(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 669 310**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.04.2012** **PCT/US2012/034223**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2012** **WO12145493**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2012** **E 12774724 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018** **EP 2699264**

(54) Título: **Anticuerpos y otras moléculas que se unen con B7-H1 y PD-1**

(30) Prioridad:

20.04.2011 US 201161477414 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.05.2018

(73) Titular/es:

MEDIMMUNE, LLC (100.0%)
One MedImmune Way
Gaithersburg, MD 20878, US

(72) Inventor/es:

LANGERMANN, SOLOMON;
LIU, LINDA;
MARSHALL, SHANNON y
YAO, SHENG

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 669 310 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 y otras moléculas que se unen con B7-H1 y PD-1

Referencia al listado de secuencias:

Esta solicitud incluye uno o más Listados de secuencias conforme a 37 C.F.R. 1.821 y siguientes, que se desvelan tanto en papel como en medio leíble por ordenador y cuyas divulgaciones en papel y leíbles por ordenador se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

Antecedentes

Campo

La presente divulgación se refiere a anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígeno y a otras moléculas que son capaces de unirse inmunoespecíficamente a B7-H1 o PD-1. En algunos casos dichas moléculas son capaces adicionalmente de modular la capacidad de B7-H1 o B7-DC para unirse con PD-1 o son capaces de afectar a la actividad de señalización del B7-H1 o PD-1. La divulgación se refiere adicionalmente a los usos de dichas moléculas en el diagnóstico y el tratamiento de cáncer y otras enfermedades.

Descripción de la técnica relacionada:

A. Respuestas inmunitarias mediadas por células

El sistema inmunitario de seres humanos y otros mamíferos es responsable de proporcionar protección contra infección y enfermedad. Dicha protección es proporcionada tanto por una respuesta inmunitaria humoral como por una respuesta inmunitaria mediada por células. La respuesta humoral da como resultado la producción de anticuerpos y otras biomoléculas que son capaces de reconocer y neutralizar dianas extrañas (antígenos). Por el contrario, la respuesta inmunitaria mediada por células implica la activación de macrófagos, linfocitos citolíticos naturales (NK) y linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno por células T, y la liberación de diversas citocinas en respuesta al reconocimiento de un antígeno (Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules", Immunolog. Res. 28(1):39-48).

La capacidad de los linfocitos T para mediar de forma óptima en una respuesta inmunitaria contra un antígeno requiere dos interacciones de señalización distintas (Viglietta, V. et al. (2007) "Modulating CoStimulation", Neurotherapeutics 4:666-675; Korman, A.J. et al. (2007) "Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy," Adv. Immunol. 90:297-339). En primer lugar, el antígeno que se ha dispuesto en la superficie de células presentadoras de antígenos (APC) debe presentarse a un linfocito T $CD4^+$ no expuesto previamente específico de antígeno. Dicha presentación suministra una señal mediante el receptor de linfocitos T (TCR) que dirige al linfocito T para que inicie una respuesta inmunitaria que será específica del antígeno presentado. En segundo lugar, una serie de señales coestimulantes e inhibidoras, mediadas mediante interacciones entre la APC y moléculas de superficie de linfocitos T definidas, desencadena en primer lugar la activación y proliferación de los linfocitos T y en última instancia su inhibición. Por lo tanto, la primera señal confiere especificidad a la respuesta inmunitaria mientras que la segunda señal sirve para determinar la naturaleza, magnitud y duración de la respuesta.

El sistema inmunitario está estrechamente controlado por ligandos y receptores coestimulantes y coinhibidores. Estas moléculas proporcionan la segunda señal para activación de linfocitos T y proporcionan una red equilibrada de señales positivas y negativas para maximizar respuestas inmunitarias contra infección limitando al mismo tiempo la inmunidad propia (Wang, L. et al. (7 de marzo de 2011) "VISTA, A Novel Mouse Ig Superfamily Ligand That Negatively Regulates T Cell Responses," J. Exp. Med. 10.1084/jem.20100619:1-16; Lepenies, B. et al. (2008) "The Role Of Negative Costimulators During Parasitic Infections," Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets 8:279-288). Es particularmente importante la unión entre los ligandos B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86) de la célula presentadora de antígeno y los receptores CD28 y CTLA-4 del linfocito T $CD4^+$ (Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily," Nature Rev. Immunol. 2:116-126; Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules," Immunolog. Res. 28(1):39-48; Lindley, P.S. et al. (2009) "The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation," Immunol. Rev. 229:307-321). La unión de B7.1 o de B7.2 con CD28 estimula la activación de linfocitos T; la unión de B7.1 o B7.2 con CTLA-4 inhibe dicha activación (Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules," Immunolog. Res. 28(1):39-48; Lindley, P.S. et al. (2009) "The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation," Immunol. Rev. 229:307-321; Greenwald, R.J. et al. (2005) "The B7 Family Revisited," Ann. Rev. Immunol. 23:515-548). CD28 se expresa de forma constitutiva en la superficie de linfocitos T (Gross, J., et al. (1992) "Identification And Distribution Of The Costimulatory Receptor CD28 In The Mouse," J. Immunol. 149:380-388), mientras que la expresión de CTLA4 se regula de forma positiva rápidamente después de la activación de linfocitos T (Linsley, P. et al. (1996) "Intracellular Trafficking Of CTLA4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement," Immunity 4:535-543). Ya que CTLA4 es el receptor de mayor afinidad (Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily," Nature Rev. Immunol. 2:116-126), la unión

inicia en primer lugar la proliferación de linfocitos T (mediante CD28) y después la inhibe (mediante expresión naciente de CTLA4), amortiguando de este modo el efecto cuando ya no se necesita proliferación.

Investigaciones adicionales acerca de los ligandos del receptor CD28 han conducido a la identificación y caracterización de un conjunto de moléculas B7 relacionadas (la "superfamilia B7") (Coyle, A.J. et al. (2001) "The Expanding B7 Superfamily: Increasing Complexity In Costimulatory Signals Regulating T Cell Function," Nature Immunol. 2(3):203-209; Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily," Nature Rev. Immunol. 2:116-126; Greenwald, R.J. et al. (2005) "The B7 Family Revisited," Ann. Rev. Immunol. 23:515-548; Collins, M. et al. (2005) "The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands," Genome Biol. 6:223.1-223.7; Loke, P. et al. (2004) "Emerging Mechanisms Of Immune Regulation: The Extended B7 Family And Regulator T Cells." Arthritis Res. Ther. 6:208-214; Korman, A.J. et al. (2007) "Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy," Adv. Immunol. 90:297-339; Flies, D.B. et al. (2007) "The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity," J. Immunother. 30(3):251-260; Agarwal, A. et al. (2008) "The Role Of Positive Costimulatory Molecules In Transplantation And Tolerance," Curr. Opin. Organ Transplant. 13:366-372; Lenschow, D.J. et al. (1996) "CD28/B7 System of T Cell Costimulation," Ann. Rev. Immunol. 14:233-258; Wang, S. et al. (2004) "Co-Signaling Molecules Of The B7-CD28 Family In Positive And Negative Regulation Of T Lymphocyte Responses," Microbes Infect. 6:759-766). En la actualidad hay varios miembros conocidos de la familia: B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), el ligando coestimulante inducible (ICOS-L), el ligando de muerte programada 1 (PD-L1; B7-H1), el ligando de muerte programada 2 (PD-L2; B7-DC), B7-H3, B7-H4 y B7-H6 (Collins, M. et al. (2005) "The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands," Genome Biol. 6:223.1-223.7; Flajnik, M.F. et al. (2012) "Evolution Of The B7 Family: Co-Evolution Of B7H6 And Nkp30, Identification Of A New B7 Family Member, B7H7, And Of B7's Historical Relationship With The MHC," Immunogenetics epub doi.org/10.1007/s00251-012-0616-2).

B. Interacciones B7-H1 / PD1

1. B7-H1

B7-H1 (PD-L1, CD274) es un miembro particularmente significativo de la superfamilia B7 ya que está implicado de forma clave en la configuración de la respuesta inmunitaria a los tumores (Flies, D.B. et al. (2007) "The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity," J. Immunother. 30(3):251-260; patentes de los Estados Unidos N.º 6.803.192; 7.794.710; publicaciones de solicitud de patente de los Estados Unidos N.º 2005/0059051; 2009/0055944; 2009/0274666; 2009/0313687; publicación de PCT N.º WO 01/39722; WO 02/086083). B7-H1 es una proteína transmembrana de tipo 1 de aproximadamente 33 kDa. Se ha especulado que desempeña un papel importante en la supresión del sistema inmunitario durante acontecimientos particulares tales como el embarazo, aloinjertos tisulares, enfermedad autoinmunitaria y otras patologías tales como hepatitis.

B7-H1 se expresa ampliamente en diferentes tejidos humanos y de ratón, tales como corazón, placenta, músculo, hígado fetal, bazo, ganglios linfáticos y timo para ambas especies así como hígado, pulmón y riñón solamente en ratón (Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity," Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298). En los seres humanos, se ha descubierto expresión de proteína B7-H1 en células endoteliales humanas (Chen, Y. et al. (2005) "Expression of B7-H1 in Inflammatory Renal Tubular Epithelial Cells," Nephron. Exp. Nephrol. 102:e81-e92; de Haij, S. et al. (2005) "Renal Tubular Epithelial Cells Modulate T-Cell Responses Via ICOS-L And B7-H1" Kidney Int. 68:2091-2102; Mazanet, M.M. et al. (2002) "B7-H1 Is Expressed By Human Endothelial Cells And Suppresses T Cell Cytokine Synthesis," J. Immunol. 169:3581-3588), miocardio (Brown, J.A. et al. (2003) "Blockade Of Programmed Death-1 Ligands On Dendritic Cells Enhances T Cell Activation And Cytokine Production," J. Immunol. 170:1257-1266), sincitiotrofoblastos (Petroff, M.G. et al. (2002) "B7 Family Molecules: Novel Immunomodulators At The Maternal-Fetal Interface," Placenta 23:S95-S101), macrófagos residentes de algunos tejidos o en macrófagos que se han activado con interferón (IFN)-γ o factor de necrosis tumoral (TNF)-α (Latchman, Y. et al. (2001) "PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T Cell Activation," Nat. Immunol 2:261-268) y en tumores (Dong, H. (2003) "B7-H1 Pathway And Its Role In The Evasion Of Tumor Immunity," J. Mol. Med. 81:281-287). En el ratón, se encuentra expresión de proteína B7-H1 en endotelio cardíaco, células de islotes del páncreas, intestino delgado y placenta (Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity," Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298).

2. PD-1

Muerte programada 1 ("PD-1") es un receptor de B7-H1 y B7-DC. PD-1 es un miembro de proteína de membrana de tipo I de aproximadamente 31 kD de la familia de CD28/CTLA4 extendida de reguladores de linfocitos T (Ishida, Y. et al. (1992) "Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death," EMBO J. 11:3887-3895; publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos N.º 2007/0202100; 2008/0311117; 2009/00110667; patentes de los Estados Unidos N.º 6.808.710; 7.101.550; 7.488.802; 7.635.757; 7.722.868; publicación de PCT N.º WO 01/14557). En comparación con CTLA4, PD-1 regula de forma negativa más ampliamente las respuestas inmunitarias.

PD-1 se expresa en linfocitos T activados, linfocitos B y monocitos (Agata, Y. et al. (1996) "Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes," Int. Immunol. 8(5):765-772; Yamazaki, T. et al.

(2002) "Expression Of Programmed Death 1 Ligands By Murine T Cells And APC," J. Immunol. 169:5538-5545) y a niveles bajos en linfocitos T citolíticos naturales (NK) (Nishimura, H. et al. (2000) "Facilitation Of Beta Selection And Modification Of Positive Selection In The Thymus Of PD-1-Deficient Mice," J. Exp. Med. 191:891-898; Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity," Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298).

La región extracelular de PD-1 consiste en un único dominio de inmunoglobulina (Ig)V con 23 % de identidad con el dominio equivalente en CTLA4 (Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity," Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298). El dominio IgV extracelular está seguido de una región transmembrana y una cola intracelular. La cola intracelular contiene dos sitios de fosforilación localizados en un motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptor y un motivo de cambio basado en tirosina inmunorreceptor, lo que sugiere que PD-1 regula negativamente las señales de TCR (Ishida, Y. et al. (1992) "Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Super family, Upon Programmed Cell Death," EMBO J. 11:3887-3895; Blank, C. et al. (Epub 29 dic 2006) "Contribution Of The PD-L1/PD-1 Pathway To T-Cell Exhaustion: An Update On Implications For Chronic Infections And Tumor Evasion Cancer," Immunol. Immunother. 56(5):739-745).

Se han notificado anticuerpos capaces de unirse de forma inmunoespecífica a PD-1 murina (véase, por ejemplo, Agata, T. et al. (1996) "Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes," Int. Immunol. 8(5):765-772).

C. Las interacciones de B7-H1 y PD-1

Se ha descubierto que la interacción de B7-H1 y PD-1 proporciona una señal coestimulante negativa crucial para linfocitos T y B (Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity," Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298) y actúa como un inductor de muerte celular (Ishida, Y. et al. (1992) "Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death," EMBO J. 11:3887-3895; Subudhi, S.K. et al. (2005) "The Balance Of Immune Responses: Costimulation Verse Coinhibition," J. Molec. Med. 83:193-202).

La interacción entre concentraciones bajas del receptor PD-1 y el ligando B7-H1 da como resultado la transmisión de una señal inhibidora que inhibe fuertemente la proliferación de linfocitos T $CD8^+$ específicos de antígeno; a mayores concentraciones las interacciones con PD-1 no inhiben la proliferación de linfocitos T pero reducen notablemente la producción de múltiples citocinas (Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily," Nature Rev. Immunol. 2:116-126). Se ha descubierto que la proliferación de linfocitos T y la producción de citocinas por linfocitos T CD4 y CD8 tanto en reposo como previamente activados, e incluso linfocitos T no expuestos previamente de sangre del cordón umbilical, es inhibida por proteínas de fusión B7-H1-Fc solubles (Freeman, G.J. et al. (2000) "Engagement Of The PD-1 Immunoinhibitory Receptor By A Novel B7 Family Member Leads To Negative Regulation Of Lymphocyte Activation," J. Exp. Med. 192:1-9; Latchman, Y. et al. (2001) "PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T Cell Activation," Nature Immunol. 2:261-268; Carter, L. et al. (2002) "PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2," Eur. J. Immunol. 32(3):634-643; Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily," Nature Rev. Immunol. 2:116-126).

Las interacciones B7-H1 - PD-1 conducen a detención del ciclo celular en G0-G1 pero no aumentan la muerte celular (Latchman, Y. et al. (2001) "PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T Cell Activation," Nature Immunol. 2:261-268; Carter, L. et al. (2002) "PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2," Eur. J. Immunol. 32(3):634-643). Por lo tanto, la formación de complejo B7-H1 - PD-1 tiene la capacidad de antagonizar la señal B7 - CD28 cuando la estimulación antigénica es débil o limitante y desempeña un papel clave en la regulación negativa de respuestas de linfocitos T.

La transducción de señal mediada por B7-H1 y PD-1 es compleja. Ambas moléculas se unen adicionalmente a otras proteínas. B7-H1 es capaz de unirse a B7-1 (CD80) (Butte, M.J. et al. (2008) "Interaction of PD-L1 and B7-1," Molecular Immunol. 45:3567-3572); PD-1 es capaz de unirse a B7-DC (PD-L2) (Lázár-Molnár, E. et al. (2008) "Crystal Structure Of The Complex Between Programmed Death-1 (PD-1) And Its Ligand PD-L2," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 105(30):10483-10488). B7-1 interacciona con CD28 para suministrar una señal coestimulante para activación de linfocitos T que es importante en los estadios tempranos de la respuesta inmunitaria (Elloso, M.M. et al. (1999) "Expression and Contribution of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) in the Early Immune Response to Leishmania major Infection," J. Immunol. 162:6708-6715). B7-DC es un estimulante fuerte de linfocitos T, que potencia la proliferación de linfocitos T y la producción de IFN-γ. Sin embargo, también muestra un efecto inhibidor en la respuesta inmunitaria mediante su interacción con PD-1 (Ishiwata, K. et al. (epub 10 de enero de 2010) "Costimulator Responses Induced by Nippostrongylus brasiliensis," J. Immunol. 184:2086-2094). Parece que los microbios y tumores han aprovechado PD-1 y B7-H1 para evitar la erradicación por el sistema inmunitario. Se ha propuesto que diferencias en las afinidades de unión por los diversos receptores y ligandos que interaccionan con PD-1 y B7-H1 proporcionan distintos resultados funcionales de bloqueo de PD-1 y B7-H1 en modelos de enfermedad (Butte, M.J. et al. (2008) "Interaction of PD-L1 and B7-1," Molecular Immunol. 45:3567-3572). También se ha implicado que la ruta de PD-1 desempeña un papel clave en la alteración de la función inmunitaria durante la infección crónica ("agotamiento de linfocitos T") y un bloqueo de la función de PD-1 es capaz de restaurar muchas funciones de linfocitos T (Rodriquez-Garcia, M. et al. (19 de noviembre de 2010) "Expression Of PD-L1 And PD-L2

On Human Macrophages Is Up-Regulated By HIV-1 And Differentially Modulates By IL-10," J. Leukocyte Biol. 89: doi:10.1189/jlb.0610327:1-9).

El papel de B7-H1 y PD-1 en la inhibición de la activación y proliferación de linfocitos T ha sugerido que estas biomoléculas podrían actuar como dianas terapéuticas para tratamientos de inflamación y cáncer. Se ha propuesto el uso de anticuerpos anti PD1 para tratar infecciones y tumores y modular positivamente una respuesta inmunitaria adaptativa (véase, publicaciones de solicitud de patente de los Estados Unidos N.º 2010/0040614; 2010/0028330; 2004/0241745; 2008/0311117; 2009/0217401; patentes de los Estados Unidos N.º 7.521.051; 7.563.869; 7.595.048; publicaciones de PCT N.º WO 2004/056875; WO 2008/083174). Por el contrario, se ha sugerido que los agentes que modulan la interacción de PD-1 con B7-H1 tienen utilidad en la modulación positiva o negativa de la respuesta inmunitaria (véase, patentes de los Estados Unidos N.º 7.029.674; 7.488.802; publicaciones de solicitud de patente de los Estados Unidos N.º 2007/0122378; 2009/0076250; 2009/0110667; 2009/0263865; 2009/0297518; publicación de PCT N.º WO 2006/133396). De forma análoga, se ha propuesto el uso de anticuerpos anti B7-H1 para tratar infecciones y tumores y modular positivamente una respuesta inmunitaria adaptativa (publicaciones de solicitud de patente de los Estados Unidos N.º 2009/0055944; 2009/0274666; 2009/0317368; patentes de los Estados Unidos N.º 6.803.192; 7.794.710; publicaciones de PCT N.º WO 01/39722; WO 02/086083).

No obstante, a pesar de dichos avances siguen siendo necesarias composiciones capaces de modular la interacción entre B7-H1 y PD-1. La presente divulgación se dirige a dichas composiciones y su uso para tratar el cáncer y otras enfermedades y afecciones.

Hirano F et al., (Cancer Res. 1 feb 2005;65(3):1089-96) se refiere al bloqueo de B7-H1 y PD-1 por anticuerpos monoclonales que potencian la inmunidad terapéutica del cáncer.

