían unirse a PD-1 acoplado a chip CM5 y a la inversa. Se observó que el acoplamiento covalente inactiva la proteína recombinante PD-L2 y evita la unión de Fc de PD-1 y el mAb de PD-L2 (datos no mostrados), lo que indica que el sitio de unión probablemente contiene NH2 libre, mientras que no tenía impacto sobre la unión de PD-L1 y PD-L2 a PD-1 inmovilizado (figura 1 y figura 4a) ni sobre la unión de PD-1 a PD-L1 inmovilizado (figura 1). Se hicieron experimentos similares usando las proteínas CD80 y CTLA-4.

Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que las tres proteínas de fusión se unían a sus receptores equivalentes y los fragmentos Fab se unían específicamente a su diana acoplada a chips de detección CM5.

PD-L1 y PD-L2 compiten de forma cruzada por la unión a PD-1

A continuación se investigó si PD-L1 y PD-L2 podían unirse juntos a PD-1 o competían de forma cruzada por la ocupación de PD-1.

Como se muestra en la figura 1, se realizó un análisis de SPR. Los chips de PD-1 se pre-incubaron con una cantidad creciente de PD-L2 (de 0 a 1000 UR de PD-L2 unido) y PD-L1 se inyectó sin retirar el PD-L2 unido. Los sensogramas muestran que PD-L1 puede competir por PD-L2 tras aumentar la ocupación de PD-L2 (figura 1 panel A). En otra configuración experimental, se pre-incubaron proteínas recombinantes de PD-1 a 100 μ g/ml con concentraciones crecientes de PD-L2 (de 0 a 60 μ g/ml) y se inyectaron los complejos en el chip de PD-L1. La pre-incubación de PD-L2 evitaba la unión de PD-1 a PD-L1 de una manera dependiente de la dosis (figura 1, panel B).

Estos datos demuestran que ambos ligandos evitan la unión del otro ligando de PD-1 y que, por consiguiente, la unión previa de PD-L1 o de PD-L2 a PD-1 evitaría la interacción con el otro ligando de una manera dependiente de la dosis. Se obtuvieron los mismos resultados por citometría de flujo sobre células transfectadas (datos no mostrados). PD-L1 humano interactúa con CD80 humano (figura 1C). Para analizar una posible interferencia de la unión de PD-L1 a CD80 en presencia de PD-1, se realizaron experimentos de pre-incubación y mostraron que la pre-incubación de PD-L1 con PD-1 evita la interacción PD-L1:CD80 (figura 1C). A continuación se ensayó la interacción de CD80 con CTLA-4 y PD-L1. Como ya se ha informado, hay una fuerte unión de CD80 a CTLA-4 que se evita por la propia CTLA-4 Ig pero también el mAb contra CD80 2D10.4 (figura 1E). Finalmente, se ensayó la interacción de CTLA-4 y PD-L1 con CD80 (figura 1D). La unión previa de CTLA-4 a CD80 no evita la unión de PD-L1. El mAb contra CD80 2D10.4 no evitaba la unión de PD-L1 a CD80, mientras que anulaba completamente la interacción de CTLA-4-CD80. Estos experimentos demuestran que CTLA-4 y PD-L1 pueden unirse ambos al mismo tiempo con PD-L1 humano.

El mAb PD1.3 evita la unión tanto de PD-L1 como de PD-L2 a PD-1

En una configuración adicional de experimentos, se investigó si los mAb contra PD-1 podían evitar de una forma inversa la unión tanto de PD-L1 como de PD-L2. Como se muestra en la figura 2, los paneles B y C, anti-PD1.3 pero no PD1.6 inhibía completamente la unión tanto de PD-L1 (figura 2B y 2C, paneles superiores) como la de PD-L2 (figura 2B y 2C, paneles inferiores) a PD-1. De una manera recíproca, el mAb PD1.3 bloqueaba de una manera dependiente de la dosis la unión de PD-1 Fc a chips de PD-L1 (datos no mostrados). Por análisis FACS, el mAb PD1.3 puede inhibir la unión de PD-1 Fc a células que expresan PD-L1 y PD-L2 (figura 2C).

Los mAb contra PD-1 pueden modular la activación de células T por células dendríticas inmaduras alogénicas

A continuación se investigaron las capacidades funcionales de los mAb dirigidos contra PD-1. Se ensayó su capacidad de inducir la activación de células T alogénicas contra una activación subóptima, concretamente monocitos inmaduros derivados de células dendríticas. El mAb que inhibe la interacción del ligando de PD-1, PD1.3, pero no PD1.3 inhibidor, era capaz de potenciar la activación de células T CD4 como se indica por una producción aumentada de IFN- γ e IL10 (figura 2, paneles D) y la proliferación de células T (datos no mostrados).

En conjunto, estos datos demuestran que los dos ligandos compiten por la unión a PD-1 y, a la inversa, que un mAb anti-PD-1 inhibidor puede evitar fácilmente la unión de los ligandos de PD-1 y, como consecuencia, puede potenciar la activación de células T.

PD-L1 y PD-L2 difieren en sus mecanismos moleculares de unión a PD-1

A continuación se investigaron los mecanismos de la unión de PD-L1 y de PD-L2 a PD-1. Para concretar las diferentes etapas de esta interacción, se realizó un estudio cinético cuidadoso. Se realizaron ensayos de unión cinética para determinar la constante de disociación en equilibrio entre PD-1 y las proteínas de fusión de PD-L1 y PD-L2. Primero se analizaron los datos de unión usando el modelo de Langmuir 1:1. Para PD-L2/PD-1 el ajuste fue muy bueno y produjo una KD de 9,97 nM. Aunque ambos analitos recombinantes eran bivalentes, el modelo de Langmuir se ajustaba muy bien a los datos, lo que indica que los dos sitios de unión de cada molécula probablemente interactúen al mismo tiempo. Por tanto, el valor de KD muy probablemente representa un valor de avidéz.

Para PD-L1/PD-1, así como PD-L1/CD80, el ajuste usando el modelo de Langmuir fue muy malo e inapropiado.

De hecho, como se muestra en la figura 3, panel A, los dos ligandos interactuaban con PD-1 con características distintas. PD-L1 se asociaba rápidamente y se disociaba también muy rápido. Por el contrario, la unión de PD-L2 se retardaba con una pendiente diferente y era más robusta. Los valores residuales diferían mucho. Por tanto, se observaron dos fenómenos distintos en la fase de disociación de PD-L1 y PD-1. Una fase prematura, durante la que PD-L1 se disociaba rápidamente de PD-1 al inicio de la disociación, estaba seguida por una fase posterior caracterizada por una tasa de disociación lenta con señales que parecen más estables, mientras que la disociación de PD-L2 y PD-1 era más homogénea. A partir de los diferentes modelos ensayados para el ajuste, el "modelo de modificación conformacional" dio el ajuste mejor y más fiable y produjo una constante de disociación aparente (KD#) de 10,7 y 56,5 nM sobre los chips de PD-1.

Puede predecirse a partir del "modelo de modificación conformacional" que aumentar el tiempo de inyección también aumentaría la estabilidad de la unión. Para ensayar esta hipótesis entonces se comparó la unión de PD-L1 y PD-L2 a chips de PD-1 siguiendo dos configuraciones, se inyectaron 10 μ g/ml de las proteínas de fusión PD-L1 o PD-L2 durante 7 o 1 minuto, respectivamente. Los sensogramas representados en la figura 3B demuestran claramente que el tiempo de contacto influye en la estabilidad de la unión de PD-L1 al chip de PD-1. La disociación de PD-L1 del chip de PD-1 fue más lenta cuando el tiempo de inyección era más largo.

Como control, la cinética de disociación de PD-L2 no se veía afectada por el aumento del tiempo de inyección (figura 3B).

En conjunto, estos datos demuestran diferencias sorprendentes en los mecanismos de interacción de PD-L1 y de PD-L2 con PD-1. Los datos obtenidos con PD-L1 se ajustan a un modelo donde se necesitará un cambio de conformación para su unión eficaz con su receptor.