Sumario de la divulgación:

La presente invención es como se define en las reivindicaciones. Los aspectos/casos de la presente divulgación que constituyen la invención se definen por las reivindicaciones.

La presente divulgación se refiere a anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígeno y a otras moléculas que son capaces de unirse inmunoespecíficamente a B7-H1 o PD-1. En algunos casos dichas moléculas son capaces adicionalmente de modular la capacidad de B7-H1 para unirse con PD-1 o son capaces de afectar a la actividad de señalización del B7-H1 o PD-1. La divulgación se refiere adicionalmente a los usos de dichas moléculas en el diagnóstico y tratamiento de cáncer y otras enfermedades.

En detalle, la divulgación proporciona una molécula, que comprende un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que se une de forma inmunoespecífica con B7-H1 o PD-1, y en particular B7-H1 humano o PD-1 humano, preferentemente expresada en la superficie de una célula viva a una concentración endógena o transfectada. La divulgación se refiere en particular al caso de dicha molécula en el que el fragmento de unión a antígeno se une a B7-H1 y en el que la célula viva es una célula tumoral, una célula infectada por patógeno o una célula presentadora de antígenos así como el caso de dicha molécula en el que el fragmento de unión a antígeno se une a PD-1 y en el que la célula viva es un linfocito T.

La presente divulgación se refiere a anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígeno y a otras moléculas que son capaces de unirse inmunoespecíficamente a B7-H1 o PD-1. En algunos casos dichas moléculas son capaces adicionalmente de modular la capacidad de B7-H1 para unirse con PD-1 o son capaces de afectar a la actividad de señalización del B7-H1 o PD-1. La divulgación se refiere adicionalmente a los usos de dichas moléculas en el diagnóstico y tratamiento de cáncer y otras enfermedades.

En detalle, la divulgación proporciona una molécula, que comprende un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que se une de forma inmunoespecífica con B7-H1 o PD-1, y en particular B7-H1 humano o PD-1 humano, preferentemente expresada en la superficie de una célula viva a una concentración endógena o transfectada. La divulgación se refiere en particular al caso de dicha molécula en el que el fragmento de unión a antígeno se une a B7-H1 y en el que la célula viva es una célula tumoral, una célula infectada por patógeno o una célula presentadora de antígenos así como el caso de dicha molécula en el que el fragmento de unión a antígeno se une a PD-1 y en el que la célula viva es un linfocito T.

La divulgación se refiere además al caso de dichas moléculas en el que la molécula es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. La divulgación incluye los casos en los que dichos anticuerpos son monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos o multiespecíficos.

La divulgación se refiere además al caso de dichas moléculas o anticuerpos que se unen con B7-H1 y en el que el fragmento de unión a antígeno de los mismos comprende seis CDR, en el que las CDR comprenden al menos una CDR consenso de las CDR de anticuerpos anti B7-H1 1E12, 1F4, 2G11, 3B6 y 3D10 con todas las CDR restantes seleccionadas de:

(A) las tres CDR de cadena ligera y las tres CDR de cadena pesada de anticuerpo anti B7-H1 1E12;
(B) las tres CDR de cadena ligera y las tres CDR de cadena pesada de anticuerpo anti B7-H1 1F4;
(C) las tres CDR de cadena ligera y las tres CDR de cadena pesada de anticuerpo anti B7-H1 2G11;
(D) las tres CDR de cadena ligera y las tres CDR de cadena pesada de anticuerpo anti B7-H1 3B6; o
(E) las tres CDR de cadena ligera y las tres CDR de cadena pesada de anticuerpo anti B7-H1 3D10.

La divulgación se refiere además al caso de dichas moléculas o anticuerpos que se unen con B7-H1 y en el que el fragmento de unión a antígeno de los mismos comprende seis CDR, en el que las seis CDR son:

(A) las tres CDR de cadena ligera y las tres CDR de cadena pesada de anticuerpo anti B7-H1 1E12;
(B) las tres CDR de cadena ligera y las tres CDR de cadena pesada de anticuerpo anti B7-H1 1F4;
(C) las tres CDR de cadena ligera y las tres CDR de cadena pesada de anticuerpo anti B7-H1 2G11;
(D) las tres CDR de cadena ligera y las tres CDR de cadena pesada de anticuerpo anti B7-H1 3B6; o
(E) las tres CDR de cadena ligera y las tres CDR de cadena pesada de anticuerpo anti B7-H1 3D10.

La divulgación se refiere además al caso de dichos anticuerpos, en los que el anticuerpo se une con B7-H1 y comprende un dominio variable de anticuerpo h3D10 Var 1, h3D10 Var 2, h3D10 Var 3, h3D10 Var 4, h3D10 Var 5, h3D10 Var 6, h3D10 Var 7, h3D10 Var 8, h3D10 Var 9, h3D10 Var 10, h3D10 Var 11, h3D10 Var 12, h3D10 Var 13 o h3D10 Var 14.

La divulgación se refiere además al caso de las moléculas o los anticuerpos anteriormente descritos, en el que las moléculas o los anticuerpos se unen con PD-1 y en el que el fragmento de unión a antígeno comprende seis CDR, en el que las CDR comprenden al menos una CDR consenso de las CDR de anticuerpos anti PD-1 1E3, 1E8 y 1H3 con todas las CDR restantes seleccionadas de:

(A) las tres CDR de cadena ligera y las tres CDR de cadena pesada de anticuerpo anti PD-1 1E3;
(B) las tres CDR de cadena ligera y las tres CDR de cadena pesada de anticuerpo anti PD-1 1E8; o
(C) las tres CDR de cadena ligera y las tres CDR de cadena pesada de anticuerpo anti PD-1 1H3.

La divulgación se refiere además al caso de dichos anticuerpos, en el que las seis CDR son:

(A) las tres CDR de cadena ligera y las tres CDR de cadena pesada de anticuerpo anti PD-1 1E3;
(B) las tres CDR de cadena ligera y las tres CDR de cadena pesada de anticuerpo anti PD-1 1E8; o
(C) las tres CDR de cadena ligera y las tres CDR de cadena pesada de anticuerpo anti PD-1 1H3.

La divulgación se refiere además al caso de dichos anticuerpos, en los que el anticuerpo se une con PD-1 y comprende un dominio variable de anticuerpo h1H3 Var 1, h1H3 Var 2, h1H3 Var 3, h1H3 Var 4, h1H3 Var 5, h1H3 Var 6, h1H3 Var 7, h1H3 Var 8, h1H3 Var 9, h1H3 Var 10, h1H3 Var 11, h1H3 Var 12, h1H3 Var 13 o h1H3 Var 14.

La divulgación se refiere además al caso de las moléculas o los anticuerpos anteriormente descritos, en el que la molécula o el anticuerpo se marca de forma detectable o comprende una toxina conjugada, fármaco, receptor, enzima, ligando de receptor.

La divulgación se refiere además al caso de las moléculas o los anticuerpos anteriormente descritos, en el que la molécula o el anticuerpo:

(A) modula la transducción de señal mediada por B7-H1 o PD-1;
(B) atenúa la capacidad de B7-H1 para unirse con un receptor de B7-H1 o atenúa la capacidad de PD-1 para unirse con un ligando de PD-1;
(C) actúa como agonista de la transducción de señal mediada por B7-H1 o PD-1;
(D) media en la proliferación de linfocitos T; o
(E) potencia la producción de IFN-γ.

La divulgación se refiere además a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las moléculas o anticuerpos anteriormente descritos, y un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptables. La divulgación se refiere además al uso de dicha composición farmacéutica en el tratamiento del cáncer, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad infecciosa o una enfermedad que afecta al número o la salud de linfocitos T. La divulgación se refiere además al uso de dicha composición farmacéutica, en el que el tratamiento es profiláctico y se proporciona antes de cualquier síntoma del cáncer, la enfermedad autoinmunitaria, la enfermedad infecciosa o la enfermedad que afecta al número o la salud de linfocitos T, o para el tratamiento de afecciones inherentes al trasplante.

La divulgación se refiere además al uso de cualquiera de las moléculas o los anticuerpos anteriormente descritos para diagnosticar el cáncer, enfermedad autoinmunitaria (especialmente enfermedad de injerto contra hospedador), enfermedad infecciosa (especialmente una enfermedad vírica crónica) o una enfermedad que afecta al número o la

salud de linfocitos T en un sujeto ensayando células del sujeto con respecto a su capacidad para unirse con B7-H1 o PD-1.

La divulgación se refiere en particular al caso de dichas moléculas, anticuerpos y composiciones, en el que el B7-H1 es B7-H1 humano y el PD-1 es PD-1 humano.

La divulgación se refiere en particular a un método para diagnosticar una enfermedad (especialmente cáncer) en un sujeto que comprende ensayar células del sujeto con respecto a su capacidad para unirse con cualquiera de las moléculas de unión a B7-H1 anteriormente descritas, en el que el método proporciona un ensayo citológico para diagnosticar la presencia de la enfermedad en el sujeto.

La divulgación se refiere adicionalmente a un método para diagnosticar una enfermedad (especialmente una enfermedad que afecta al número y/o la salud de linfocitos T) en un sujeto que comprende ensayar células del sujeto con respecto a su capacidad para unirse con una molécula de unión a PD-1, en el que el método proporciona un ensayo citológico para diagnosticar la presencia y/o progresión de la enfermedad en el sujeto o para evaluar una respuesta del sujeto al tratamiento.

Breve descripción de los dibujos:

La Figura 1 muestra la unión de sobrenadantes de hibridoma ensayados que se unen con B7-H1. Control positivo (CP): sueros diluidos 1:1000 del ratón usado para generación de hibridoma; Control negativo (CN): leche 5 %/PBS. Se muestran datos para unión con B7-H1-Fc y detección con IgG anti ratón.

La Figura 2 muestra los resultados de experimentos para determinar si los anticuerpos anti B7-H1 aislados son capaces de modular la unión de B7-H1 con PD-1. Control positivo: clones MIH-1 y 29E.2A3 (ambos anti CD274 humano (B7-H1); Dos controles negativos: medios acondicionados de un hibridoma no relacionado (Ab aleatorio) y control de vector (CV).

La Figura 3 muestra la mediana de la intensidad de fluorescencia (IFM) de anticuerpos anti-B7-H1 ensayados para unión con CHO-hB7-H1. No se descubrió que ninguno de los clones ensayados reaccionara de forma cruzada con la línea parental CHO, lo que indica que el anticuerpo expresado era inmunoespecífico para B7-H1 humano.

La Figura 4 muestra el resultado de la mediana de intensidad de fluorescencia (IFM) de un ensayo de unión a células CHO que expresan B7-H1 humanas de anticuerpos anti B7-H1 humanos.

La Figura 5 compara el resultado de la mediana de intensidad de fluorescencia (IFM) de un ensayo de unión a células CHO que expresan B7-H1 humanas de anticuerpos anti B7-H1 humanos 5H1 y 1E12.

La Figura 6 muestra la unión a antígeno e isotipo de los anticuerpos anti PD-1 humano aislados.

Las Figuras 7A-7B muestran los resultados de experimentos que indican que varios de los hibridomas aislados expresaban anticuerpos anti PD-1 humano neutralizantes.

La Figura 8 muestra la mediana de la intensidad de fluorescencia (IFM) de anticuerpos anti-PD-1 ensayados para unión con CHO-hPD-1. No se descubrió que ninguno de los clones ensayados reaccionara de forma cruzada con la línea parental CHO, lo que indica que el anticuerpo expresado era específico para PD-1 humano.

La Figura 9 muestra la mediana de intensidad de fluorescencia (IFM) de un ensayo de unión a células CHO que expresan PD-1 humanas de anticuerpos anti PD-1 humanos. Control positivo: EH12 (un anticuerpo anti PD-1 humano disponible en el mercado de BioLegend); mIgG1: control negativo de IgG murino.

La Figura 10 muestra el resultado de la mediana de intensidad de fluorescencia (IFM) de un ensayo de competición basado en células a diversas concentraciones de anticuerpos anti PD-1 humanos.

La Figura 11 muestra el resultado de la mediana de intensidad de fluorescencia (IFM) de un ensayo de competición basado en células a una concentración de anticuerpo anti PD-1 humano 20 µg/ml.

La Figura 12 muestra los resultados de un experimento en el que se preincubaron células CHO transfectadas con PD-1 de longitud completa humano con una dosis de saturación de anticuerpos monoclonales (mAb) anti PD-1 humano o Ig de control antes de teñirse por mIg hB7-H1-FC o hB7-DC marcado con biotina.

La Figura 13, Paneles A-B muestran la unión comparativa de: (A) el anticuerpo anti PD-1 disponible en el mercado, EH12 con (B) un anticuerpo monoclonal murino que posee regiones Fab anti PD-1 humano murinas quiméricas ("qu") y una región Fc IgG1 humana.

La Figura 14, Paneles A-B muestran la capacidad de los anticuerpos anti PD-1 de la presente divulgación para ejercer un efecto de bloqueo en la unión de B7-H1-Fc biotinilado y B7-DC-Fc biotinilado con PD-1.

La Figura 15 muestra que una curva de unión de anticuerpo quimérico 1H3 anti PD-1 humano con células CHO.hPD-1, como se detecta por anticuerpo anti hIg.

Las Figuras 16A-16B muestran los resultados de estudios de la capacidad del anticuerpo quimérico 1H3 anti PD-1 humano para unirse con linfocitos T primarios CD8+ (Figura 16A) y CD4+ (Figura 16B) en relación con el anticuerpo de control negativo (palivizumab; SYNAGIS®, Medimmune, Inc.).

La Figura 17 muestra la capacidad de los anticuerpos de la presente divulgación para potenciar la respuesta de linfocitos T específicos de antígeno como se mide por dilución de CFSE tras recordatorio de la toxina del tétanos (TT).

Las Figuras 18A-18D demuestran la capacidad de las variantes de 1H3 humanizadas (h1H3 Var 1 - h1H3 Var 14 para unirse con células CHO.hPDl.

Las Figuras 19A-19B demuestran la capacidad de anticuerpos humanizados anti PD-1 para bloquear las interacciones entre hPD-1-Fc y células HEK293 que expresan B7-H1 (Figura 19A) o B7-DC (Figura 19B).

La Figura 20 muestra curvas de unión para h1H3 Var 1 - h1H3 Var 6.

Descripción detallada de la divulgación:

La presente divulgación se refiere a anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígeno y a otras moléculas que son capaces de unirse inmunoespecíficamente a B7-H1 o PD-1. En algunos casos dichas moléculas son capaces adicionalmente de modular la capacidad de B7-H1 o B7-DC para unirse con PD-1 o son capaces de afectar a la actividad de señalización de B7-H1 o PD-1. La divulgación se refiere adicionalmente a los usos de dichas moléculas en el tratamiento de cáncer y otras enfermedades.

Se dice que una molécula es capaz de "unirse inmunoespecíficamente" con una segunda molécula si dicha unión muestra la especificidad y afinidad de un anticuerpo por su antígeno afín. Se dice que los anticuerpos son capaces de "unirse inmunoespecíficamente" con una región o conformación diana ("epítopo") de un antígeno (y en particular, los antígenos: B7-H1 o PD-1) si dicha unión implica el sitio de reconocimiento de antígenos de la molécula de inmunoglobulina. Un anticuerpo que se une con un antígeno particular puede unirse con otros antígenos con menor afinidad si el otro antígeno tiene alguna similitud de secuencia o conformacional que es reconocida por el sitio de reconocimiento de antígenos como se determina mediante, por ejemplo, inmunoensayos, ensayos BIACORE® u otros ensayos conocidos en la técnica, pero no se uniría con un antígeno totalmente no relacionado. Preferentemente, sin embargo, los anticuerpos (y sus fragmentos de unión a antígeno) no reaccionarán de forma cruzada con otros antígenos. Los anticuerpos también pueden unirse con otras moléculas de una manera que no es inmunoespecífica, tal como con receptores FcR, en virtud de dominios de unión en otras regiones/dominios de la molécula que no implican el sitio de reconocimiento de antígenos, tal como la región de Fc.

Como se usa en el presente documento el término "modular" se refiere a una capacidad para alterar un efecto o resultado. En particular, la divulgación se refiere a moléculas (especialmente anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno que se unen inmunoespecíficamente con B7-H1 humano o PD-1 humano) que son capaces de modular la unión entre B7-H1 y PD-1 y/o modular la transducción de señal que se produce como consecuencia de la unión de B7-H1-PD-1. Dicha modulación puede dar como resultado la atenuación o el bloqueo completo de la capacidad de B7-H1 para unirse con PD-1. En un caso adicional, dicha modulación puede atenuar o neutralizar completamente la capacidad de B7-H1 o PD-1 para mediar en la transducción de señales. En un caso adicional, dicha modulación puede potenciar o actuar de otro modo como agonista de la transducción de señales a través de B7-H1 o PD-1, 1) potenciando la interacción entre B7-H1 y PD-1 y facilitando la unión de B7-H1 - PD-1 o ii) uniendo directamente con B7-H1 y PD-1 e imitando de este modo la actividad del ligando endógeno, por ejemplo. En un caso adicional más, dicha modulación puede alterar la naturaleza de la interacción entre B7-H1 y PD-1 para alterar la naturaleza de la transducción de señal inducida. Por ejemplo, las moléculas de la presente divulgación pueden, mediante unión con B7-H1 o PD-1, alterar la capacidad de dichas moléculas para unirse con otros ligandos y receptor (por ejemplo, que afecta a la capacidad de PD-1 para unirse con B7-DC o la capacidad de B7-H1 para unirse con B7-1 (CD80)) y alterar de este modo su actividad general. Preferentemente, dicha modulación proporcionará al menos un cambio del 10 % en una actividad del sistema inmunitario medible, más preferentemente, al menos un cambio del 50 % en dicha actividad, o al menos un cambio de 2 veces, 5 veces, 10 veces o, aún más preferentemente, al menos un cambio de 100 veces en dicha actividad.

Como se usa en el presente documento, se pretende que el término "anticuerpo" indique una molécula de inmunoglobulina que posee un sitio de reconocimiento de antígenos de "región variable". Se pretende que la expresión "región variable" distinga entre dicho dominio de la inmunoglobulina de dominios que están ampliamente compartidos por anticuerpos (tales como un dominio Fc de anticuerpo). La región variable comprende una "región

hipervariable" cuyos restos son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende restos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o “CDR” (es decir, típicamente aproximadamente en los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y aproximadamente en los restos 27-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (es decir, los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia, C. et al. (1987) "Canonical Structures For The Hypervariable Regions Of Immunoglobulins," J. Mol. Biol. 196:901-917). Los restos de "Región marco conservada" o "FR" son los restos dominio variable distintos de los restos de región hipervariable como se define en el presente documento. El término anticuerpo incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos camelizados (Véase, por ejemplo, Muyldermans et al., 2001, Trends Biochem. Sci. 26:230; Nuttall et al., 2000, Cur. Pharm. Biotech. 1:253; Reichmann y Muyldermans, 1999, J. Immunol. Meth. 231:25; publicaciones internacionales N.º WO 94/04678 y WO 94/25591; patente de los Estados Unidos N.º 6.005.079), Fv monocatenarios (scFv) (véase, por ejemplo, véase Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg y Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994)), anticuerpos monoclonales, Fv con enlaces disulfuro (sdFv), intracuerpos y anticuerpos antiidiotípicos (anti Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti Id y anti anti Id para anticuerpos de la divulgación). En particular, dichos anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 e IgA_2) o subclase.

Como se usa en el presente documento, la expresión "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo se refiere a una o más partes de un anticuerpo que contienen las regiones determinantes de complementariedad ("CDR") y opcionalmente los restos de marco conservado que comprenden el sitio de reconocimiento de antígeno de "región variable", y muestran una capacidad para unirse inmunoespecíficamente al antígeno. Dichos fragmentos incluyen Fab', $F(ab')_2$, Fv, (ScFv) monocatenario y mutantes de los mismos, variantes de origen natural y proteínas de fusión que comprenden el sitio de reconocimiento de antígeno de "región variable" del anticuerpo y una proteína heteróloga (por ejemplo, una toxina, un sitio de reconocimiento de antígeno para un antígeno diferente, una enzima, un receptor o ligando de receptor, etc.). Como se usa en el presente documento, el término "fragmento" se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 restos de aminoácidos contiguos, al menos 10 restos de aminoácidos contiguos, al menos 15 restos de aminoácidos contiguos, al menos 20 restos de aminoácidos contiguos, al menos 25 restos de aminoácidos contiguos, al menos 40 restos de aminoácidos contiguos, al menos 50 restos de aminoácidos contiguos, al menos 60 restos de amino contiguos, al menos 70 restos de aminoácidos contiguos, al menos 80 restos de aminoácidos contiguos, al menos 90 restos de aminoácidos contiguos, al menos 100 restos de aminoácidos contiguos, al menos 125 restos de aminoácidos contiguos, al menos 150 restos de aminoácidos contiguos, al menos 175 restos de aminoácidos contiguos, al menos 200 restos de aminoácidos contiguos o al menos 250 restos de aminoácidos contiguos.

Se prefieren en particular anticuerpos humanos, quiméricos o humanizados para su uso *in vivo* en seres humanos, sin embargo, pueden emplearse provechosamente anticuerpos murinos o anticuerpos de otra especie para muchos usos (por ejemplo, ensayos de detección *in vitro* o *in situ*, uso *in vivo* agudo, etc.). Son deseables en particular anticuerpos completamente humanos para el tratamiento terapéutico de sujetos humanos.

Pueden prepararse anticuerpos humanos por una diversidad de métodos conocidos en la técnica incluyendo métodos de presentación en fagos descritos anteriormente usando bibliotecas de anticuerpos obtenidas de secuencias de inmunoglobulina humanas (véase patentes de los Estados Unidos N.º 4.444.887 y 4.716.111; y publicaciones internacionales N.º WO 98/46645, documento WO 98/50433, documento WO 98/24893, documento WO 98/16654, documento WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741). Pueden producirse anticuerpos humanos usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los complejos de genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humana pueden introducirse aleatoriamente o mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Como alternativa, la región variable, región constante y región de diversidad humana pueden introducirse en células madre embrionarias de ratón además de los genes de cadena pesada y ligera humana. Los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera de ratón pueden hacerse no funcionales por separado o simultáneamente con la introducción de loci de inmunoglobulina humana mediante recombinación homóloga. En particular, la supresión homocigota de la región J_H evita la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y se microinyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. Los ratones quiméricos se crían después para producir descendencia homocigota que expresa anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan usando metodologías convencionales con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o parte de un polipéptido de la divulgación. Se pueden obtener anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno de los ratones inmunizados, transgénicos, usando tecnología de hibridoma convencional (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos N.º 5.916.771). Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de linfocitos B y posteriormente experimentan cambio de clase y mutación somática. Por lo tanto, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión de conjunto de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar (1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93).

Para un análisis detallado de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y los protocolos para producir dichos anticuerpos, véase, por ejemplo, publicaciones internacionales N.º WO 98/24893, WO 96/34096 y WO 96/33735; y patentes de los Estados Unidos N.º 5.413.923, 5.625.126, 5.633.425, 5.569.825, 5.661.016, 5.545.806, 5.814.318 y 5.939.598).

Además, compañías tales como Abgenix, Inc. (Freemont, CA) y Medarex (Princeton, NJ) pueden contactarse para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando tecnología similar a la descrita anteriormente.

Un "anticuerpo quimérico" es una molécula en la que se obtienen diferentes partes del anticuerpo de diferentes moléculas de inmunoglobulina tales como anticuerpos que tienen una región variable obtenida de un anticuerpo no humano y una región constante de inmunoglobulina humana. Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos quiméricos. Véase, por ejemplo, Morrison, 1985, Science 229:1202; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; Gillies et al., 1989, J. Immunol. Methods 125:191-202; y patentes de los Estados Unidos N.º 6.311.415, 5.807.715, 4.816.567 y 4.816.397. Pueden producirse anticuerpos quiméricos que comprenden una o más CDR de una especie no humana y regiones marco conservadas de una molécula de inmunoglobulina humana usando una diversidad de técnicas conocidas en la materia incluyendo, por ejemplo, injertos de CDR (documento EP 239.400; Publicación Internacional N.º WO 91/09967; y patentes de los Estados Unidos N.º 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089), sustitución en superficie o cambio de superficie (documento 592.106; EP 519.596; Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7:805; y Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969) e intercambio de cadenas (patente de los Estados Unidos N.º 5.565.332).

La divulgación se refiere particularmente a "anticuerpos humanizados" (véase, por ejemplo, patentes europeas N.º EP 239.400, EP 592.106 y EP 519.596; publicaciones internacionales N.º WO 91/09967 y WO 93/17105; patentes de los Estados Unidos N.º 5.225.539, 5.530.101, 5.565.332, 5.585.089, 5.766.886 y 6.407.213; y Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7(6):805-814; Roguska et al., 1994, PNAS 91:969-973; Tan et al., 2002, J. Immunol. 169:1119-25; Caldas et al., 2000, Protein Eng. 13:353-60; Morea et al., 2000, Methods 20:267-79; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:10678-84; Roguska et al., 1996, Protein Eng. 9:895-904; Couto et al., 1995, Cancer Res. 55 (Sup 23):5973s-5977s; Couto et al., 1995, Cancer Res. 55:1717-22; Sandhu, 1994, Gene 150:409-10; Pedersen et al., 1994, J. Mol. Biol. 235:959-73; Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Reichmann et al., 1988, Nature 332:323-329; y Presta, 1992, Curr. Op. Struck. Biol. 2:593-596). Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a una inmunoglobulina que comprende una región de marco conservado humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (habitualmente un ratón o una rata). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR se denomina "donante" y la inmunoglobulina humana que proporciona el marco conservado se denomina "aceptora". No es necesario que estén presentes regiones constantes, pero si lo están, deben ser sustancialmente idénticas a regiones constantes de inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente 85-90 %, preferentemente aproximadamente 95 % o más idénticas. Por lo tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a partes correspondientes de secuencias de inmunoglobulina humana natural. Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo que comprende una inmunoglobulina de cadena ligera humanizada y una de cadena pesada humanizada. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado no abarcaría un anticuerpo quimérico típico, porque, por ejemplo, la región variable completa de un anticuerpo quimérico no es humana. Se dice que el anticuerpo donante se ha "humanizado", por el proceso de "humanización", porque se espera que el anticuerpo humanizado resultante se una con el mismo antígeno que el anticuerpo donante que proporciona las CDR. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de región hipervariable del receptor son sustituidos por restos de región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de región marco conservada (FR) de la inmunoglobulina humana están sustituidos por restos correspondientes no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para perfeccionar adicionalmente el rendimiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana que se une inmunoespecíficamente con un polipéptido FcγRIIB, que se ha alterado por la introducción de sustituciones, supresiones o adiciones de restos de aminoácidos (es decir, mutaciones).

Los anticuerpos usados en los métodos de la presente divulgación pueden ser monoespecíficos. También son de interés anticuerpos biespecíficos, anticuerpos triespecíficos o anticuerpos de mayor multiespecificidad que muestran especificidad para diferentes dianas además de B7-H1 o PD-1. En un caso preferido, dichos anticuerpos multiespecíficos mostrarían especificidad para diferente o diferentes dianas de células inmunitarias. Por ejemplo, dichos anticuerpos pueden unirse tanto con B7-H1 como con B7-DC y por lo tanto modulan ambas respuestas dependientes de PD-1. Por el contrario, dichos anticuerpos pueden unirse con PD-1 y B7-1 e interfieren con ambas respuestas dependientes de B7-H1. En otro caso, el anticuerpo multiespecífico se une con moléculas (receptores o

ligandos) implicados en rutas inmunomoduladoras alternativas, tales como CTLA4, TIM3, TIM4, OX40, CD40, GITR, 4-1-BB, B7-H4, LIGHT o LAG3, para potenciar los efectos antimoduladores. Además, el anticuerpo multiespecífico puede unirse con moléculas efectoras tales como citocinas (por ejemplo, IL-7, IL-15, IL-12, IL-4 TGF-beta, IL-10, IL-17, IFNg, Flt3, BLys) y quimiocinas (por ejemplo, CCL21), que pueden ser particularmente relevantes para modular respuestas inmunitarias tanto agudas como crónicas.

Adicionalmente, los anticuerpos multiespecíficos pueden unirse con un antígeno que es importante para dirigir al anticuerpo a un tipo celular o tejido particular. Por ejemplo anticuerpos tales que se unen tanto con PD-1 como con CD27 (o B7-H1 y CD27) pueden ayudar a localizar conjuntamente linfocitos B de memoria activados (mB_{Act}) y células presentadoras de antígenos (APC) de modo que el PD-1 dispuesto por dichas APC puede interaccionar con ligandos en la superficie de los linfocitos B mB_{Act} para promover la supervivencia de los linfocitos B mB_{Act}. Ya que una pérdida de linfocitos B mB_{Act} es un acontecimiento desencadenante en la progresión de la infección por VIH a SIDA (Titanji, K. et al. (2010) "Acute Depletion Of Activated Memory B Cells Involves The PD-1 Pathway In Rapidly Progressing SIV-Infected Macaques," J. Clin. Invest. 120(11):3878-3890), los anticuerpos que se unen tanto con PD-1 como con CD27 tienen utilidad en el tratamiento de la infección por VIH y en la prevención o el retardo de la aparición del SIDA. Como se ha analizado anteriormente, se ha implicado que la ruta de PD-1 tiene un papel clave en la alteración de la función inmunitaria durante la infección por VIH crónica ("agotamiento de linfocitos T") (Khaitan, A. et al. (2011) "Revisiting Immune Exhaustion During HIV Infection," Curr. HIV/AIDS Rep. 8:4-11; Rodriquez-Garcia, M. et al. (19 de noviembre de 2010) "Expression Of PD-L1 And PD-L2 On Human Macrophages Is Up-Regulated By HIV-1 And Differentially Modulated By IL-10," J. Leukocyte Biol. 89: doi:10.1189/jlb.0610327:1-9; Grabmeier-Pfistershammer, K. et al. (2011) "Identification of PD-1 as a Unique Marker for Failing Immune Reconstitution in HIV-1-Infected Patients on Treatment," J Acquir. Immune Defic. Syndr. 56(2):118-124). Se ha mostrado que los macrófagos contribuyen significativamente a las etapas iniciales de infección por VIH (Carter, C. A. et al. (2008) "Cell Biology Of HIV-1 Infection Of Macrophages," Ann. Rev. Microbiol. 62:425-443; Noursadeghi, M. et al. (2006) "HIV-1 Inflection Of Mononuclear Phagocytic Cells: The Case For Bacterial Innate Immune Deficiency In AIDS," Lancet Infect. Dis. 6:794-804). En consecuencia, los anticuerpos (particularmente si están conjugados con una toxina) que se unen con PD-1 y con un marcador específico de macrófago (tal como CD14, CD68, CD163, TLR2 etc.) tienen utilidad en la prevención de la infección por VIH. Adicionalmente, los anticuerpos que se unen con múltiples marcadores de agotamiento de linfocitos T (por ejemplo, PD-1 y cualquiera o todos de: CTLA4, TIM3, TIM4 o LAG-3) tienen utilidad en el tratamiento o el diagnóstico de la sensibilidad inmunitaria. Otros antígenos diana de interés incluyen marcadores de células cancerosas.

Adicionalmente, se ha descubierto que las células $PD\text{-}1^+$ $CD8^+$ tienen actividad anti VIH (Killian, M.S. et al. (2011) "Natural Suppression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication Is Mediated by Memory CD8+ T Cells," J. Virol. 85(4):1696-1705). Por lo tanto los anticuerpos que se unen tanto con PD-1 como con CD8 tienen utilidad en, por ejemplo, un medio *ex vivo* para aislar y producir una población enriquecida de dichas células para su último uso en el tratamiento de infección por VIH y SIDA en pacientes.

Otros marcadores que pueden usarse en dichos anticuerpos biespecíficos, triespecíficos o multiespecíficos anti PD-1 o anti B7-H1 incluyen CD4, CD8, CD25 y CTLA-4 (véase, De Keersmaecker, B. et al. (2011) ("Fighting with the Enemy's Weapons? The Role of Costimulatory Molecules in HIV", Curr. Molec. Med. 566-5240/11: 1-25; y Sarikonda, G. (2011) "Immunosuppressive Mechanisms During Viral Infectious Diseases;" Methods in Molec. Biol. 677:431-447).

De forma similar, aunque son necesarios linfocitos T CD4 para ralentizar el crecimiento y la propagación de *M. tuberculosis*, también es necesaria la inhibición mediada por PD-1 para evitar que los linfocitos T $CD4^+$ promuevan enfermedad grave (Barber, D.L. et al. (2011) "CD4 T Cells Promote Rather than Control Tuberculosis in the Absence of PD-1-Mediated Inhibition," J. Immunol. 186:1598-1607; Sakai, S. et al. (2010) "PD-1-PD-L1 pathway impairs Th1 immune response in the late stage of infection with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin," Intl. Immunol. 22(12):915-925; Lázár-Molnár, E. et al. (2010) "Programmed Death-1 (PD-1)-Deficient Mice Are Extraordinarily Sensitive To Tuberculosis," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 107(30):13402-13407). Por lo tanto, los anticuerpos que se unen con CD4 y PD-1 tienen utilidad en el tratamiento de la tuberculosis y en la prevención o el retardo de la aparición de la tuberculosis.

Las secuencias de ADN que codifican secuencias marco conservadas aceptoras humanas preferidas incluyen pero sin limitación segmentos de FR del segmento de VH de línea germinal humana VH1-18 y JH6 y el segmento de VL de línea germinal humana VK-A26 y JK4. En un caso específico, se insertan una o más de las CDR en regiones marco conservadas usando técnicas de ADN recombinante rutinarias. Las regiones marco conservadas pueden ser regiones marco conservadas de origen natural o consenso y preferentemente regiones marco conservadas humanas (véase, por ejemplo, Chothia et al., 1998, J. Mol. Biol. 278: 457-479 para un listado de regiones marco conservadas humanas).

Un anticuerpo humanizado o quimérico de la divulgación puede comprender sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donante) y todas o sustancialmente todas las regiones marco conservadas son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. Preferentemente, un anticuerpo de la divulgación también comprende al menos una porción de una región constante

de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Los dominios constantes de los anticuerpos de la divulgación pueden seleccionarse con respecto a la función propuesta del anticuerpo, en particular la función efectora que puede ser necesaria. En algunos casos, los dominios constantes de los anticuerpos de la divulgación son (o comprenden) dominios IgA, IgD, IgE, IgG o IgM humanos. En un caso específico, se usan dominios contantes de IgG humanos, especialmente de los isotipos IgG1 e IgG3, cuando se pretende que los anticuerpos humanizados de la divulgación sean para usos terapéuticos y se necesiten funciones efectoras de anticuerpos tales como citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Por ejemplo, PD-1 tiene alta expresión en linfocitos T así como linfomas de linfocitos T periféricos poco habituales tales como linfoma de linfocitos T angioinmunoblástico (AITL). Los anticuerpos anti PD-1 con actividad ADCC o CDC son particularmente relevantes como agentes terapéuticos para tratar dichos cánceres. En casos alternativos, se usan isotipos IgG2 e IgG4 cuando se pretende que el anticuerpo de la divulgación sea para fines terapéuticos y no es necesaria función efectora de anticuerpos. Por ejemplo, si se desea aumentar la actividad de linfocitos T dirigiéndose a PD-1 en la superficie de linfocitos T, entonces serían indeseables funciones efectoras que destruirían el linfocito T. La divulgación abarca dominios constantes de Fc que comprenden una o más modificaciones de aminoácidos que alteran funciones efectoras de anticuerpos tales como las desveladas en las publicaciones de solicitud de patente de los Estados Unidos N.º 2005/0037000 y 2005/0064514.

En algunos casos, el anticuerpo de la divulgación contiene la cadena ligera así como al menos el dominio variable de una cadena pesada. En otros casos, el anticuerpo de la divulgación puede comprender además una o más de las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada. El anticuerpo puede seleccionarse de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE y cualquier isotipo, incluyendo IgG_1, IgG_2, IgG_3 e IgG_4. En algunos casos, el dominio constante es un dominio constante de fijación del complemento en el que se desea que el anticuerpo muestre actividad citotóxica y la clase es típicamente IgG_1. En otros casos, cuando no es deseable dicha actividad citotóxica, el dominio constante puede ser de la clase IgG_2. El anticuerpo de la divulgación puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo y la selección de dominios constantes particulares para optimizar funciones efectoras deseadas está dentro de la experiencia habitual en la técnica.

No es necesario que las regiones marco conservadas y CDR de un anticuerpo humanizado correspondan de forma precisa a las secuencias parentales, por ejemplo, la CDR donante o el marco conservado consenso pueden mutarse por sustitución, inserción o supresión de al menos un resto de modo que el resto de CDR o marco conservado en el sitio no correspondan al anticuerpo consenso o donante. Dichas mutaciones, sin embargo, preferentemente no son extensivas. Normalmente, al menos 75 % de los restos de anticuerpo humanizados corresponderán a los de las secuencias de región marco conservado (FR) y CDR parentales, con más frecuencia 90 % y más preferentemente más de 95 %. Pueden producirse anticuerpos humanizados usando una diversidad de técnicas conocidas en la materia, incluyendo, pero sin limitación, injerto de CDR (patente europea N.º EP 239.400; Publicación Internacional N.º WO 91/09967; y patentes de los Estados Unidos N.º 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089), sustitución en superficie o cambio de superficie (patentes europeas N.º EP 592.106 y EP 519.596; Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7(6):805-814; y Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:969-973), intercambio de cadenas (patente de los Estados Unidos N.º 5.565.332) y técnicas desveladas en, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos N.º 6.407.213, 5.766.886 y 5.585.089, la publicación internacional N.º WO 9317105, Tan et al., 2002, J. Immunol. 169:1119-25, Caldas et al., 2000, Protein Eng. 13:353-60, Morea et al., 2000, Methods 20:267-79, Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:10678-84, Roguska et al., 1996, Protein Eng. 9:895-904, Couto et al., 1995, Cancer Res. 55 (Sup 23):5973s-5977s, Couto et al., 1995, Cancer Res. 55:1717-22, Sandhu, 1994, Gene 150:409-10, Pedersen et al., 1994, J. Mol. Biol. 235:959-73, Jones et al., 1986, Nature 321:522-525, Riechmann et al., 1988, Nature 332:323 y Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596. Con frecuencia, los restos de marco conservado en las regiones marco conservadas se sustituirán con el resto correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión a antígeno. Estas sustituciones de marco conservado se identifican por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por modelación de las interacciones de los restos de CDR y marco conservado para identificar restos de marco conservado importantes para la unión a antígeno y comparación de secuencias para identificar restos de marco conservado poco habituales en posiciones particulares (véase, por ejemplo, Queen et al., patente de los Estados Unidos N.º 5.585.089; publicaciones de patente de los Estados Unidos N.º 2004/0049014 y 2003/0229208; patentes de los Estados Unidos N.º 6.350.861; 6.180.370; 5.693.762; 5.693.761; 5.585.089; y 5.530.101 y Riechmann et al., 1988, Nature 332:323).