Finalmente se analizó si este modelo de cambio conformacional estaba restringido a la interacción de PD-L1:PD-1 y, por tanto, se debía al ligando o se observaba con otro ligando PD-L1 como CD80. Como se muestra en la figura 3A, la unión de PD-L1 a CD80 también estaba asociada con el modelo de cambio conformacional. En conjunto, estos datos indican que PD-L1 y PD-L2 difieren en su unión a PD-1. Aunque se unen a sus ligandos, concretamente a PD-1 y a CD80 con mecanismos similares de asociación y disociación.

Los mAb contra PD-L1 no bloqueantes aumentan la unión de PD-L1 a PD-1

También se ha ensayado la capacidad de los mAb contra PD-L1 y PD-L2 de evitar la interacción de PD-L1 y PD-L2 con PD-1. Los mAb anti-PD-L2 y anti-PDL1.3 evitaban la interacción PD-1/PD-L2 y PD-L1 respectivamente (datos no mostrados). Sin embargo, anti-PDL1.1 y anti-PDL1.2 no inhibían la interacción PD-L1/PD-1 (datos no mostrados).

Como la unión de PD-L1 a PD-1 podía inducir una modificación conformacional de PD-L1, se razonó que estos dos mAb que no impiden la unión de PD-1/PD-L1 podrían afectar a otras regiones de PD-L1 que podrían ser críticas para la interacción ligando-receptor. Por tanto, también se investigó si los anticuerpos anti-PD-L1 que no bloquean la unión a PD-1 podrían influir en este fenómeno. Para hacerlo, se incubaron proteínas PD-L1 Ig con una concentración saturante de Fab de anticuerpo PDL1.1 y PDL1.2 y se inyectaron en el chip de PD-1 (figura 4A). Se observó que la preincubación con ambos anticuerpos anti-PD-L1 no bloqueantes modifica claramente la disociación de las proteínas PD-L1 Ig del chip de PD-1. La disociación de PD-L1 es más lenta cuando PD-L1 está unido a los Fab PDL1.1 o PDL1.2. La unión de los Fab PDL1.1 o PDL1.2 a PD-L1 parece aumentar la estabilidad de la interacción de PD-L1 y PD-1, que puede ser influyendo en la modificación conformacional de PD-L1. Estos datos parecen de acuerdo con el "modelo de modificación conformacional" que era preferido para elegir el ajuste de la unión de PD-L1 a PD-1. Sin embargo, el hecho de que el fenómeno de transición conformacional fuera observable usando Biacore indica que la modificación del estado de PD-L1 no es un fenómeno rápido. Teniendo en cuenta estas consideraciones, a continuación se investigó si la modificación conformacional podría observarse en moléculas PD-L1 nativas expresadas en la superficie celular.

Por tanto, se analizó el efecto estabilizante de los anticuerpos no bloqueantes PDL1.1 y PDL1.2 sobre la unión de PD-L1 a PD-1 a nivel celular. Se incubaron células COS que expresan PD-L1 durante 5 o 30 minutos con los tres Fab anti-PD-L1 diferentes. Entonces se ensayó la unión de la proteína PD-1 Ig por análisis FACS. La preincubación del Fab PDL1.1 indujo un aumento de la MFI debido a la unión de la proteína PD-1 (figura 4B). Este aumento se producía tan pronto como en 5 minutos después de la inyección del Fab y se potenció más después de 30 minutos. Este resultado estaba de acuerdo con los datos del análisis SPR (figura 4A). Como se muestra en la figura 4B, ambos anticuerpos no bloqueantes PDL1.1 y PDL1.2 inducen un aumento de la unión de PD-1. En el control, el Fab PDL1.3 bloqueante alteraba esta unión de PD-1 (figura 4B). Se obtuvieron los mismos resultados usando DC inmaduras que expresan PD-L1 (datos no mostrados). Tomados en conjunto, los mAb no bloqueantes contra PD-L1 no son neutros, sino que, de hecho, promueven la unión de PD-L1 a PD-1.