Los anticuerpos de la presente divulgación pueden producirse por cualquier método conocido en la técnica útil para la producción de polipéptidos, por ejemplo, síntesis *in vitro*, producción de ADN recombinante y similares. Preferentemente, los anticuerpos humanizados se producen por tecnología de ADN recombinante. Los anticuerpos de la divulgación pueden producirse usando tecnología de expresión de inmunoglobulina recombinante. La producción recombinante de moléculas de inmunoglobulina, incluyendo anticuerpos humanizados se describen en la patente de los Estados Unidos N.º 4.816.397 (Boss et al.), las patentes de los Estados Unidos N.º 6.331.415 y 4.816.567 (ambas de Cabilly et al.), la patente del Reino Unido GB 2.188.638 (Winter et al.) y la patente del Reino Unido GB 2.209.757. También pueden encontrarse técnicas para la expresión recombinante de inmunoglobulinas, incluyendo inmunoglobulinas humanizadas, en Goeddel et al., Gene Expression Technology Methods in Enzymology Vol. 185 Academic Press (1991) y Borreback, Antibody Engineering, W. H. Freeman (1992). Puede encontrarse

información adicional con respecto a la generación, el diseño y la expresión de anticuerpos recombinantes en Mayforth, Designing Antibodies, Academic Press, San Diego (1993).

Un proceso ejemplar para la producción de los anticuerpos quiméricos recombinantes de la divulgación puede comprender lo siguiente: a) construir, mediante métodos de biología molecular convencionales, un vector de expresión que codifica y expresa una cadena pesada de anticuerpo en la que las regiones CDR y variables del anticuerpo monoclonal murino anti B7-H1 (o anti PD-1) se fusionan con una región Fc obtenida de una inmunoglobulina humana, produciendo de este modo un vector para la expresión de una cadena pesada de anticuerpo quimérico; b) construir, mediante métodos de biología molecular convencionales, un vector de expresión que codifica y expresa una cadena ligera de anticuerpo del anticuerpo monoclonal murino anti B7-H1 (o anti PD-1), produciendo de este modo un vector para la expresión de cadena ligera de anticuerpo quimérico; c) transferir los vectores de expresión a una célula hospedadora mediante métodos de biología molecular convencionales para producir una célula hospedadora transfectada para la expresión de anticuerpos quiméricos; y d) cultivar la célula transfectada mediante técnicas de cultivo celular convencionales para producir anticuerpos quiméricos.

Un proceso ejemplar para la producción de los anticuerpos humanizados recombinantes de la divulgación puede comprender lo siguiente: a) construir, mediante métodos de biología molecular convencionales, un vector de expresión que codifica y expresa una cadena pesada de anticuerpo en la que las CDR y una parte mínima del marco conservado de región variable que son necesarias para conservar la especificidad de unión a anticuerpo donante se obtienen de una inmunoglobulina no humana, tal como el anticuerpo monoclonal murino anti B7-H1 (o anti PD-1), y el resto del anticuerpo se obtiene de una inmunoglobulina humana, produciendo de este modo un vector para la expresión de una cadena pesada de anticuerpo humanizado; b) construir, mediante métodos de biología molecular convencionales, un vector de expresión que codifica y expresa una cadena ligera de anticuerpo en la que las CDR y una parte mínima del marco conservado de región variable que son necesarias para conservar la especificidad de unión a anticuerpo donante se obtienen de una inmunoglobulina no humana, tal como el anticuerpo monoclonal murino anti B7-H1 (o anti PD-1), y el resto del anticuerpo se obtiene de una inmunoglobulina humana, produciendo de este modo un vector para la expresión de cadena ligera de anticuerpo humanizado; c) transferir los vectores de expresión a una célula hospedadora mediante métodos de biología molecular convencionales para producir una célula hospedadora transfectada para la expresión de anticuerpos humanizados; y d) cultivar la célula transfectada mediante técnicas de cultivo celular convencionales para producir anticuerpos humanizados.

Con respecto a cualquiera de los métodos ejemplares, las células hospedadoras pueden cotransfectarse con dichos vectores de expresión, que pueden contener diferentes marcadores seleccionables pero, con la excepción de las secuencias codificantes de cadena pesada y ligera, son preferentemente idénticos. Este procedimiento proporciona expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Como alternativa, puede usarse un vector individual que codifica polipéptidos de cadena tanto pesada como ligera. Las secuencias codificantes para las cadenas pesadas y ligeras pueden comprender ADNc o ADN genómico o ambos. La célula hospedadora usada para expresar el anticuerpo recombinante de la divulgación puede ser una célula bacteriana tal como *Escherichia coli,* o más preferentemente una célula eucariota (por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula HEK-293). La elección de vector de expresión depende de la elección de célula hospedadora y puede seleccionarse para tener la expresión y características reguladoras deseadas en la célula hospedadora seleccionada. Otras líneas celulares que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, CHO-K1, NSO y PER.C6 (Crucell, Leiden, Países Bajos). Además, el uso codónico puede optimizarse cuando la célula hospedadora se seleccione teniendo en cuenta la preferencia de uso codónico específica de especie. Por ejemplo, para expresión en células CHO el ADN que codifica los anticuerpos puede incorporar codones usados preferentemente por *Cricetulus griseus* (del que se obtienen células de ovario de hámster chino). Pueden emplearse métodos de optimización codónica para facilitar la expresión mejorada por una célula hospedadora deseada (véase, por ejemplo, Wohlgemuth, I. et al. (2011) "Evolutionary Optimization Of Speed And Accuracy Of Decoding On The Ribosome," Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 366(1580):2979-2986; Jestin, J.L. et al. (2009) "Optimization Models And The Structure Of The Genetic Code," J. Mol. Evol. 69(5):452-457; Bollenbach, T. et al. (2007) "Evolution And Multilevel Optimization Of The Genetic Code," Genome Res. 17(4):401-404; Kurland, C.G. et al. (1984) "Optimization Of Translation Accuracy," Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 31:191-219; Grosjean, H. et al. (1982) "Preferential Codon Usage In Prokaryotic Genes: The Optimal Codon-Anticodon Interactions Energy And The Selective Codon Usage In Efficiently Expressed Genes," Gene 18(3):199-209).

Puede usarse cualquiera de los anticuerpos anteriormente descritos para generar anticuerpos antiidiotípicos usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Greenspan, N.S. et al. (1989) "Idiotypes: Structure And Immunogenicity," FASEB J. 7:437-444; y Nisinoff, A. (1991) "Idiotypes: Concepts And Applications," J. Immunol. 147(8):2429-2438).

Las propiedades de unión de cualquiera de los anticuerpos anteriores pueden, si se desea, mejorarse adicionalmente explorando con respecto a variantes que muestren dichas características deseadas. Por ejemplo, dichos anticuerpos pueden generarse usando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica. En métodos de presentación en fagos, se presentan dominios de anticuerpos funcionales en la superficie de partículas de fagos que portan las secuencias de nucleótidos que los codifican. En un caso particular, dicho fago puede utilizarse para presentar dominios de unión a antígeno, tales como Fav y Fv o Fv estabilizado por enlaces

disulfuro, expresados a partir de un repertorio o una biblioteca de anticuerpos combinatoria (por ejemplo, humana o murina). El fago que expresa un dominio de unión a antígeno que se une con el antígeno de interés puede seleccionare o identificarse con antígeno, por ejemplo, usando antígeno marcado o antígeno unido o capturado en una superficie sólida o perla. Los fagos usados en estos métodos son típicamente fagos filamentosos, incluyendo fd y M13. Los dominios de unión a antígeno se expresan como una proteína fusionada de forma recombinante con el gen de fago III o la proteína de gen VIII. Los ejemplos de métodos de presentación en fagos que pueden usarse para preparar inmunoglobulinas, o fragmentos de las misma, de la presente divulgación incluyen los desvelados en Birkman, U. et al. (1995) "Phage Display Of Disulfide-Stabilized Fv Fragment," J. Immunol. Methods, 182:41-50, 1995; Ames, R.S. et al. (1995) "Conversion Of Murine Fabs Isolated From A Combinatorial Phage Display Library To Full Length Immunoglobulins," J. Immunol. Methods, 184:177-186; Kettleborough, C.A. et al. (1994) "Isolation Of Tumor Cell-Specific Single-Chain Fv From Immunized Mice Using Phage-Antibody Libraries And The ReConstruction Of Whole Antibodies From These Antibody Fragment," Eur. J. Immunol., 24:952-958, 1994; Persic, L. et al. (1997) "An Integrates Vector System For The Eukaryotic Expression Of Antibodies Or Their Fragments After Selection From Phage Display Libraries," Gene, 187:9-18; Burton, D.R. et al. (1994) "Human Antibodies From Combinatorial Libraries," Adv. Immunol. 57:191-280; publicaciones de PCT WO 92/001047; WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y patentes de los Estados Unidos N.º 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108

Como se ha descrito en las referencias anteriores, después de la selección de fagos, las regiones codificantes de anticuerpos del fago pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanizados, o cualquier otro fragmento deseado, y expresarse en cualquier hospedador deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levadura y bacterias, por ejemplo, como se describe en detalle posteriormente. Por ejemplo, también pueden emplearse técnicas para producir de forma recombinante fragmentos Fab, Fab' y $F(ab')_2$ usando métodos conocidos en la técnica tales como los desvelados en la publicación de PCT WO 92/22324; Mullinax, R.L. et al. (1992) "Expression Of A Heterodimeric Fab Antibody Protein In One Cloning Step," BioTechniques, 12(6):864-869; y Sawai et al. (1995) "Direct Production Of The Fab Fragment Derived From The Sperm Immobilizing Antibody Using Polymerase Chain Reaction And cDNA Expression Vectors," Am. J. Reprod. Immunol. 34:26-34; y Better, M. et al. (1988) "Escherichia coli Secretion Of An Active Chimeric Antibody Fragment," Science 240:1041-1043). Los ejemplos de técnicas que pueden usarse para producir Fv monocatenarios y anticuerpos incluyen las descritas en las patentes de los Estados Unidos N.º 4.946.778 y 5.258.498; Huston, J.S. et al. (1991) "Protein Engineering Of Single-Chain Fv Analogs And Fusion Proteins," Methods in Enzymology 203:46-88; Shu, L. et al., "Secretion Of A Single-Gene-Encoded Immunoglobulin From Myeloma Cells," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 90:7995-7999; y Skerra. A. et al. (1988) "Assembly Of A Functional Immunoglobulin Fv Fragment In Escherichia coli," Science 240:1038-1040.

Puede usarse tecnología de presentación en fagos para aumentar la afinidad de un anticuerpo de la divulgación por B7-H1 y/o PD-1. Esta técnica sería útil para obtener anticuerpos de alta afinidad que podrían usarse en los métodos combinatorios de la divulgación. Esta tecnología, denominada maduración de afinidad, emplea mutagénesis o avance y reselección de CDR usando dichos receptores o ligandos (o sus dominios extracelulares) o un fragmento antigénico de los mismos para identificar anticuerpos que se unen con mayor afinidad con el antígeno en comparación con el anticuerpo inicial o parental (véase, por ejemplo, Glaser, S.M. et al. (1992) "Antibody Engineering By Codon-Based Mutagenesis In A Filamentous Phage Vector System," J. Immunol. 149:3903-3913). La mutación de codones completos en lugar de nucleótidos individuales da como resultado un repertorio semialeatorio de mutaciones de aminoácidos. Pueden construirse bibliotecas que consisten en un grupo de clones variantes cada uno de los cuales difiere en una alteración de un único aminoácido en una única CDR y que contienen variantes que representan cada posible sustitución de aminoácidos para cada resto de CDR. Pueden explorarse mutantes con afinidad de unión aumentada por el antígeno poniendo en contacto los mutantes inmovilizados con antígeno marcado. Puede usarse cualquier método de exploración conocido en la técnica para identificar anticuerpos mutantes con avidez aumentada por el antígeno (por ejemplo, ELISA) (véase, por ejemplo, Wu, H. et al. (1998) "Stepwise In Vitro Affinity Maturation Of Vitaxin, An Alphav Beta3-Specific Humanized Mab," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95(11):6037-6042; Yelton, D.E. et al. (1995) "Affinity Maturation Of The BR96 Anti-Carcinoma Antibody By Codon-Based Mutagenesis," J. Immunol. 155:1994-2004). Puede usarse avance de CDR que selecciona aleatoriamente la cadena ligera (véase, Schier et al. (1996) "Isolation Of Picomolar Affinity Anti-C-Erbb-2 Single-Chain Fv By Molecular Evolution Of The Complementarity Determining Regions In The Center Of The Antibody Binding Site," J. Mol. Biol. 263:551-567).

La divulgación contempla por lo tanto el uso de mutagénesis aleatoria en concierto con métodos de presentación en fagos para identificar regiones CDR y/o variables mejoradas. Como alternativa puede usarse tecnología de presentación en fagos para aumentar (o reducir) la afinidad de CDR por mutagénesis dirigida (por ejemplo, maduración de afinidad o "avance de CDR"). Esta técnica usa el antígeno diana o un fragmento antigénico del mismo para identificar anticuerpos que tienen CDR que se unen con mayor (o menor) afinidad con el antígeno en comparación con el anticuerpo inicial o parental (véase, por ejemplo, Glaser, S.M. et al. (1992) "Antibody Engineering By Codon-Based Mutagenesis In A Filanaentous Phage Vector System," J. Immunol. 149:3903-3913). La mutación de codones completos en lugar de nucleótidos individuales da como resultado un repertorio semialeatorio de mutaciones de aminoácidos. Pueden construirse bibliotecas que consisten en un grupo de clones

variantes cada uno de los cuales difiere en una alteración de un único aminoácido en una única CDR y que contienen variantes que representan cada posible sustitución de aminoácidos para cada resto de CDR. Los mutantes con afinidad de unión aumentada (o reducida) por el antígeno pueden explorarse poniendo en contacto los mutantes inmovilizados con antígeno marcado. Puede usarse cualquier método de exploración conocido en la técnica para identificar anticuerpos mutantes con avidez aumentada (o reducida) por el antígeno (por ejemplo, ELISA (véase Wu, H. et al. (1998) "Stepwise In Vitro Affinity Maturation Of Vitaxin, An Alphav Beta3-Specific Humanized Mab," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95(11):6037-6042; Yelton, D.E. et al. (1995) "Affinity Maturation Of The BR96 Anti-Carcinoma Antibody By Codon-Based Mutagenesis," J. Immunol. 155:1994-2004). Puede usarse avance de CDR que selecciona aleatoriamente la cadena ligera (véase, Schier et al. (1996) "Isolation Of Picomolar Affinity Anti-C-Erbb-2 Single-Chain Fv By Molecular Evolution Of The Complementarity Determining Regions In The Center Of The Antibody Binding Site," J. Mol. Biol. 263:551-567).

Se describen métodos para conseguir dicha afinidad de maduración por ejemplo en: Krause, J.C. et al. (2011) "An Insertion Mutation That Distorts Antibody Binding Site Architecture Enhances Function Of A Human Antibody," MBio. 2(1) pii: e00345-10. doi: 10.1128/mBio.00345-10; Kuan, C.T. et al. (2010) "Affinity-Matured Anti-Glycoprotein NMB Recombinant Immunotoxins Targeting Malignant Gliomas And Melanomas," Int. J. Cancer 10,1002/ijc.25645; Hackel, B.J. et al. (2010) "Stability And CDR Composition Biases Enrich Binder Functionaliy Landscapes," J. Mol. Biol. 401(1):84-96; Montgomery, D.L. et al. (2009) "Affinity Maturation And Characterization Of A Human Monoclonal Antibody Against HIV-1 gp41," MAbs 1(5):462-474; Gustchina, E. et al. (2009) "Affinity Maturation By Targeted Diversification Of The CDR-H2 Loop Of A Monoclonal Fab Deprived Front A Synthetic Naïve Human Antibody Library And Directed Against The Internal Trimeric Coiled-Coil Of Gp41 Yields A Set Of Fabs With Improved HIV-1 Neutralization Potency And Breadth," Virology 393(1):112-119; Finlay, W.J. et al. (2009) "Affinity Maturation Of A Humanized Rat Antibody For Anti-RAGE Therapy: Comprehensive Mutagenesis Reveals A High Level Of Mutational Plasticity Both Inside And Outside The Complementarity-Determining Regions," J. Mol. Biol. 388(3):541-558; Bostrom, J. et al. (2009) "Improving Antibody Binding Affinity And Specificity For Therapeutic Development," Methods Mol. Biol. 525:353-376; Steid1, S. et al. (2008) "In Vitro Affinity Maturation Of Human GM-CSF Antibodies By Targeted CDR-Diversification," Mol. Immunol. 46(1):135-144; y Barderas, R. et al. (2008) "Affinity maturation of antibodies assisted by in silico modeling," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 105(26):9029-9034.

La divulgación contempla particularmente la producción y el uso de "derivados" de cualquiera de los anticuerpos anteriormente descritos y sus fragmentos de unión a antígeno. El término "derivado" se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une de forma inmunoespecífica con un antígeno pero que comprende, uno, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones, supresiones o modificaciones de aminoácidos en relación con una molécula "parental" (o de tipo silvestre). Dichas sustituciones o adiciones de aminoácidos pueden introducir restos de aminoácidos de origen natural (es decir, codificados por ADN) o de origen no natural. Dichos aminoácidos pueden estar glucosilados (por ejemplo, tener contenido de manosa, 2-N-acetilglucosamina, galactosa, fucosa, glucosa, ácido siálico, ácido 5-N-acetilneuramínico, ácido 5-glicolneuramínico, etc. alterado), acetilados, pegilados, fosforilados, amidados, derivatizados mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unidos a un ligando celular u otra proteína, etc. En algunos casos, las modificaciones de carbohidratos alterados modulan una o más de las siguientes: solubilización del anticuerpo, facilitación del transporte subcelular y la secreción del anticuerpo, promoción del ensamblaje del anticuerpo, integridad conformacional y función efectora mediada por anticuerpo. En un caso específico, las modificaciones de carbohidratos alterados potencian la función efectora mediada por anticuerpo en relación con el anticuerpo que carece de la modificación de carbohidratos. Se conocen bien en la técnica modificaciones de carbohidratos que conducen a función efectora mediada por anticuerpo alterada (por ejemplo, véase Shields, R.L. et al. (2002) "Lack Of Fucose On Human IgG N-Linked Oligosaccharide Improves Binding To Human Fcgamma RIII And Antibody-Dependent Cellular Toxicity.," J. Biol. Chem. 277(30): 26733-26740; Davies J. et al. (2001) "Expression Of GnTIII In A Recombinant Anti-CD20 CHO Production Cell Line: Expression Of Antibodies With Altered Glycoforms Leads To An Increase In ADCC Through Higher Affinity For FC Gamma RIII," Biotechnology & Bioengineering 74(4): 288-294). Los expertos en la materia conocen métodos para alterar los contenidos de carbohidratos, véase, por ejemplo, Wallick, S.C. et al. (1988) "Glycosylation Of A VH Residue Of A Monoclonal Antibody Against Alpha (1----6) Dextran Increases Its Affinity For Antigen," J. Exp. Med. 168(3): 1099-1109; Tao, M.H. et al. (1989) "Studies Of Aglycosylated Chimeric Mouse-Human IgG. Role Of Carbohydrate In The Structure And Effector Functions Mediated By The Human IgG Constant Region," J. Immunol. 143(8): 2595-2601; Routledge, E.G. et al. (1995) "The Effect Of Aglycosylation On The Immunogenicity Of A Humanized Therapeutic CD3 Monoclonal Antibody," Transplantation 60(8):847-53; Elliott, S. et al. (2003) "Enhancement Of Therapeutic Protein In Vivo Activities Through Glycoengineering," Nature Biotechnol. 21:414-21; Shields, R.L. et al. (2002) "Lack Of Fucose On Human IgG N-Linked Oligosaccharide Improves Binding To Human Fcganama RIII And Antibody-Dependent Cellular Toxicity.," J. Biol. Chem. 277(30): 26733-26740).

En algunos casos, un anticuerpo humanizado es un derivado. Dicho anticuerpo humanizado comprende sustituciones, supresiones o adiciones de restos de aminoácidos en una o más CDR no humanas. El derivado de anticuerpo humanizado puede tener sustancialmente la misma unión, mejor unión o peor unión en comparación con un anticuerpo humanizado no derivado. En casos específicos, uno, dos, tres, cuatro o cinco restos de aminoácidos de la CDR se han sustituido, suprimido o añadido (es decir, mutado).

Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo derivado puede modificarse por modificaciones químicas usando técnicas conocidas por los expertos en la materia, incluyendo, pero sin limitación, escisión química específica, acetilación, formulación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. En un caso, un derivado de anticuerpo poseerá una función similar o idéntica al anticuerpo parental. En otro caso, un derivado de anticuerpo mostrará una actividad alterada en relación con el anticuerpo parental. Por ejemplo, un anticuerpo derivado (o fragmento del mismo) puede unirse con su epítopo más estrechamente o ser más resistente a proteólisis que el anticuerpo parental.

Las sustituciones, adiciones o supresiones en los anticuerpos derivatizados pueden estar en la región Fc del anticuerpo y pueden servir por lo tanto para modificar la afinidad de unión del anticuerpo con uno o más FcγR. Se conocen en la técnica métodos para modificar anticuerpos con unión modificada a uno o más FcγR, véase, por ejemplo, publicaciones de PCT N.º WO 04/029207, WO 04/029092, WO 04/028564, WO 99/58572, WO 99/51642, WO 98/23289, WO 89/07142, WO 88/07089 y patentes de los Estados Unidos N.º 5.843.597 y 5.642.821. En algunos casos, la divulgación abarca anticuerpos que tienen afinidad alterada por un FcγR activador, por ejemplo, FcγRIIIA. Preferentemente dichas modificaciones también tienen una función efectora mediada por Fc alterada. Se conocen bien en la técnica modificaciones que afectan a la función efectora mediada por Fc (véase patente de los Estados Unidos N.º 6.194.551 y documento WO 00/42072). En un caso particular, la modificación de la región Fc da como resultado un anticuerpo con una función efectora mediada por anticuerpo alterada, una unión alterada con otros receptores de Fc (por ejemplo, receptores de activación de Fc), una citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) alterada, una actividad de unión a C1q alterada, una actividad de citotoxicidad dependiente del complemento alterada (CDC), una actividad fagocítica o cualquier combinación de las mismas.

Pueden usarse anticuerpos derivatizados para alterar las semividas (por ejemplo, semividas en suero) de anticuerpos parentales en un mamífero, preferentemente un ser humano. Preferentemente dicha alteración dará como resultado una semivida de más de 15 días, preferentemente mayor de 20 días, mayor de 25 días, mayor de 30 días, mayor de 35 días, mayor de 40 días, mayor de 45 días, mayor de 2 meses, mayor de 3 meses, mayor de 4 meses o mayor de 5 meses. Las semividas aumentadas de los anticuerpos humanizados de la presente divulgación o fragmentos de los mismos en un mamífero, preferentemente un ser humano, dan como resultado un mayor título en suero de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo en el mamífero y, por lo tanto, reducen la frecuencia de la administración de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo y/o reducen la concentración de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo para administrar. Pueden generarse anticuerpos o fragmentos de los mismos que tienen semividas *in vivo* aumentadas por técnicas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, pueden generarse anticuerpos o fragmentos de los mismos con semividas *in vivo* aumentadas modificando (por ejemplo, sustituyendo, suprimiendo o añadiendo) restos de aminoácidos identificados como implicados en la interacción entre el dominio Fc y el receptor FcRn. Los anticuerpos humanizados de la divulgación pueden modificarse técnicamente para aumentar las semividas biológicas (véase, por ejemplo, patente de los Estados Unidos N.º 6.277.375). Por ejemplo, los anticuerpos humanizados de la divulgación pueden modificarse técnicamente en el dominio de bisagra-Fc para tener semividas *in vivo* o en suero aumentadas.

Pueden generarse anticuerpos o fragmentos de los mismos con semividas *in vivo* aumentadas uniendo a dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo moléculas poliméricas tales como polietilenglicol (PEG) de alto peso molecular. El PEG puede unirse con dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo con o sin un enlazador multifuncional mediante conjugación específica de sitio del PEG con el extremo N o C de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo o mediante grupos amino épsilon presentes en restos de lisina. Se usará derivatización de polímeros lineales o ramificados que dé como resultado pérdida mínima de actividad biológica. El grado de conjugación se supervisará estrechamente mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas para asegurar la conjugación apropiada de moléculas de PEF con los anticuerpos. Puede separarse PEG que no ha reaccionado de conjugados de anticuerpo-PEG mediante, por ejemplo, exclusión por tamaños o cromatografía de intercambio iónico.

Los anticuerpos de la divulgación también pueden modificarse por los métodos y agentes de acoplamiento descritos por Davis *et al.* (véase patente de los Estados Unidos N.º 4.179.337) para proporcionar composiciones que pueden inyectarse en el sistema circulatorio de mamífero sin sustancialmente ninguna respuesta inmunogénica.

La divulgación abarca modificación de restos de marco conservado de los anticuerpos humanizados de la divulgación. Los restos de marco conservado en las regiones marco conservadas pueden sustituirse con el resto correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión a antígeno. Estas sustituciones de marco conservado se identifican por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por modelación de las interacciones de los restos de CDR y marco conservado para identificar restos de marco conservado importantes para la unión a antígeno y comparación de secuencias para identificar restos de marco conservado poco habituales en posiciones particulares. (Véase, por ejemplo, patente de los Estados Unidos N.º 5.585.089; y Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies For Therapy," Nature 332:323-327).

La presente divulgación también abarca anticuerpos anti B7-H1 humano y anti PD-1 humano (y, más preferentemente, anticuerpos humanizados) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se fusionan de forma recombinante o se conjugan químicamente (incluyendo conjugaciones tanto covalentes como no covalentes) con una molécula heteróloga (es decir, una molécula no relacionada). No es necesario que la fusión sea necesariamente directa, sino que puede producirse a través de secuencias enlazadoras.

La parte Fc de la proteína de fusión puede variarse por isotipo o subclase, puede ser quimérica o híbrida y/o puede modificarse, por ejemplo para mejorar las funciones efectoras, control de la semivida, accesibilidad tisular, aumentar las características biofísicas tales como estabilidad y mejorar la eficacia de producción (y de forma más económica). Se conocen en la técnica muchas modificaciones útiles en la construcción de proteínas de fusión desveladas y métodos para prepararlas, véase por ejemplo Mueller, J.P. et al. (1997) "Humanized Porcine VCAM-Specific Monoclonal Antibodies With Chimeric Igg2/G4 Constant Regions Block Human Leukocyte Binding To Porcine Endothelial Cells," Mol. Immun. 34(6):441-452, Swann, P.G. (2008) "Considerations For The Development Of Therapeutic Monoclonal Antibodies," Curr. Opin. Immun. 20:493-499 (2008) y Presta, L.G. (2008) "Molecular Engineering And Design Of Therapeutic Antibodies," Curr. Opin. Immun. 20:460-470. En algunos casos la región Fc es la región Fc de IgG1, IgG2 o IgG4 nativa. En algunos casos la región Fc es una híbrida, por ejemplo una quimérica que consiste en regiones constantes de Fc IgG2/IgG4. Las modificaciones a la región Fc incluyen, pero sin limitación, IgG4 modificado para evitar la unión con receptores Fc gamma y el complemento, IgG1 modificado para mejorar la unión con uno o más receptores Fc gamma, IgG1 modificado para minimizar la función efectora (cambios de aminoácidos), IgG1 con glucano alterado/sin glucano (típicamente cambiando el hospedador de expresión) e IgG1 con unión a FcRn dependiente de pH alterada. La región Fc puede incluir la región bisagra completa o menos que la región bisagra completa.

El resultado terapéutico en pacientes tratados con rituximab (un anticuerpo monoclonal IgG1 quimérico de ratón/humano contra CD20) para linfoma no hodgkiniano o macroglobulinemia de Waldenstrom se correlacionó con la expresión del individuo de variantes alélicas de receptores Fcγ con distintas afinidades intrínsecas para el dominio Fc de IgG1 humano. En particular, pacientes con alelos de alta afinidad del receptor de Fc activador de baja afinidad CD16A (FcγRIIIA) mostraron mayores tasas de respuesta y, en casos de linfoma no hodgkiniano, supervivencia sin progresión mejorada. En otro caso, el dominio Fc puede contener una o más inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos que reducen la unión con el receptor de Fc inhibidor de baja afinidad CD32B (FcγRIIB) y conservan los niveles de tipo silvestre de unión o potencian la unión con el receptor de Fc activador de baja afinidad CD16A (FcγRIIIA).

Otro caso incluye híbridos de IgG2-4 y mutantes de IgG4 que tienen unión reducida con FcR que aumentan su semivida. Se describen híbridos de IG2-4 y mutantes de IgG4 en Angal, S. et al. (1993) "A Single Amino Acid Substitution Abolishes The Heterogeneity Of Chimeric Mouse/Human (IgG4) Antibody," Molec. Immunol. 30(1):105-108; Mueller, J.P. et al. (1997) "Humanized Porcine VCAM-Specific Monoclonal Antibodies With Chimeric IgG2/G4 Constant Regions Block Human Leukocyte Binding To Porcine Endothelial Cells," Mol. Immun. 34(6):441-452; y la patente de los Estados Unidos N.º 6.982.323. En algunos casos el dominio IgG1 y/o IgG2 se suprime, por ejemplo, Angal et al. describen IgG1 e IgG2 que tienen serina 241 reemplazada con una prolina.

En un caso preferido, el dominio Fc contiene inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos que potencian la unión con CD16A. Se conocen en la técnica un gran número de sustituciones en el dominio Fc de IgG1 humano que aumentan la unión con CD16A y reducen la unión con CD32B y se describen en Stavenhagen, J.B. et al. (2007) "Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fcgamma Receptors," Cancer Res. 57(18):8882-8890. Las variantes ejemplares de dominios Fc IgG1 humanos con unión reducida a CD32B y/o unión aumentada a CD16A contienen sustituciones F243L, R929P, Y300L, V305I o P296L. Estas sustituciones de aminoácidos pueden estar presentes en un dominio Fc IgG1 humano en cualquier combinación. En un caso, la variante de dominio Fc IgG1 humano contiene una sustitución F243L, R929P y Y300L. En otro caso, la variante de dominio Fc IgG1 humano contiene una sustitución F243L, R929P, Y300L, V305I y P296L. En otro caso, la variante de dominio Fc IgG1 humano contiene una sustitución N297Q, ya que esta mutación anula la unión a FcR.

En un caso dichas moléculas heterólogas son polipéptidos que tienen al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos. Dichas moléculas heterólogas pueden ser como alternativa enzimas, hormonas, receptores de superficie celular, restos farmacológicos, tales como: toxinas (tales como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas (es decir, PE-40), toxina diftérica, ricina, gelonina o proteína antivírica de ombú), proteínas (tales como factor de necrosis tumoral, interferón (por ejemplo interferón α, interferón β), factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador de plasminógeno tisular o un agente apoptótico (por ejemplo, factor de necrosis tumoral α, factor de necrosis tumoral β)), modificadores de la respuesta biológica (tales como, por ejemplo, una linfocina (por ejemplo, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6")), factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulante de las colonias de granulocitos ("G-CSF") o factor estimulante de colonias de macrófagos, ("M-CSF")), o factores de crecimiento (por ejemplo, hormona del crecimiento ("GH"))), citotoxinas (por ejemplo, un agente citostático o citocida, tal como paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorrubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, monometil auristatina F (MMAF), monometil auristatina E (MMAE; por ejemplo, vedotina) y puromicina y análogos u homólogos de los mismos), antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, BiCNU® (carmustina; BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina-platino (II) (DDP)

cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorrubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) o agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Se conocen bien técnicas para conjugar dichos restos terapéuticos con anticuerpos; véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Reisfeld et al. (eds.), 1985, págs. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en CONTROLLED DRUG DELIVERY (2ª Ed.), Robinson et al. (eds.), 1987, págs. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en MONOCLONAL ANTIBODIES '84: BIOLOGICAL AND CLINICAL APPLICATIONS, Pinchera et al. (eds.), 1985, págs. 475-506); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en MONOCLONAL ANTIBODIES FOR CANCER DETECTION AND THERAPY, Baldwin et al. (eds.), 1985, págs. 303-16, Academic Press; Thorpe et al. (1982) "The Preparation And Cytotoxic Propertied Of Antibody-Toxin Conjugates," Immunol. Rev. 62:119-158; Carter, P.J. et al. (2008) "Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy," Cancer J. 14(3):154-169; Alley, S.C. et al. (2010) "Antibody-Drug Conjugates: Targeted Drug Delivery For Cancer," Curr. Opin. Chem. Biol. 14(4):529-537; Carter, P. et al. (2005) "Designer Antibody-Based Therapeutics For Oncology," Amer. Assoc. Cancer Res. Educ. Book. 2005(1):147-154; Carter, P.J. et al. (2008) "Antibody-Drug Conjugates For Cancer Therapy," Cancer J. 14(3):154-169; Chari, R.V.J. (2008) "Targeted Cancer Therapy: Conferring Specificity To Cytotoxic Drugs," Acc. Chem Res. 41(1):98-107; Doronina, S.O. et al. (2003) "Development Of Potent Monoclonal Antibody Auristatin Conjugates For Cancer Therapy," Nat. Biotechnol. 21(7):778-784; Ducry, L. et al. (2010) "Antibody-Drug Conjugates: Linking Cytotoxic Payloads To Monoclonal Antibodies," Bioconjug Chem. 21(1):5-13; Senter, P.D. (2009) "Potent Antibody Drug Conjugates For Cancer Therapy," Curr. Opin. Chem. Biol. 13(3):235-244; y Teicher, B.A. (2009) "Antibody-Drug Conjugate Targets," Curr Cancer Drug Targets. 9(8):982-1004.

Cualquiera de las moléculas de la presente divulgación puede fusionarse con secuencias marcadoras, tales como un péptido, para facilitar la purificación. En casos preferidos, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexahistidina, el marcador de hemaglutinina "HA", que corresponde a un epítopo obtenido de la proteína de hemaglutinina de la gripe (Wilson, I.A. et al. (1984) "The Structure Of An Antigenic Determinant In A Protein," Cell, 37:767-778) y el marcador "flag" (Knappik, A. et al. (1994) "An Improved Affinity Tag Based On The FLAG Peptide For The Detection And Purification Of Recombinant Antibody Fragments," Biotechniques 17(4):754-761).

La presente divulgación también abarca anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno que se conjugan con un agente de diagnóstico o terapéutico o cualquier otra molécula para la que se desea aumentar la semivida en suero. Los anticuerpos pueden usarse para diagnóstico (*in vivo*, *in situ* o *in vitro*) para, por ejemplo, supervisar el desarrollo o la progresión de una enfermedad, un trastorno o una infección como parte de un procedimiento de ensayo clínico para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento concreto. La detección puede facilitarse acoplando el anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse ya sea de manera directa al anticuerpo o de manera indirecta, a través de un intermedio (tal como, por ejemplo, un enlazador conocido en la técnica) usando técnicas conocidas en la materia. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N.º 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso como agentes de diagnóstico según la presente divulgación. Dicho diagnóstico y detección pueden conseguirse acoplando el anticuerpo con sustancias detectables incluyendo, pero sin limitación, diversas enzimas, incluyendo las enzimas, pero sin limitación, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; complejos de grupos prostéticos tales como, pero sin limitación, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes tales como, pero sin limitación, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; material luminiscente tal como, pero sin limitación, luminol; materiales bioluminiscentes tales como, pero sin limitación, luciferasa, luciferina y aecuorina; material radiactivo tal como, pero sin limitación, bismuto (^{213}Bi), carbono (^{14}C), cromo (^{51}Cr), cobalto (^{17}Co), flúor (^{18}F), gadolinio (^{153}Gd, ^{159}Gd), galio (^{68}Ga, ^{67}Ga), germanio (^{68}Ge), holmio (^{166}Ho), indio (^{115}In, ^{113}In, ^{112}In, ^{111}In), yodo (^{131}I, ^{125}I, ^{123}I, ^{121}I), lantanio (^{140}La), lutecio (^{177}Lu), manganeso (^{54}Mn), molibdeno (^{99}Mo), paladio (^{103}Pd), fósforo (^{32}P), praseodimio (^{142}Pr), prometio (^{149}Pm), renio (^{186}Re, ^{188}Re), rodio (^{105}Rh), rutenio (^{97}Ru), samario (^{153}Sm), escandio (^{47}Sc), selenio (^{75}Se), estroncio (^{85}Sr), azufre (^{35}S), tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Ti), estaño (^{113}Sn, ^{117}Sn), tritio (^{3}H), xenón (^{133}Xe), iterbio (^{169}Yb, ^{175}Yb), itrio (^{90}Y), cinc (^{65}Zn); metales emisores de positrones usando diversas tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos.

Las moléculas de la presente divulgación pueden conjugarse con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo como describe Segal en la patente de los Estados Unidos N.º 4.676.980. Dichos anticuerpos heteroconjugados pueden unirse adicionalmente con haptenos (tales como fluoresceína, etc.), o con marcadores celulares (por ejemplo 4-1-BB, B7-H4, CD4, CD8, CD14, CD25, CD27, CD40, CD68, CD163, CTLA4, GITR, LAG-3, OX40, TIM3, TIM4, TLR2, LIGHT, ICOS, B7-H3, B7-H7, B7-H7CR, CD70, CD47, etc.) o con citocinas (por ejemplo, IL-7, IL-15, IL-12, IL-4 TGF-beta, IL-10, IL-17, IFNγ, Flt3, BLys) o quimiocinas (por ejemplo, CCL21), etc.

Las moléculas de la presente divulgación pueden unirse a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana o de otras moléculas que son capaces de unirse con antígeno diana que se ha inmovilizado en el soporte mediante unión con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente divulgación. Dichos soportes sólidos incluyen, pero sin limitación, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nailon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

La presente divulgación incluye adicionalmente moléculas de ácido nucleico (ADN o ARN) que codifican cualquiera de dichos anticuerpos, proteínas de fusión o fragmentos, así como moléculas vectores (tales como plásmidos) que tienen capacidad de transmisión o replicación de dichas moléculas de ácido nucleico. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios, bicatenarios, pueden contener partes tanto monocatenarias como bicatenarias.