Referencias

En toda esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE

<120> Anticuerpos contra PD-1 y anticuerpos contra PD-L1 y usos de los mismos

<130> BEP080163

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 1
atgcagatcc cacagggccc ctggcc 26

<210> 2

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

ES 2 629 337 T3

<400> 2
tcagaggggc caagagcagt gtccatc 27

5 <210> 3
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Cebador

<400> 3
gcgaattcat gcagatccca caggcgccc 29

15 <210> 4
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Cebador

<400>4
cttcccgtct tcacgggagc cggctg 26

25 <210> 5
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Cebador

<400> 5
atgaggatat ttgctgtctt tatattc 27

35 <210> 6
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> Cebador

45 <400> 6
ttacgtctcc tccaaatgtg t 21

50 <210> 7
<211> 31
<212> ADN
<213> Artificial

55 <220>
<223> Cebador

<400> 7
gcgaattcat gaggatatt gctgtcttta t 31

60 <210> 8
<211> 31
<212> ADN
<213> Artificial

65 <220>
<223> Cebador

ES 2 629 337 T3

<400> 8
 ccggtacctt ctgggatgac caattcagct g 31

5 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 9
 acgccaaatt ttgagtgctt 20

15 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador

<400> 10
 tgaaaagtgc aaatggcaag 20

25 <210> 11
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Cebador

<400> 11
 gcgaattcat gatcttctc ctgctaagt tg 32

35 <210> 12
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Cebador

45 <400> 12
 ccggtaccgt caatgctggc caaagtaag 29

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo contra PD-L1 que se puede obtener del hibridoma accesible con el número de depósito CNCM I-4080 o I-4081.
2. Un anticuerpo contra PD-L1 de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en un método para el tratamiento del organismo humano o animal por terapia.
- 10 3. Un anticuerpo contra PD-L1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, el rechazo de trasplantes o una enfermedad de injerto contra hospedador.
4. Una línea celular de hibridoma seleccionada del grupo que consiste en CNCM I-4080 y CNCM I-4081.