A. Composiciones moduladoras preferidas de la presente divulgación

La divulgación se refiere en particular a anticuerpos que se unen de forma inmunoespecífica con B7-H1 o con PD-1 y/o modulan la capacidad de B7-H1 para unirse con PD-1 en un sujeto. Como se usa en el presente documento, un "sujeto" es preferentemente un mamífero tal como uno distinto de primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) y un primate (por ejemplo, mono y ser humano), más preferentemente un ser humano. La divulgación se refiere por lo tanto particularmente a anticuerpos humanizados, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen de forma inmunoespecífica a B7-H1 humano o a PD-1 humano y modulan la capacidad de B7-H1 para unirse con PD-1 en un ser humano o en tejido humano (*in situ* o *ex vivo).*

Más preferentemente, dichos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno poseerán suficiente avidez para modular la capacidad de B7-H1 (especialmente cuando se expresa a una concentración endógena y) dispuesto en la superficie de APC de un sujeto para unirse con PD-1 (especialmente cuando se expresan a una concentración endógena y) dispuesto en la superficie de un linfocito T de dicho sujeto y viceversa. La expresión "concentración endógena" se refiere al nivel al que una molécula endógena se expresa de forma nativa (es decir, en ausencia de vectores de expresión o promotores recombinantes) en una célula normal, cancerosa o infectada.

En un caso, dicha modulación comprenderá inhibir o interferir de otro modo con la unión de dicho B7-H1 (preferentemente expresado de forma endógena y) dispuesto y dicho PD-1 (preferentemente expresado de forma endógena y) dispuesto. En un caso alternativo, dicha modulación comprenderá una mejora o facilitará de otro modo la unión de B7-H1 expresado de forma endógena y dispuesto y PD-1 expresado de forma endógena y dispuesto. En otro caso más, dicha modulación incluye agonismo directo por el que la unión del anti B7-H1 o anti PD-1 desencadena transducción de señal mediante el receptor correspondiente.

(1) Anticuerpos anti B7-H1 humano preferidos y sus CDR

De acuerdo con la presente divulgación, dichas moléculas pueden producirse explorando líneas de hibridoma con respecto a las que producen anticuerpos que son inmunoespecíficos para B7-H1 humano y después explorando opcionalmente entre dichas líneas con respecto a las que muestran actividad moduladora (por ejemplo, actividad neutralizante, actividad agonista, actividad transductora de señal alterada, etc.). La divulgación proporciona particularmente clones anti B7-H1 humano: 1E12, 1F4, 2G11, 3B6 y 3D10.

Los anticuerpos expresados por los clones anti B7-H1 humano se secuenciaron para revelar sus dominios variables. Las secuencias de CDR se muestran en negrita y subrayadas:

Clon anti B7-H1 humano 1E12

Región variable de cadena ligera:

DIVMTQSHKL MSTSVGDRVS ITC**KASQDVG TAVA**WYQQKP GQSPKLLIY**W**
ASTRHTGVPD RFTGSGSGTD FTLTISNVQS EDLADYFC**QQ DSSYPLT**FGA
GTKVELK **(SEQ ID NO:1)**

Región variable de cadena pesada:

EVKLQESGPS LVKPSQTLSL TCSVT**GYSIT SDYWN**WIRKF PGNKLEYVG**Y**
ISYTGSTYYN PSLKSRISIT RDTSKNQYYL QLNSVTSEDT ATYYCAR**YGG**
WLSPFDYWGQ GTTLTVSS **(SEQ ID NO:2)**

Clon anti B7-H1 humano 1F4

Región variable de cadena ligera:

DIVTTQSHKL MSTSVGDRVS ITC**KASQDVG TAVA**WYQQKP GQSPKLLIY**W**
ASTRHTGVPD RFTGSGSGTD FTLTISNVQS EDLADYFC**QQ DSSYPLT**FGA
GTKVELK **(SEQ ID NO:3)**

Región variable de cadena pesada:

EVQLQESGPG LVAPSQSLSI TCTVS**GFSLT TYSIN**WIRQP PGKGLEWLG**V**
MWAGGGTNSN SVLKSRLIIS KDNSKSQVFL KMNSLQTDDT ARYYCAR**YYG**
NSPYYAIDYW GQGTSVTVSS **(SEQ ID NO:4)**

Clon anti B7-H1 humano 2G11

Región variable de cadena ligera:

DIVMTQSPSS LAVSVGEKVS MGC**KSSQSLL YSSNQKNSLA** WYQQKPGQSP
KLLID**WASTR ES**GVPDRFTG SGSGTDFTLT ISSVKAEDLA VYYC**QQYYGY**
PLTFGAGTKL ELK **(SEQ ID NO:5)**

Región variable de cadena pesada:

EVKLQESGPS LVKPSQTLSL TCSVT**GYSII SDYWN**WIRKF PGNKLEYLG**Y**
ISYTGSTYYN PSLKSRISIT RDTSKNQYYL QLNSVTTEDT ATYYCA**RRGG**
WLLPFDYWGQ GTTLTVSS **(SEQ ID NO:6)**

Clon anti B7-H1 humano 3B6

Región variable de cadena ligera:

DIVMTQSPAI MSASPGEKVT MTC**SASSSIR YMH**WYQQKPG TSPKRWIS**DT**
SKLTSGVPAR FSGSGSGTSY ALTISSMEAE DAATYYC**HQR SSYPWT**FGGG
TKLEIK **(SEQ ID NO:7)**

Región variable de cadena pesada:

EVKLQESGPS LVKPGASVKL SCKAS**GYTFT SYDIN**WVKQR PGQGLEWIG**W**
IFPRDNNTKY NENFKGKATL TVDTSSTTAY MELHSLTSED SAVYFCTK**EN**
WVGDFDYWGQ GTTLTLSS **(SEQ ID NO:8)**

Clon anti B7-H1 humano 3D10:

Región variable de cadena ligera:

QIVLSQSPAI LSASPGEKVT MTC**RASSSVS YIY**WFQQKPG SSPKPWIY**AT**
FNLASGVPAR FSGSGSGTSY SLTISRVETE DAATYYC**QQW SNNPLT**FGAG
TKLELK **(SEQ ID NO:9)**

Región variable de cadena pesada:

EVQLQQSGPD LVTPGASVRI SCQAS**GYTFP DYYMN**WVKQS HGKSLEWIG**D**
IDPNYGGTTY NQKFKGKAIL TVDRSSSTAY MELRSLTSED SAVYYCAR**GA**
LTDWGQGTSL TVSS **(SEQ ID NO:10)**

(2) Anticuerpos anti PD-1 humano preferidos y sus CDR

Como alternativa dichos anticuerpos pueden producirse explorando líneas de hibridoma con respecto a las que producen anticuerpos que son inmunoespecíficos para PD-1 humano y después explorando entre dichas líneas con respecto a las que muestran actividad moduladora (por ejemplo, actividad neutralizante, actividad agonista, actividad transductora de señal alterada, etc.). La divulgación proporciona particularmente clones anti PD-1 humano: 1E3, 1E8 y 1H3.

Los anticuerpos expresados por los clones anti PD-1 humano se secuenciaron para revelar sus dominios variables. Las secuencias de CDR se muestran en negrita y subrayadas:

Clon anti PD-1 humano 1E3:

Región variable de cadena ligera:

DIQMTQFPSS LCASQGGKVT VTC**KASQDIN NYMA**WYQHKP GKGPRLLIH**Y**
TSTLLSGIPS RFSGSGSGRD YSFSISNLEP EDIATYYC**LQ YDNLWT**FGGG
TKLEIK **(SEQ ID NO:11)**

Región variable de cadena pesada:

EVQLQQSGPV LVKPGASVKM SCKAS**GYTFT DYYMN**WVKQS HGKSLEWIG**N**
INPYNGGTTY NQKFKGKATL TVDKSSRTAY MEINSLTSED SAVYYCAR**GR**
IYDGSLDYWG QGTALTVSS **(SEQ ID NO:12)**

Clon anti PD-1 humano 1E8:

Región variable de cadena ligera:

DIVMTQSQKF MSTSVGDRVS VTC**KASQSVD TNVA**WYQQKP GQSPKALIF**S**
ASYRYSGVPD RFTGSGSGTD FTLTINSVQS EDLAEYFC**QQ YNSYPYT**FGS
GTKLEIK **(SEQ ID NO:13)**

Región variable de cadena pesada:

QVQLQQSGAE LAKPGASVRL SCKAS**GYTFT NYWMH**WVKQR PGQGLEWIG**H**
INPSSGFTTY NQNFKDKATL TADKSSNTAY MQLSSLTYED SAVYFCAR**ED**
YDVDYWGQGT TLTVSS **(SEQ ID NO:14)**

Clon anti PD-1 humano 1H3:

Región variable de cadena ligera:

QIVLTQSPAL MSASPGEKVT MTC**SASSSVS YMY**WYQQKPR SSPKPWIY**LT**
SNLASGVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMEAE DAATYYC**QQW SSNPFT**FGSG
TKLEIK **(SEQ ID NO:15)**

Región variable de cadena pesada:

EVQLVESGGG LVKPGGSLKL SCAAS**GFTFS DYGMH**WVRQA PEKGLEWVA**Y**
ISSGSYTIYY TDTVKGRFTI SRDNAKNTLF LQMTSLRSED TAMYYCAR**RG**
YGSFYEYYFD YWGQGTTLTV SS **(SEQ ID NO:16)**

(3) CDR consenso de los anticuerpos anti B7-H1 humano y anti PD-1 humano de la presente divulgación

Se realizaron análisis de las CDR de los anticuerpos identificados para identificar secuencias de CDR consenso y secuencias de CDR variantes probables que proporcionarían atributos de unión similares. Dichas CDR variantes se calcularon usando análisis de Blosum62.iij según la Tabla 1. La Tabla 1 presenta las puntuaciones de sustitución de Blosum62.iij. Cuanto mayor sea la puntuación más conservativa será la sustitución y por lo tanto más probable será que la sustitución no afecte a la función.

Tabla 1

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	+4	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	0	-3	-2	0
R	-1	+5	0	-2	-3	+1	0	-2	0	-3	-2	+2	-1	-3	-2	-1	-1	-3	-2	-3
N	-2	0	+6	+1	-3	0	0	0	+1	-3	-3	0	-2	-3	-2	+1	0	-4	-2	-3
D	-2	-2	+1	+6	-3	0	+2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-3	-1	0	-1	-4	-3	-3
C	0	-3	-3	-3	+9	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1
Q	-1	+1	0	0	-3	+5	+2	-2	0	-3	-2	+1	0	-3	-1	0	-1	-2	-1	-2
E	-1	0	0	+2	-4	+2	+5	-2	0	-3	-3	+1	-2	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	+6	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-2	-3	-3
H	-2	0	+1	-1	-3	0	0	-2	+8	-3	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-2	+2	-3
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	+4	+2	-3	+1	0	-3	-2	-1	-3	-1	+3
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	+2	+4	-2	+2	0	-3	-2	-1	-2	-1	+1
K	-1	+2	0	-1	-3	+1	+1	-2	-1	-3	-2	+5	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	+1	+2	-1	+5	0	-2	-1	-1	-1	-1	+1
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	+6	-4	-2	-2	+1	+3	-1
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	+7	-1	-1	-4	-3	-2
S	+1	-1	+1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	+4	+1	-3	-2	-2
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	+5	-2	-2	0
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	+1	-4	-3	-2	+11	+2	-3
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	+2	-1	-1	-2	-1	+3	-3	-2	-2	+2	+7	-1
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	+3	+1	-2	+1	-1	-2	-2	0	-3	-1	+4

La presente divulgación permite la formación de nuevos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que tienen 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR variantes. Debido a que los métodos de la presente divulgación han identificado un número sustancial de CDR distintas, la divulgación permite un reconocimiento de restos de CDR que probablemente sean necesarios en cualquier variante de una CDR identificada particular. Dichos restos se muestran en negrita en la Tabla 2, Tabla 3, Tabla 4 y Tabla 5. Para los restos que se ha descubierto que varían entre las CDR comparadas, las puntuaciones de sustitución de la Tabla 1 proporcionan un medio para determinar las identidades de sustituciones permitidas. Por ejemplo, si se ha descubierto que un resto particular de una CDR particular varía como R o S, entonces ya que R y S tienen una puntuación de sustitución de -1, cualquier sustitución de R o S que tenga una puntuación de sustitución de -1 o mayor tiene tanta probabilidad como las variantes observadas (R o S) (o tienen más probabilidad que R o S) de crear una CDR variante que tenga atributos de unión que sean suficientemente similares a los de la CDR particular para permitir que la CDR variante se emplee en lugar de la misma para formar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno anti B7-H1 o anti PD-1 funcional. Para cada posición, se prefiere la selección de un resto que tenga una mayor puntuación de sustitución frente a la selección de un resto que tenga una menor puntuación de sustitución.

La Tabla 2 presenta un análisis de las CDR de cadena ligera de los anticuerpos anti B7-H1 y proporciona la secuencia consenso de las CDR anti B7-H1 de cadena ligera variantes observadas y preferidas de la presente divulgación.

Tabla 2: CDR de cadena ligera anti B7-H1 humano														
CDR1 de cadena ligera														
Anticuerpo	Secuencia													SEQ ID NO
3D10	R	A	S	S			S	V	S	Y	I	Y		17
3B6	S	A	S	S			S	I	R	Y	M	H		18
1E12	K	A	S	Q		D	V	G	T	A	V	A		19
2G11	K	S	S	Q	SLLYSS	N	Q	K	N	S	L	A		20
1F4	K	A	S	Q		D	V	G	T	A	V	A		21
CDR1 de cadena ligera Secuencia consenso:	X 1	X 2	S	X 3	X 4	X 5	X 6	X 7	X 8	X 9	X 10	X 11		22

Tabla 2: CDR de cadena ligera anti B7-H1 humano

X_1 son sustituciones de R/K/S o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ +2) R, S o K
X_2 son sustituciones de A/S o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ +1): A o S
X_3 son sustituciones de Q/S o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ 0): R, N, D, Q, E, H, K, M o S
X_4 es SLLYSS (SEQ ID NO: 23) o está ausente
X_5 está ausente o son sustituciones de D/N o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ +1): N o D
X_6 son sustituciones de S/V/Q o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ 0): A, Q, E, L, K,
M, P, S, T, Y o V
X_7 son sustituciones de V/I/G/K o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -4): Cualquier aminoácido
X_8 son sustituciones de S/R/T/N o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ 0): R, N, S o T
X_9 son sustituciones de Y/A/S o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -2): A, R, N, C, Q, E, H, I, L, K, M, F, S, T, Y o V
X_{10} son sustituciones de I/M/L/V o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ +1): I, L, M o V
X_{11} son sustituciones de Y/A/H o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -2): A, R, N, Q, E, H, I, K, M, F, S, T o Y

CDR2 de cadena ligera

Anticuerpo	Secuencia															SEQ ID NO
3D10	A	T	F	N	L	A	S									24
3B6	D	T	S	K	L	T	S									25
1E12	W	A	S	T	R	H	T									26
2G11	W	A	S	T	R	E	S									27
1F4	W	A	S	T	R	H	T									28
CDR2 de cadena ligera Secuencia consenso:	X 1	X 2	X 3	X 4	X 5	X 6	X 7									29

X_1 son sustituciones de A/D/W o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -4): Cualquier aminoácido
X_2 son sustituciones de T/A o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ 0): A, C, G, S, T o V
X_3 son sustituciones de F/S o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -2): A, C, H, I, L, M, F, S, T, Y o V
X_4 son sustituciones de N/K/T o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -1): R, N, D, Q, E, K, S o T
X_5 son sustituciones de L/R o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -2): A, R, Q, L, K, M, S, T o Y
X_6 son sustituciones de A/T/H/E o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -2): A, R, N, D, Q, E, G, H, K, M, F, P, S, T o Y
X_7 son sustituciones de S/T o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ +1): A, N, S o T

CDR3 de cadena ligera

Anticuerpo	Secuencia															SEQ ID NO
3D10	Q	Q	W	S	N	N	P	L	T							30
3B6	H	Q	R	S	S	Y	P	W	T							31
1E12	Q	Q	D	S	S	Y	P	L	T							32
2G11	Q	Q	Y	Y	G	Y	P	L	T							33
1F4	Q	Q	D	S	S	Y	P	L	T							34
CDR3 de cadena ligera Secuencia consenso:	X 1	Q	X 2	X 3	X 4	X 5	P	X 6	T							35

Tabla 2: CDR de cadena ligera anti B7-H1 humano
X_1 son sustituciones de Q/H o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ 0): R, N, Q, E o H X_2 son sustituciones de W/R/D/Y o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -4): Cualquier aminoácido X_3 son sustituciones de S/Y o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -2): A, R, N, C, Q, E, H, I, L, K, M, F, S, T, Y o V X_4 son sustituciones de N/S/G o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ 0): N, G o S X_5 son sustituciones de N/Y o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ 0): A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y o V X_6 son sustituciones de K/S o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -2): A, R, N, D, Q, E, G, H, K, M, P, S, T o Y

La Tabla 3 presenta un análisis de las CDR de cadena pesada de los anticuerpos anti B7-H1 y proporciona la secuencia consenso de las CDR de cadena pesada anti B7-H1 variantes observadas y preferidas de la presente divulgación.

Tabla 3: CDR de cadena pesada anti B7-H1 humano

CDR1 de cadena pesada

Anticuerpo	Secuencia															SEQ ID NO
3D10	G	Y	T	F	P	D	Y	Y	M	N						36
3B6	G	Y	T	F	T	S	Y	D	I	N						37
1E12	G	Y	S	I	T	S	D	Y	W	N						38
2G11	G	Y	S	I	I	S	D	Y	W	N						39
1F4	G	F	S	L	T	T	Y	S	I	N						40
CDR1 de cadena pesada	G	X	X	X	X	X	X	X	X	N						41
Secuencia consenso:		1	2	3	4	5	6	7	8							

X_1 son sustituciones de Y/F o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ +3): Y o F
X_2 son sustituciones de T/S o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ +1): T o S
X_3 son sustituciones de F/I/L o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ 0): I, L, M o F
X_4 son sustituciones de P/T/I o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -3): A, R, N, D, C, Q, E, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y o V
X_5 son sustituciones de D/S/T o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir,≥ -1): N, D, Q, E, K, P, S o T
X_6 son sustituciones de Y/D o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -3): A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, Y o V
X_7 son sustituciones de Y/D/S o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ 0): A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, Y o V
X_8 son sustituciones de M/I/W o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -3): A, R, C, Q, E, H, I, L, K, M, F, S, T, W, Y o V

CDR2 de cadena pesada

Anticuerpo	Secuencia																	SEQ ID NO
3D10	D	I	D	P	N	Y	G	G	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G	42
3B6	W	I	F	P	R	D	N	N	T	K	Y	N	E	N	F	K	G	43
1E12	Y	I	S		Y	T	G	S	T	Y	Y	N	P	S	L	K	S	44
2G11	Y	I	S		Y	T	G	S	T	Y	Y	N	P	S	L	K	S	45
1F4	V	M	W		A	G	G	G	T	N	S	N	S	V	L	K	S	46
CDR2 de cadena pesada	X	X	X	X	X	X	X	X	T	X	X	N	X	X	X	K	X	47
Secuencia consenso:	1	2	3	4	5	6	7	8		9	10		11	12	13		14	

Tabla 3: CDR de cadena pesada anti B7-H1 humano

X_1 son sustituciones de D/W/Y/V o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -4): Cualquier aminoácido
X_2 son sustituciones de I/M o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ +1): I, L, M, F o V
X_3 son sustituciones de D/F/S/W o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -4): Cualquier aminoácido
X_4 es P ausente
X_5 son sustituciones de N/R/Y/A o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -2): A, R, N, Q, E, H, K, M, S, T, Y o V
X_6 son sustituciones de Y/D/T/G o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -3): A, R, N, D, C, Q, E, G, H, K, M, F, P, S, T, Y o V
X_7 son sustituciones de N/G o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ 0): N, G o S
X_8 son sustituciones de N/G/S o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ 0): N, G o S
X_9 son sustituciones de K/T/Y/N o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -2): A, R, N, Q, E, H, K, M, S, T o Y
X_{10} son sustituciones de Y/S o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -2): A, R, N, C, Q, E, H, I, L, K, M, F, S, T, W, Y o V
X_{11} son sustituciones de Q/E/P/S o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -1): A, D, Q, E, K, P, S o T
X_{12} son sustituciones de K/N/S/V o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -3): A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, Y o V
X_{13} son sustituciones de F/L o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ 0): I, L, M o F
X_{14} son sustituciones de G/S o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ 0): A, G o S

CDR3 de cadena pesada

Anticuerpo	Secuencia															SEQ ID NO
3D10			G	A	L											48
3B6	E	N	W	V	G	D	F									49
1E12	Y	G	G	W	L	S	P	F								50
2G11	R	G	G	W	L	L	P	F								51
1F4	Y	Y	G	N	S	P	Y	Y	Al							52
CDR3 de cadena pesada	X	X	X	X	X	X	X	X	X							53
Secuencia consenso:	1	2	3	4	5	6	7	8	9							

X_1 son sustituciones de E/Y/R o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -2): A, R, N, Q, E, H, K, M, S, T o Y
X_2 son sustituciones de N/G/Y o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -3): A, R, N, D, C, Q, E, G, H, K, M, F, P, S, T, Y o V
X_3 son sustituciones de G/W o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -2): Q, G, H, T o W
X_4 son sustituciones de A/V/W/N o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -4): Cualquier aminoácido
X_5 son sustituciones de L/G/S o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -4): Cualquier aminoácido
X_6 son sustituciones de D/S/L/P o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -4): Cualquier aminoácido
X_7 son sustituciones de F/P/Y o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -4): Cualquier aminoácido
X_8 son sustituciones de F/Y o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ +3): F o Y
X_9 es Al o ausente

Por lo tanto, además de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que poseen las CDR de los anticuerpos anti B7-H1: 1E12, 1F4, 2G11, 3B6 y 3D10, la divulgación proporciona adicionalmente anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que poseen CDR que tienen las secuencias consenso de cadena ligera y/o pesada anteriormente descritas.

La Tabla 4 presenta un análisis de las CDR de cadena ligera de los anticuerpos anti PD-1 y proporciona la secuencia consenso de las CDR anti PD-1 de cadena ligera variantes observadas y preferidas de la presente divulgación.

	Tabla 4: CDR de cadena ligera anti PD-1 humano															
CDR1 de cadena ligera																
Anticuerpo	Secuencia															SEQ ID NO.
1H3	S	A	S	S	S	S	V	S	Y	M	Y					54
1E3	K	A	S	Q	D	I	N	N	Y	M	A					55
1E8	K	A	S	Q	S	V	D	T	N	V	A					56
CDR1 de cadena ligera Secuencia consenso:	X 1	A	S	X 2	X 3	X 4	X 5	X 6	X 7	X 8	X 9					57
X_1 son sustituciones de K/S o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ 0): N, Q, E, K o S X_2 son sustituciones de S/Q o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ 0): N, D, Q, E, K o S X_3 está ausente o son sustituciones de D/S o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ 0): N, D, Q, E o S																
Tabla 4: CDR de cadena ligera anti PD-1 humano																
X_4 son sustituciones de S/I/V o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -2): A, C, I, L, M, F, S, T, Y o V X_5 son sustituciones de V/N/D o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -3): A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, K, M, F, P, S, T, Y o V X_6 son sustituciones de S/N/T o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ 0): N, S o T X_7 son sustituciones de Y/N o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -2): A, R, N, D, Q, E, G, H, K, M, P, S, T o Y X_8 son sustituciones de M/V o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ +1): I, L, M o V X_9 son sustituciones de Y/A o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -2): A, R, N, C, Q, E, H, I, L, K, M, F, S, T, Y o V																
CDR2 de cadena ligera																
Anticuerpo	Secuencia															SEQ ID NO
1H3	L	T	S	N	L	A	S									58
1E3	Y	T	S	T	L	L	S									59
1E8	S	A	S	Y	R	Y	S									60
CDR2 de cadena ligera Secuencia consenso:	X 1	X 2	S	X 3	X 4	X 5	S									61
X_1 son sustituciones de L/Y/S o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -2): A, R, C, Q, I, L, K, M, F, S, T, Y o V X_2 son sustituciones de T/A o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ 0): A, S, T o V X_3 son sustituciones de N/T/Y o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ 2): A, R, N, Q, E, H, K, M, S, T o Y X_4 son sustituciones de L/R o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -2): A, R, N, Q, L, K, M, S, T o Y X_5 son sustituciones de A/L/Y o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -2): A, R, C, Q, I, L, K, M, F, S, T, Y o V																
CDR3 de cadena ligera																
Anticuerpo	Secuencia															SEQ ID NO
1H3	Q	Q	W	S	S	N	P	F	T							62
1E3	L	Q	Y	D	N	L		W	T							63

	Tabla 4: CDR de cadena ligera anti PD-1 humano															
1E8	Q	Q	Y	N	S	Y	P	Y	T							64
CDR3 de cadena ligera Secuencia consenso:	X 1	Q	X 2	X 3	X 4	X 5	X 6	X 7	T							65
X_1 son sustituciones de Q/L o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -2): A, R, N, Q, L, K, M, S, T, W, Y o V X_2 son sustituciones de W/Y o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ +2): W o Y X_3 son sustituciones de S/D/N o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ 0): N, D, Q, E o S X_4 son sustituciones de S/N o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ +1): N, S o T X_5 son sustituciones de N/L/Y o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -3): A, R, N, C, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, Y o V X_6 está ausente o es P X_7 son sustituciones de F/W/Y o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ +1): F, W o Y															

La Tabla 5 presenta un análisis de las CDR de cadena pesada de los anticuerpos anti PD-1 y proporciona la secuencia consenso de las CDR de cadena pesada anti PD-1 variantes observadas y preferidas de la presente divulgación.

Tabla 5: CDR de cadena pesada anti PD-1 humano

CDR1 de cadena pesada

Anticuerpo	Secuencia															SEQ ID NO
1H3	G	F	T	F	S	D	Y	G	M	H						66
1E3	G	Y	T	F	T	D	Y	Y	M	N						67
1E8	G	Y	T	F	T	N	Y	W	M	H						68
Secuencia consenso de CDR1 de cadena pesada:	G	X 1	T	F	X2	X 3	Y	X4	M	X 5						69

X_1 son sustituciones de F/Y o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ +3): F o Y
X_2 son sustituciones de S/T o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ +1): S o T
X_3 son sustituciones de D/N o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ +1): N o D
X_4 son sustituciones de G/Y/W o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -3): A, R, C, Q, E, G, H, K, M, F, S, T, W, Y o V
X_5 son sustituciones de H/N o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ +1): N o H

CDR2 de cadena pesada

Anticuerpo	Secuencia																	SEQ ID NO
1H3	Y	I	S	S	G	S	Y	T	I	Y	Y	T	D	T	V	K	G	70
1E3	N	I	N	P	Y	N	G	G	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G	71
1E8	H	I	N	P	S	S	G	F	T	T	Y	N	Q	N	F	K	D	72
Secuencia consenso de CDR2 de cadena pesada:	X 1	I	X 2	X 3	X 4	X 5	X 6	X 7	X 8	X 9	Y	X 1 0	X 1 1	X 1 2	X 1 3	K	X 1 4	73

Tabla 5: CDR de cadena pesada anti PD-1 humano

X_1 son sustituciones de Y/N/H o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -2): A, R, N, Q, E, H, K, M, S, T o Y
X_2 son sustituciones de S/N o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ +1): N o S
X_3 son sustituciones de S/P o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -1): A, D, Q, E, K, P, S o T
X_4 son sustituciones de G/Y/S o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -3): A, R, N, D, C, Q, E, G, H, K, M, F, P, S, T, W, Y o V
X_5 son sustituciones de S/N o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ 0): N o S
X_6 son sustituciones de Y/G o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -3): A, R, N, D, C, Q, E, G, H, K, M, F, P, S, T, W, Y o V
X_7 son sustituciones de T/G/F o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -3): A, R, N, D, C, Q, E, G, H, K, M, F, S, T, W, Y o V
X_8 son sustituciones de I/T o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -1): A, C, I, L, M, T o V
X_9 son sustituciones de Y/T o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -2): A, R, N, C, Q, E, H, I, L, K, M, F, S, T, W, Y o V
X_{10} son sustituciones de T/N o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ 0): N, S, o T
X_{11} son sustituciones de D/Q o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ 0): N, D, Q, E o S
X_{12} son sustituciones de T/K/N o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -1): R, N, D, Q, E, K, S o T
X_{13} son sustituciones de V/F o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -1): I, L, M, W, Y o V
X_{14} son sustituciones de G/D o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -1): N, D, G o S

CDR3 de cadena pesada

Anticuerpo	Secuencia															SEQ ID NO
1H3	R	G	Y	G	S	F	Y	E	YYF		D	Y				74
1E3	G	R	I	Y	D	G	S	L			D	Y				75
1E8	E	D	Y	D	V						D	Y				76
Secuencia consenso de CDR3 de cadena pesada:	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X 6	X_7	X_8	X 9		D	Y				77

X_1 son sustituciones de R/G/E o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -2): A, R, N, D, Q, E, G, H, K, P, S o T
X_2 son sustituciones de G/R/D o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -2): A, R, N, D, Q, E, G, H, K, P, S o T
X_3 son sustituciones de Y/I o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -1): I, L, M, F, Y o V
X_4 son sustituciones de Y/G/D o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -3): A, R, N, D, C, Q, E, G, H, K, M, F, P, S, T, W, Y o V
X_5 son sustituciones de S/D/V o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -3): A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, K, M, F, P, S, T, Y o V
X_6 está ausente o son sustituciones de F/G o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -3): A, R, N, D, C, Q, E, G, H, K, M, F, S, T, W, Y o V
X_7 está ausente o son sustituciones de Y/S o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -2): A, R, N, C, Q, E, H, I, L, K, M, F, S, T, Y o V
X_8 son sustituciones de E/L o sustituciones que tienen una puntuación de sustitución igual o mayor (es decir, ≥ -3): A, R, N, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y o V
X_9 está ausente o es YYF

Por lo tanto, además de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que poseen las CDR de los anticuerpos anti PD-1: 1E3, 1E8 y 1H3, la divulgación proporciona adicionalmente anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que poseen CDR que tienen las secuencias consenso de cadena ligera y/o pesada anteriormente descritas.

La presente divulgación abarca anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprenden una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada variable y/o cadena ligera variable que es al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y/o cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal de ratón producido por cualquiera de los clones anteriores y que muestran unión inmunoespecífica con B7-H1 o PD-1. La presente divulgación abarca además anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprenden una CDR que es al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de una CDR de los clones enumerados anteriormente y que muestran unión inmunoespecífica con B7-H1 o PD-1. La determinación del porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por comparación de proteínas de BLAST.

En un caso específico, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente divulgación comprenderá una, dos, tres, cuatro, cinco o más, preferentemente, las seis de las CDR de los anticuerpos preferidos anteriormente descritos y mostrará la capacidad de unirse con B7-H1 o PD-1 humano.

B. Usos terapéuticos y profilácticos de las composiciones preferidas de la presente divulgación

La divulgación se refiere en particular al uso terapéutico y/o profiláctico de moléculas (especialmente anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno) que se unen inmunoespecíficamente con B7-H1 humano o PD-1 humano y/o que son capaces de modular la unión entre B7-H1 y PD-1 ya que dichas moléculas (B7-H1 o PD-1) se expresan de forma endógena y se disponen en un sujeto (por ejemplo, un paciente humano) y/o son capaces de modular la señalización mediante PD-1 o B7-H1.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "tratando", "tratamiento" y "uso terapéutico" se refieren a la eliminación, la reducción o el alivio de uno o más síntomas de una enfermedad o un trastorno agravado por las interacciones de B7-H1 y PD-1. Como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un agente terapéutico suficiente para mediar en una eliminación, una reducción o un alivio clínicamente relevante de dichos síntomas. Un efecto es clínicamente relevante si su magnitud es suficiente para influir en la salud o el pronóstico de un sujeto receptor. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede referirse a la cantidad de agente terapéutico suficiente para retardar o minimizar la aparición de enfermedad, por ejemplo, retardar o minimizar la propagación del cáncer. Una cantidad terapéuticamente eficaz también puede referirse a la cantidad del agente terapéutico que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o el control de una enfermedad. Además, una cantidad terapéuticamente eficaz con respecto a un agente terapéutico de la divulgación significa la cantidad de agente terapéutico solo, o en combinación con otras terapias, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o el control de una enfermedad, por ejemplo, suficiente para potenciar la eficacia terapéutica de un anticuerpo terapéutico suficiente para tratar o controlar una enfermedad.

Como se usa en el presente documento, la expresión "agente profiláctico" se refiere a un agente que puede usarse en la prevención de un trastorno o una enfermedad antes de la detección de cualquier síntoma de dicho trastorno o enfermedad. Una cantidad "profilácticamente eficaz" es la cantidad de agente profiláctico suficiente para mediar en dicha protección. Una cantidad profilácticamente eficaz también puede referirse a la cantidad del agente profiláctico que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención de enfermedad. Además, una cantidad profilácticamente eficaz con respecto a un agente profiláctico de la divulgación significa la cantidad de agente profiláctico solo, o en combinación con otros agentes, que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención de enfermedad.

Las cantidades de dosificación y frecuencias de administración proporcionadas en el presente documento están abarcadas por las expresiones terapéuticamente eficaz y profilácticamente eficaz. La dosificación y frecuencia variarán además típicamente según factores específicos para cada paciente dependiendo de los agentes terapéuticos o profilácticos específicos administrados, la gravedad y el tipo de cáncer, la vía de administración, así como la edad, el peso corporal, la respuesta y el historial médico pasado del paciente. Un experto en la materia puede seleccionar regímenes adecuados teniendo en cuenta dichos factores y siguiendo, por ejemplo, dosificaciones presentadas en la bibliografía y recomendadas en el Physician's Desk Reference (56ª ed., 2002).

1. Usos de moduladores positivos del sistema inmunitario

En un caso preferido, dichos anticuerpos y fragmentos se unen con estos antígenos en uno o más sitios para B7-H1 o PD-1 próximos a y que alteran el sitio de unión de B7-H1 - PD-1. Como se ha analizado anteriormente, las interacciones entre PD-1 y B7-H1 inhiben la proliferación de linfocitos T y reducen la producción de múltiples citocinas (véase, Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily," Nature Rev. Immunol. 2:116-126). Por lo tanto, en un caso preferido, la administración de las moléculas de la presente divulgación a un sujeto modula

positivamente el sistema inmunitario del sujeto antagonizando la unión de B7-H1 - PD-1. En otro caso, la avidez y/o afinidad del anticuerpo anti PD-1 puede ser tal que se una solamente con (y bloquee la unión de B7-H1 con) linfocitos T que expresan niveles muy altos de PD-1, que son los linfocitos T agotados o disfuncionales, y por lo tanto permiten la dirección específica de esta población celular. Por lo tanto, la divulgación se refiere al uso de los anticuerpos de la presente divulgación para mediar en la producción aumentada de IFN-γ. Por lo tanto, se refiere al uso de dichos anticuerpos en el tratamiento de enfermedades y afecciones que pueden tratarse con IFN-γ, tales como cáncer ovárico y otras formas de cáncer, enfermedad granulomatosa crónica, osteopetrosis, ataxia de Friedreich, etc. Adicionalmente, la divulgación se refiere particularmente al uso de los anticuerpos de la presente divulgación para mediar en la proliferación de linfocitos T aumentada. Por lo tanto, se refiere al uso de dichos anticuerpos en el tratamiento de enfermedades y afecciones que pueden tratarse aumentado la proliferación de linfocitos T, tales como: SIDA; inmunodeficiencia combinada grave (SCID); síndrome de Omenn; hipoplasia de cartílago-pelo; pérdida o ablación de linfocitos T inherentes al trasplante de órganos o tejidos o quimioterapia; hipogammaglobulinemia; agammaglobulinemia ligada a X; hipogammaglobulinemia transitoria; disgammaglobulinemia; deficiencia de IgA; deficiencia de IgG; deficiencia de IgM; síndrome de híper IgM; síndrome de Wiskott-Aldrich; síndrome de híper IgE; inmunodeficiencia variable común; síndrome de ICF; hipoplasia tímica (por ejemplo; síndrome de Di George; síndrome de Nezelof; ataxia telangiectasia); deficiencia de purina nucleósido fosforilasa; deficiencia de adenosina desaminasa; deficiencia de ZAP70; síndrome de linfocitos desnudos; leucopenia; linfocitopenia (por ejemplo; linfocitopenia CD4+ idiopática); o una deficiencia de complemento. La divulgación se refiere particularmente al uso de los anticuerpos de la presente divulgación para mediar tanto en la producción aumentada de IFN-γ como en la proliferación de linfocitos T aumentada.

La modulación positiva del sistema inmunitario es particularmente deseable en el tratamiento de cánceres e infecciones crónicas y por lo tanto la presente divulgación tiene utilidad en el tratamiento de dichos trastornos. Tanto PD-1 como B7-H1 se sobreexpresan tras la infección por VIH (Xu, Huanbin et al. (2010) "Increased B7-H1 Expression on Dendritic Cells Correlates with Programmed Death 1 Expression on T Cells in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Macaques and May Contribute to T Cell Dysfunction and Disease Progression," J. Immunol. 185:7340-7348; Grabmeier-Pfistershammer, K. et al. (2011) "identification of PD-1 as a Unique Marker for Failing Immune Reconstitution in HIV-1-Infected Patients on Treatment," J Acquir. Immune Defic. Syndr. 56(2):118-124). Por lo tanto, la expresión de B7-H1 en dichas células puede usarse para diagnosticar VIH en seres humanos. Por lo tanto, los anticuerpos anti PD-1 y anti B7-H1 de la presente divulgación tienen utilidad particular como productos terapéuticos para el tratamiento de infección por VIH y SIDA. Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" se refiere a una neoplasia o un tumor que resulta del crecimiento descontrolado anómalo de células. Como se usa en el presente documento, el cáncer incluye, de forma explícita, leucemias y linfomas. El término "cáncer" se refiere a una enfermedad que implica células que tienen el potencial de metastatizar a sitios distantes y muestran rasgos fenotípicos que difieren de los de células no cancerosas, por ejemplo, formación de colonias en un sustrato tridimensional tal como agar blando o la formación de redes tubulares o matrices de tipo red en una membrana basal tridimensional o preparación de matriz extracelular. Las células no cancerosas no forman colonias en agar blando y forman estructuras de tipo esférico definidas en membrana basal tridimensional o preparaciones de matriz extracelular.