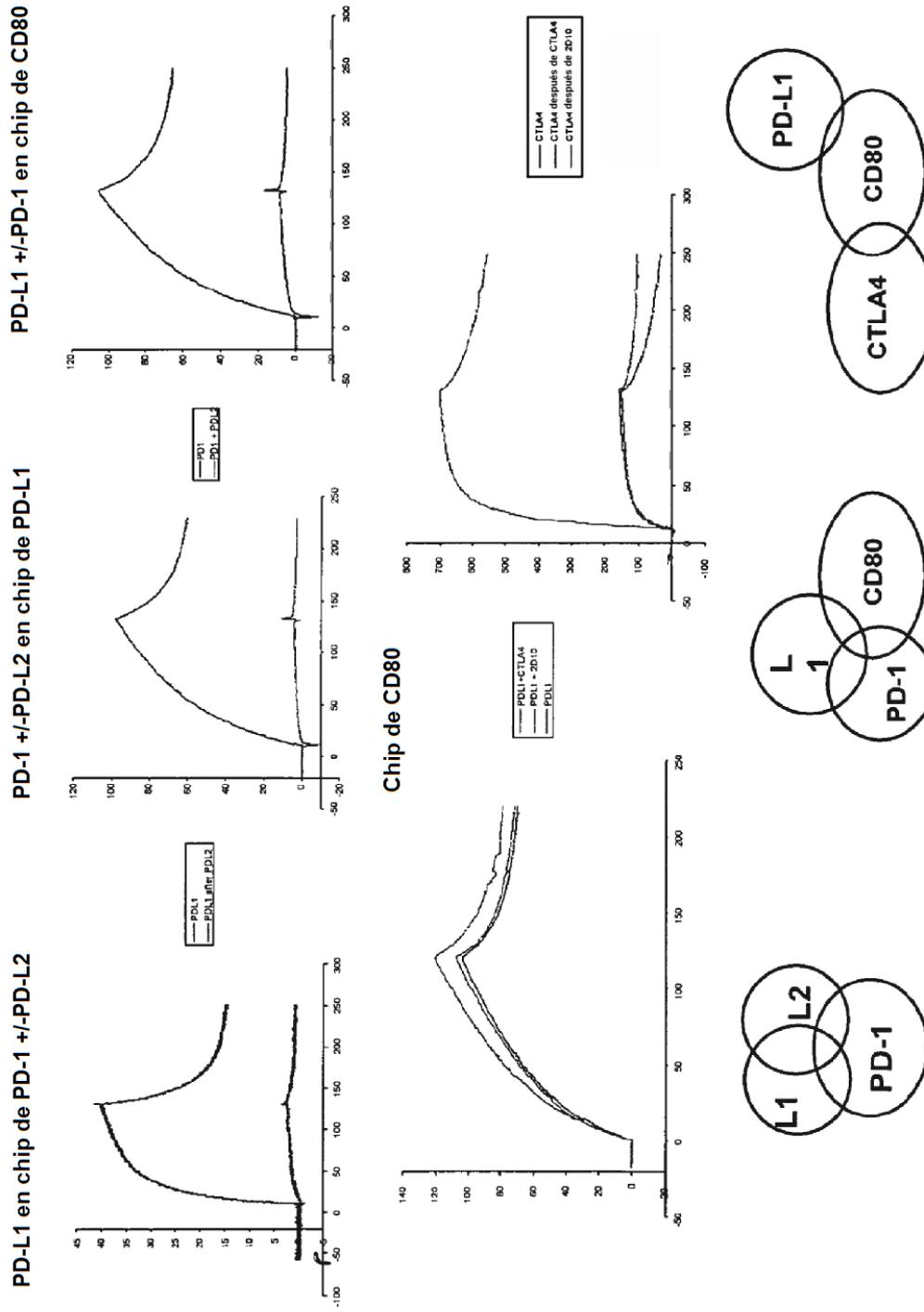


Figura 1

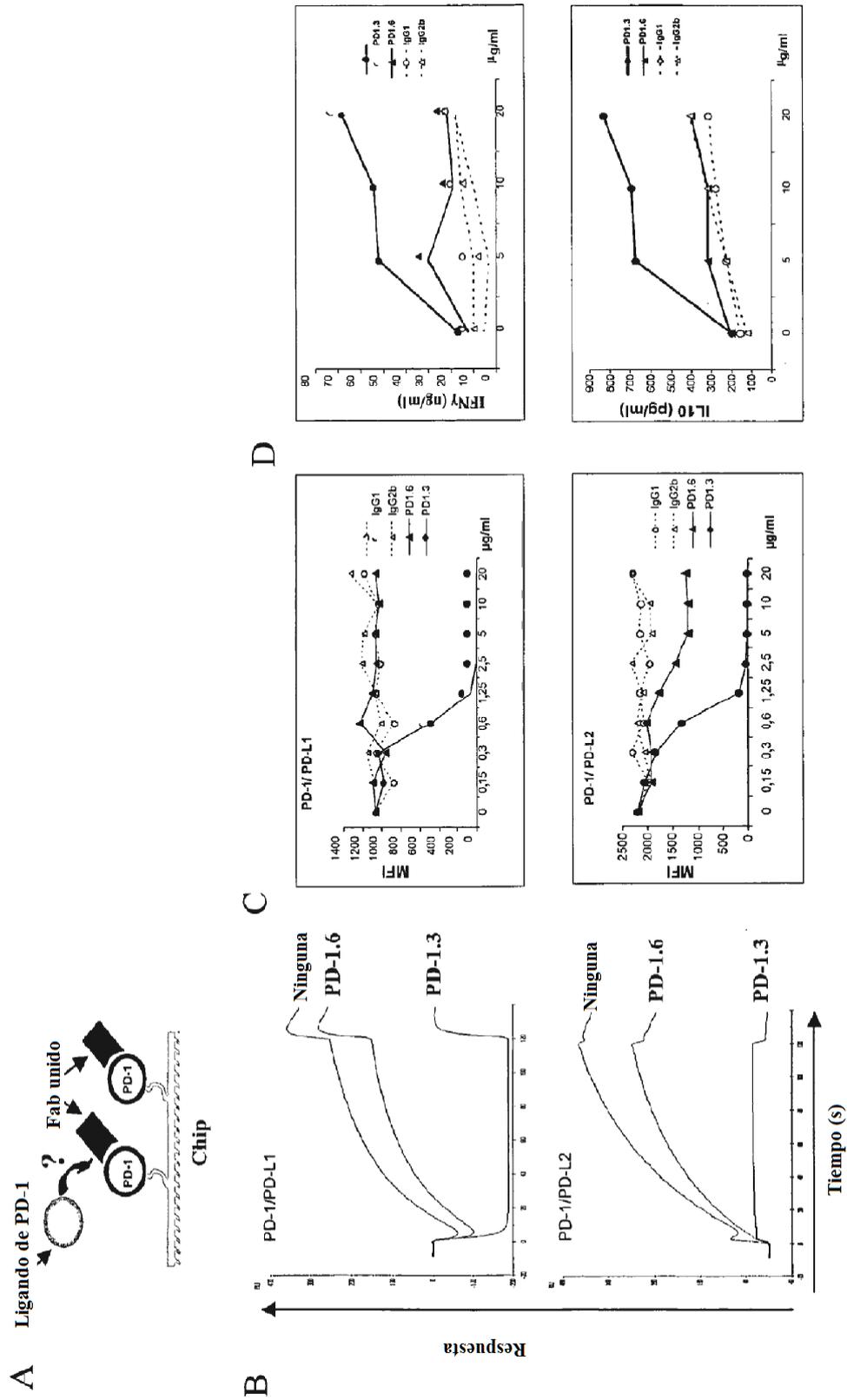


Figura 2

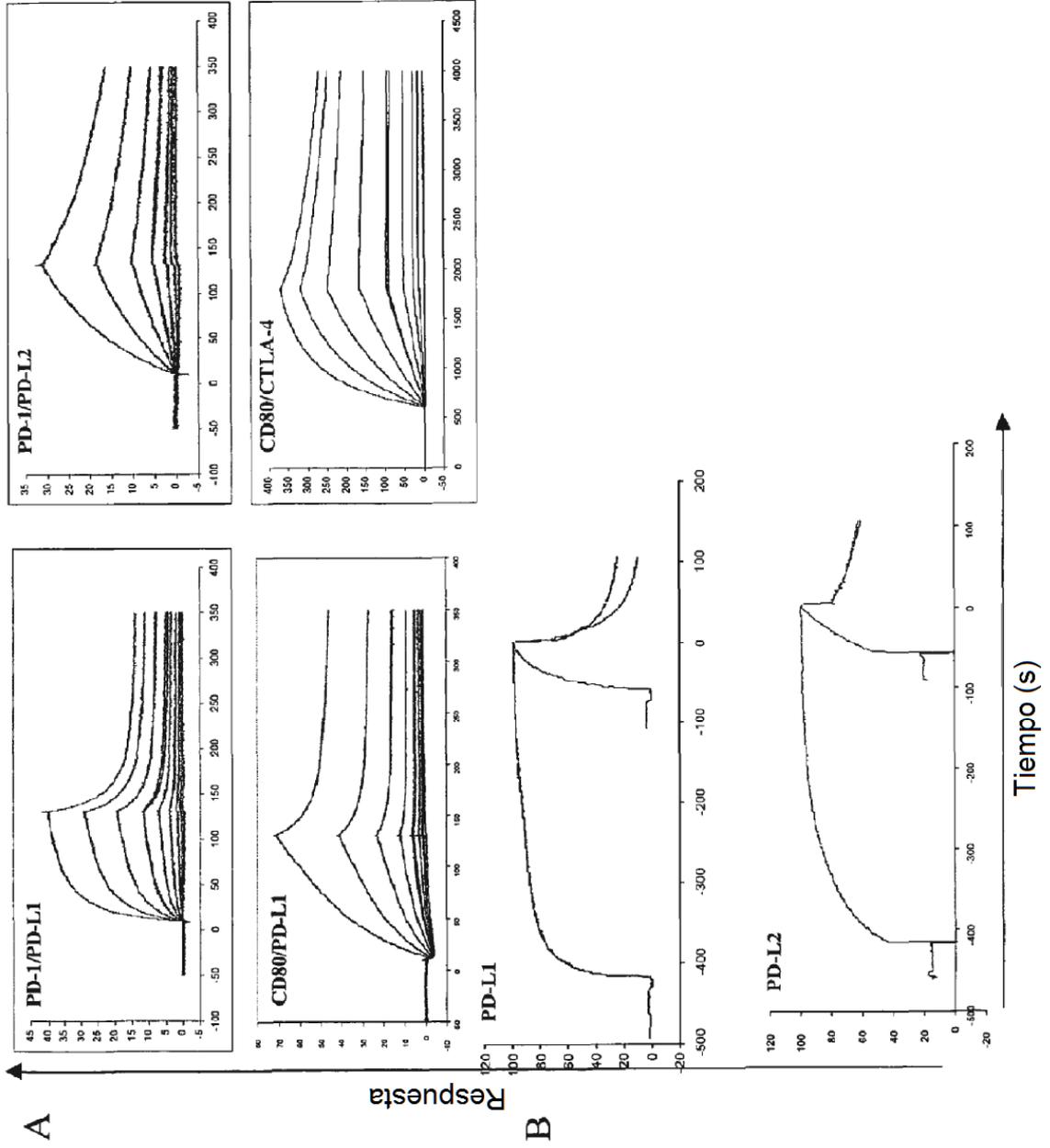


Figura 3

Proteína inmovilizada	Análito	ka (x10 ⁴ M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (x10 ⁻⁴ s ⁻¹)	ka2 (x10 ⁻⁴ s ⁻¹)	kd2 (x10 ⁻⁴ s ⁻¹)	K (x10 ⁷ M ⁻¹)	KD (nM)	KD# = 1/K (nM)
PD-1	PD-L2	8,44	11				13	
PD-1	PD-L1	11	192	10,8	3,08	2,58		38,8
PD-L1	PD-1	11,3	192	11,3	5,65	1,77		56,5

ka: constante de velocidad de asociación. kd: constante de velocidad de disociación. ka2: constante de velocidad directa para el cambio de estado. kd2: constante de velocidad inversa para el cambio de estado. KD=kd/ka: constante de disociación. K=(ka/kd)/(1+ka2/kd2): constante de afinidad aparente. KD# = 1/K: contante de disociación aparente

Tabla 3/ Fig. 6

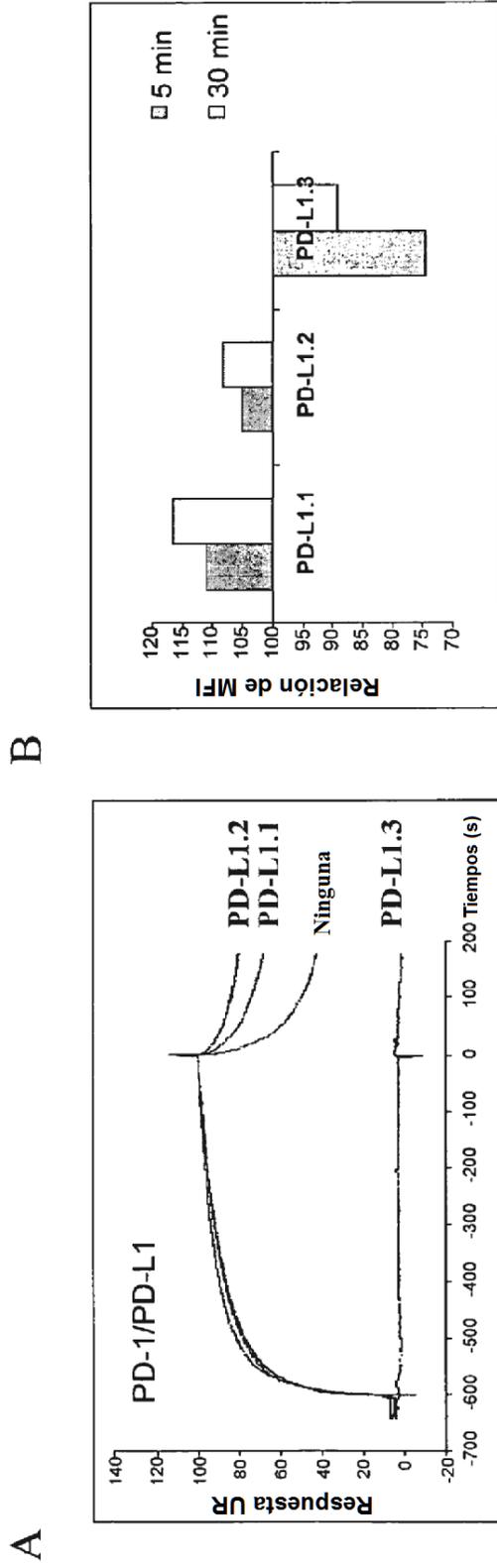


Figura 4

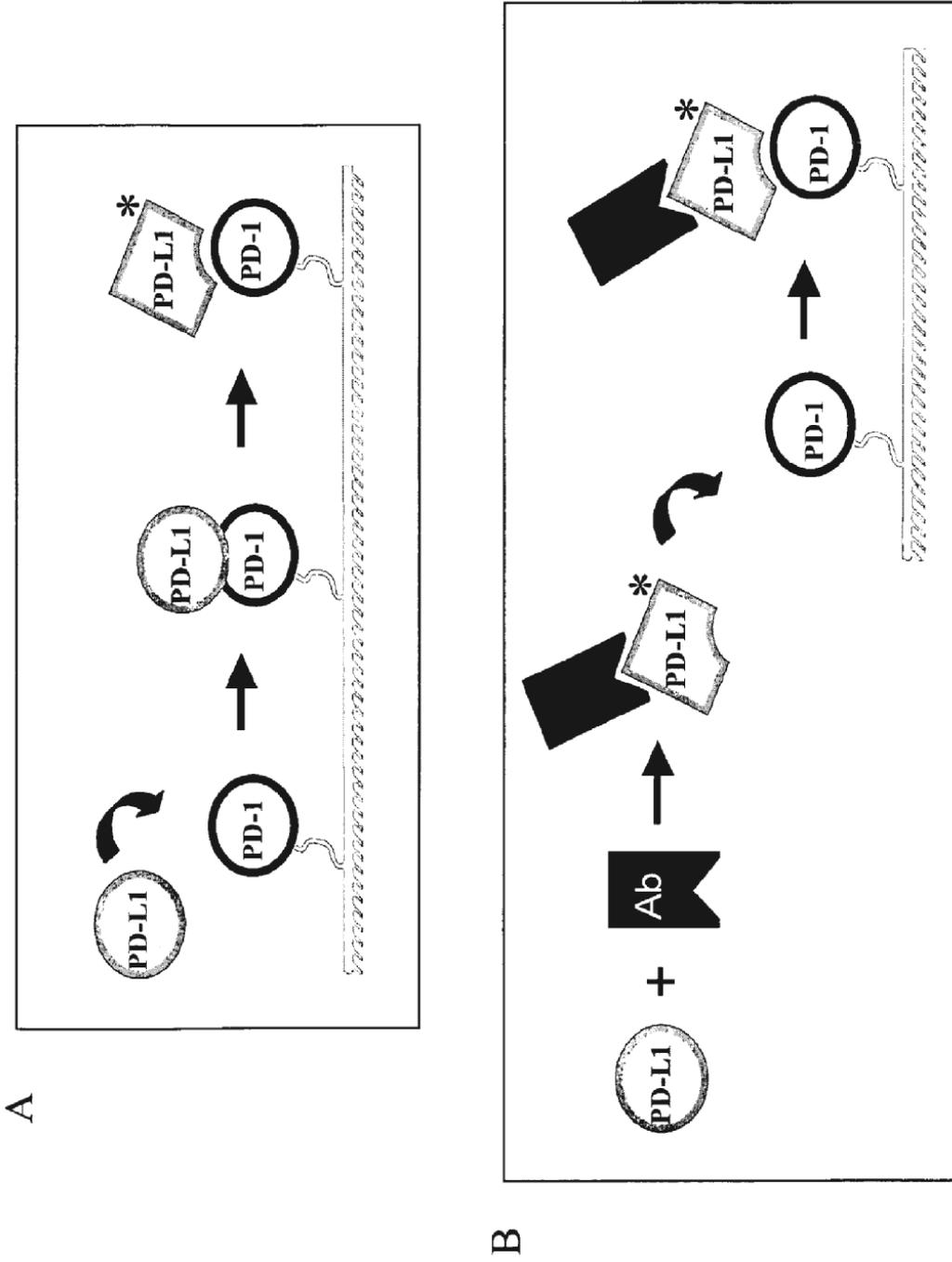


Figura 5