Los cánceres y trastornos relacionados que pueden tratarse o prevenirse por métodos y composiciones de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, las siguientes: leucemias incluyendo, pero sin limitación, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas, tales como leucemias mieloblásticas, promielocíticas, mielomonocíticas, monocíticas y eritroleucémicas y síndrome mielodisplásico, leucemias crónicas, tales como, pero sin limitación, leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, leucemia linfocítica crónica, leucemia por tricoleucitos; policitemia vera; linfomas tales como, pero sin limitación, linfomas de enfermedad hodgkiniana y enfermedad no hodgkiniana (por ejemplo, linfoma anaplásico difuso quinasa (ALK) negativo, linfoma de linfocitos B grande (DLBCL); linfoma anaplásico difuso quinasa (ALK) positivo, linfoma de linfocitos B grande (DLBCL); linfoma anaplásico quinasa (ALK) positivo, linfoma de células grandes anaplásico ALK+ (ALCL), leucemia mieloide aguda (AML)); mielomas múltiples tales como, pero sin limitación, mieloma múltiple latente, mieloma no secretor, mieloma osteosclerótico, leucemia de células plasmáticas, plasmocitoma solitario y plasmocitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenstrom; gammapatía monoclonal de significado indeterminado; gammapatía monoclonal benigna; enfermedad de la cadena pesada; sarcomas óseos y de tejido conectivo, tales como, pero sin limitación, sarcoma óseo, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor maligno de células gigantes, fibrosarcoma óseo, cordoma, sarcoma del periostio, sarcomas de tejidos blandos, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiosarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemoma, rabdomiosarcoma, sarcoma sinovial; tumores cerebrales incluyendo, pero sin limitación, glioma, astrocitoma, glioma del tronco encefálico, ependimoma, oligodendroglioma, tumor no glial, neurinoma acústico, craneofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma, linfoma cerebral primario; cáncer de mama incluyendo, pero sin limitación, adenocarcinoma, carcinoma lobular (de células pequeñas), carcinoma intraductal, cáncer de mama medular, cáncer de mama mucinoso, cáncer de mama tubular, cáncer de mama papilar, enfermedad de Paget y cáncer de mama inflamatorio; cáncer suprarrenal, incluyendo, pero sin limitación, feocromocitoma y carcinoma adrenocortical; cáncer de tiroides tal como pero sin limitación cáncer de tiroides papilar o folicular, cáncer de tiroides medular y cáncer de tiroides anaplásico; cáncer pancreático, incluyendo, pero sin limitación, insulinoma, gastrinoma, glucagonoma, vipoma, tumor secretor de somatostatina y tumor de células de los islotes o carcinoide; cánceres de la hipófisis incluyendo, pero sin limitación, enfermedad de Cushing, tumor secretor

de prolactina, acromegalia y diabetes insípida; cánceres del ojo incluyendo, pero sin limitación, melanoma ocular tal como melanoma del iris, melanoma coroideo y melanoma del cuerpo ciliar, y retinoblastoma; cánceres vaginales, incluyendo, pero sin limitación, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y melanoma; cáncer vulvar, incluyendo, pero sin limitación, carcinoma de células escamosas, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma de células basales, sarcoma y enfermedad de Paget; cánceres del cuello uterino incluyendo, pero sin limitación, carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma; cánceres uterinos incluyendo, pero sin limitación, carcinoma endometrial y sarcoma uterino; cánceres ováricos incluyendo, pero sin limitación, carcinoma ovárico epitelial, tumor de escasa malignidad, tumor de células germinales y tumor estromal; cánceres esofágicos incluyendo, pero sin limitación, cáncer escamoso, adenocarcinoma, carcinoma cítico adenoide, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoescamoso, sarcoma, melanoma, plasmacitoma, carcinoma verrugoso y carcinoma de células de avena (células pequeñas); cánceres de estómago incluyendo, pero sin limitación, adenocarcinoma, fungoso (polipoide), ulcerante, de diseminación superficial, de diseminación difusa, linfoma maligno, liposarcoma, fibrosarcoma y carcinosarcoma; cánceres de colon; cánceres rectales; cánceres de hígado incluyendo, pero sin limitación, carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma, cánceres de vesícula biliar incluyendo, pero sin limitación, adenocarcinoma; colangiocarcinomas incluyendo, pero sin limitación, papilar, nodular y difuso; cánceres de pulmón incluyendo, pero sin limitación, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y cáncer de pulmón microcítico; cánceres testiculares incluyendo, pero sin limitación, tumor germinal, seminoma, anaplásico, clásico (típico), espermatocítico, no seminoma, carcinoma embrionario, carcinoma teratoma, coriocarcinoma (tumor de saco vitelino), cánceres de próstata incluyendo, pero sin limitación, adenocarcinoma, leiomiosarcoma y rabdomiosarcoma; cánceres penianos; cánceres orales incluyendo, pero sin limitación, carcinoma de células escamosas; cánceres basales; cáncer de las glándulas salivales incluyendo, pero sin limitación, adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide y carcinoma adenoidquístico; cánceres de faringe incluyendo, pero sin limitación, cáncer de células escamosas y verrugoso; cánceres de piel incluyendo, pero sin limitación, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y melanoma, melanoma de diseminación superficial, melanoma nodular, melanoma maligno lentigo, melanoma acral lentiginoso; cánceres de riñón incluyendo, pero sin limitación, cáncer de células renales, adenocarcinoma, hipernefroma, fibrosarcoma, cáncer de células de transición (pelvis renal y/o uréter); tumor de Wilms; cánceres de vejiga incluyendo, pero sin limitación, carcinoma de células de transición, cáncer de células escamosas, adenocarcinoma, carcinosarcoma. Además, los cánceres incluyen mixosarcoma, sarcoma osteogénico, endoteliosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, mesotelioma, sinovioma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial, cistadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar y adenocarcinomas papilares (para una revisión de dichos trastornos, véase Fishman et al., 1985, Medicine, 2ª Ed., J.B. Lippincott Co., Filadelfia y Swarbrick et al., 1997, Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., Estados Unidos de América).

En consecuencia, los métodos y composiciones de la divulgación también son útiles en el tratamiento o la prevención de una diversidad de cánceres u otras enfermedades proliferativas anómalas, incluyendo (pero sin limitación) los siguientes: carcinoma, incluyendo el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides y piel; incluyendo carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Berkett; tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma y rabdomiosarcoma; otros tumores, incluyendo melanoma, seminoma, tetratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma, rabdomiosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xenoderma pigmentoso, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma. También se contempla que cánceres provocados por aberraciones en la apoptosis también se tratarían mediante los métodos y las composiciones de la divulgación. Dichos cánceres pueden incluir, pero sin limitación, linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones de p53, tumores dependientes de hormonas de mama, próstata y ovario y lesiones precancerosas tales como poliposis adenomatosa familiar y síndromes mielodisplásicos. En casos específicos, los cambios de tumores malignos o disproliferativos (tales como metaplasias y displasias) o trastornos hiperproliferativos, se tratan o previenen mediante los métodos y las composiciones de la divulgación en el ovario, la vejiga, la mama, el colon, el pulmón, la piel, el páncreas o el útero. En otros casos específicos, sarcoma, melanoma o leucemia se tratan o previenen mediante los métodos y composiciones de la divulgación.

Las células cancerosas adquieren un conjunto característico de capacidades funcionales durante su desarrollo, aunque mediante diversos mecanismos. Dichas capacidades incluyen evasión de la apoptosis, autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a señales anticrecimiento, invasión tisular/metástasis, potencial explicativo sin límite y angiogénesis sostenida. Se entiende que la expresión "célula cancerosa" abarca células cancerosas tanto premalignas como malignas. En algunos casos, el cáncer se refiere a un tumor benigno, que ha permanecido localizado. En otros casos, el cáncer se refiere a un tumor maligno, que ha invadido y destruido estructuras corporales adyacentes y se ha propagado a sitios distantes. En otros casos más, el cáncer se asocia con un antígeno de cáncer específico (por ejemplo, antígeno de pancarcinoma (KS 1/4), antígeno de carcinoma ovárico (CA125), antígeno específico de próstata (PSA), antígeno carcinoembrionario (CEA), CD 19, CD20, HER2/neu, etc.).

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la presente divulgación son particularmente útiles para el tratamiento de cánceres que están asociados con células (por ejemplo, linfocitos T agotados, linfocitos B, monocitos, etc.) que expresan niveles anómalamente altos de PD-1 (Youngblood, B. (2011) "Chronic Virus Infection Enforces Demethylation Of The Locus That Encodes PD-1 In Antigen-Specific CD8(+) T Cells," Immunity 35(3):400-412; Spahn, J. et al. (2011) "Ineffective CD8(+) T-Cell Immunity To Adeno-Associated Virus Can Result In Prolonged Liver Injury And Fibrogenesis," Amer. J. Pathol. 179(5):2370-2381; Wang, C. et al. (2011) "Phenotype, Effector Function, And Tissue Localization Of PD-1-Expressing Human Follicular Helper T Cell Subsets," BMC Immunol. 12:53, 1-15; Eichbaum, Q. (2011) "PD-1 Signaling In HIV And Chronic Viral Infection Potential For Therapeutic Intervention?" Curr. Med. Chem. 18(26):3971-3980; Hallett, W.H. et al. (2011) "Immunosuppressive Effects Of Multiple Myeloma Are Overcome By PD-L1 Blockade," Biol Blood Marrow Transplant. 17(8):1133-1145; Ni, L. et al. (2010) "PD-1 Modulates Regulatory T Cells And Suppresses T-Cell Responses In HCV-Associated Lymphoma," Immunol. Cell. Biol. 89(4):535-539; Inozume, T. et al. (2010) "Selection Of CD8+PD-1+ Lymphocytes In Fresh Human Melanomas Enriches For Tumor-Reactive T Cells," J. Immunother. 33(9):956-964; y Jin, H.T. et al. (2010) "Cooperation Of Tim-3 And PD-1 In CD8 T-Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 107(33):14733-14738).

De forma similar a su aplicación a los tumores como se ha analizado anteriormente, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de la presente divulgación pueden usarse solos, o como un adyuvante, en combinación con vacunas o con agentes antimicrobianos, para estimular la respuesta inmunitaria contra toxinas o autoantígenos o contra patógenos (por ejemplo, virus, tales como VIH, HTLV, virus de la hepatitis, virus de la gripe, virus sincitial respiratorio, virus vaccinia, virus de la rabia; bacterias, tales como las de micobacterias, estafilococos, estreptococos, neumonococos, meningococos, conococos*, Klebsiella, Proteus, Serratia, Pseudomonas, Legionella,* corinebacterias, *Salmonella, Vibrio,* clostridios, bacilos, *Pasteurella, Leptospirosis, Bordatella* y particularmente tales patógenos asociados con cólera, tétanos, botulismo, carbunco, peste y enfermedad de Lyme; o patógenos fúngicos o parasitarios, tales como *Candida* (*albicans*, *krusei, glabrata, tropicalis,* etc.), *Cryptococcus, Aspergillus* (*jumigatus*, *niger,* etc.), género Mucorales (*mucor*, *absidia*, *rhizophus*), *Sporothrix* (*schenkii*), *Blastomyces* (*dermatitidis*), *Paracoccidioides* (*brasiliensis*), *Coccidioides* (*immitis*) e *Histoplasma* (*capsulatum*), *Entamoeba*, *histolytica, Balantidium coli, Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lambia, Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii, Plasmodium vivax, Babesia microti*, *Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, Toxoplasma gondi,* etc.), *Sporothrix, Blastomyces, Paracoccidioides, Coccidioides, Histoplasma, Entamoeba*, *Histolytica, Balantidium*, *Naegleria, Acanthamoeba, Giardia, Cryptosporidium, Pneumocystis, Plasmodium, Babesia* o *Trypanosoma*, etc. Por lo tanto, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de la presente divulgación tienen utilidad en el tratamiento de enfermedad infecciosa.

2. Usos de moduladores negativos del sistema inmunitario

En un caso alternativo, los anticuerpos anti B7-H1 o anti PD-1 de la presente divulgación se emplean para producir péptidos o anticuerpos antiidiotípicos (Wallmann, J. et al. (2010) "Anti-Ids in Allergy: Timeliness of a Classic Concept," World Allergy Organiz. J. 3(6):195-201; Nardi, M. et al. (2000) "Antiidiotype Antibody Against Platelet Anti-Gpiiia Contributes To The Regulation Of Thrombocytopenia In HIV-1-ITP Patients," J. Exp. Med. 191(12):2093-2100) o miméticos (Zang, Y.C. et al. (2003) "Human Anti-Idiotypic T Cells Induced By TCR Peptides Corresponding To A Common CDR3 Sequence Motif In Myelin Basic Protein-Reactive T Cells," Int. Immunol. 15(9):1073-1080; Loiarro, M. *et al.* (Epub 8 abr 2010) "Targeting TLR/IL-1R Signalling In Human Diseases," Mediators Inflamm. 2010:674363) de B7-H1 o PD-1. Dichas moléculas actúan como sustitutos de B7-H1 o PD-1 y por lo tanto su administración a un sujeto modula negativamente el sistema inmunitario de dicho sujeto imitando o facilitando la unión de B7-H1 - PD-1. Dichas moléculas tienen utilidad en el tratamiento de enfermedad de injerto contra hospedador. De forma similar, los anticuerpos agonistas que i) potencian la unión entre dichos anticuerpos y dicho receptor/ligando o ii) desencadenan la transducción de señal cuando se unen directamente con B7-H1 o PD-1, tienen utilidad como agonistas de la señalización de B7-H1-PD-1 y por lo tanto tienen utilidad en el tratamiento de inflamación y enfermedad autoinmunitaria, actuando como agonistas directos o indirectos de la actividad receptora.

Los anticuerpos biespecíficos, que muestran unión inmunoespecífica tanto con PD-1 como con B7-H1 son capaces de unirse tanto con APC como con linfocitos T, y por lo tanto facilitan la localización conjunta de APC y linfocitos T. Dicha localización conjunta facilita la capacidad de dichas células para unirse entre sí mediante moléculas de B7-H1 y PD-1 que no están en complejo con un anticuerpo o mediante moléculas coinhibidoras. Dicha unión proporciona modulación negativa del sistema inmunitario del receptor.

La modulación negativa del sistema inmunitario es deseable en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias, y enfermedad de injerto contra hospedador (GvHD). Los ejemplos de trastornos autoinmunitarios que pueden tratarse administrando los anticuerpos de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolipídico, enfermedad autoinmunitaria de Addison, enfermedades autoinmunitarias de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, ooforitis y orquitis autoinmunitarias, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, esprúe celíaco-dermatitis, síndrome de disfunción inmunitaria de fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de CREST, enfermedad por crioaglutininas, enfermedad de Crohn, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial,

fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), neuropatía de IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Ménière, enfermedad del tejido conectivo mixto, esclerosis múltiple, neuromielitis óptica (NMO), diabetes mellitus de tipo 1 o mediada por inmunidad, miastenia grave, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, síndrome de la persona rígida, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, mielitis transversal, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis tales como vasculitis herpetiforme por dermatitis, vitíligo y granulomatosis de Wegener.

Los ejemplos de trastornos inflamatorios que pueden prevenirse, tratarse o controlarse de acuerdo con los métodos de la divulgación incluyen, pero sin limitación, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria e inflamación crónica resultante de infecciones víricas o bacterianas crónicas.

Por lo tanto, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de la presente divulgación tienen utilidad en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias.

C. Métodos de administración

Se conocen diversos sistemas de suministro y se pueden usar para administrar las composiciones terapéuticas o profilácticas de la presente divulgación, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o la proteína de fusión, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retrovírico u otro, etc.

Los métodos para administrar un anticuerpo humanizado de la divulgación incluyen, pero sin limitación, inyección, como por administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural y mucosa (por ejemplo, vías intranasal y oral). En un caso específico, los anticuerpos de la divulgación se administran por vía intramuscular, por vía intravenosa o por vía subcutánea. Las composiciones pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en embolada, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, se puede emplear también la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente aerosolizante. Véase, por ejemplo, divulgaciones de patentes de los Estados Unidos N.º 6.019.968; 5.985. 20; 5.985.309; 5.934.272; 5.874.064; 5.855.913; 5.290.54u; y 4.880.078; y publicaciones PCT N.º WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; y WO 99/66903. En un caso específico, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la divulgación localmente en el área que necesite tratamiento; esto se puede lograr mediante, por ejemplo, y no a modo de limitación, infusión local, mediante inyección o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. Preferentemente, cuando se administre un anticuerpo de la divulgación, debe tenerse cuidado de usar materiales en los que no se absorba el anticuerpo o la proteína de fusión.

En algunos casos, los anticuerpos humanizados o quiméricos de la divulgación se formulan en liposomas para suministro dirigido de los anticuerpos de la divulgación. Los liposomas son vesículas compuestas de bicapas fosfolipídicas ordenadas de forma concéntrica que encapsulan una fase acuosa. Los liposomas comprenden típicamente diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos. Los componentes de liposomas están dispuestos en una configuración de bicapa, similar a la disposición lipídica de las membranas biológicas. Los liposomas son vehículos de suministro particularmente preferidos debido, en parte, a su biocompatibilidad, baja inmunogenicidad y baja toxicidad. Se conocen en la técnica métodos para la preparación de liposomas y están abarcados en la divulgación, véase, por ejemplo, Epstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688; Hwang et al., 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030-4; patentes de los Estados Unidos Nº 4.485.045 y 4.544.545.

La divulgación también abarca métodos de preparación de liposomas con una semivida en suero prolongada, es decir, tiempo en circulación potenciado, tales como los desvelados en la patente de los Estados Unidos N.º 5.013.556. Los liposomas preferidos usados en los métodos de la divulgación no se eliminan rápidamente de la circulación, es decir, no son captados por el sistema fagocítico mononuclear (MPS). La divulgación abarca liposomas estabilizados de forma estérica que se preparan usando métodos comunes conocidos por un experto en la materia. Aunque sin pretender quedar ligado a un mecanismo de acción particular, los liposomas estabilizados de forma estérica contienen componentes lipídicos con restos hidrófilos voluminosos y altamente flexibles, lo que reduce la reacción indeseada de liposomas con proteínas del suero, reduce la opsonización con componentes del suero y reduce el reconocimiento por MPS. Se preparan liposomas estabilizados de forma estérica preferentemente usando polietilenglicol. Para preparación de liposomas y liposoma estabilizado de forma estérica, véase, por

ejemplo, Bendas et al., 2001 BioDrugs, 15(4): 215-224; Allen et al., 1987 FEBS Lett. 223: 42-6; Klibanov et al., 1990 FEBS Lett., 268: 235-7; Blum et al., 1990, Biochim. Biophys. Acta., 1029: 91-7; Torchilin et al., 1996, J. Liposome Res. 6: 99-116; Litzinger et al., 1994, Biochim. Biophys. Acta, 1190: 99-107; Maruyama et al., 1991, Chem. Pharm. Bull., 39: 1620-2; Klibanov et al., 1991, Biochim Biophys Acta, 1062; 142-8; Allen et al., 1994, Adv. Drug Deliv. Rev, 13: 285-309. La divulgación también abarca liposomas que están adaptados para dirección a órganos específicos, véase, por ejemplo, patente de los Estados Unidos N.º 4.544.545, o dirección a células específicas, véase, por ejemplo, publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos N.º 2005/0074403. Pueden generarse liposomas particularmente útiles para su uso en las composiciones y los métodos de la divulgación mediante un método de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. En algunos casos, un fragmento de un anticuerpo de la divulgación, por ejemplo, F(ab'), puede conjugarse con los liposomas usando métodos previamente descritos, véase, por ejemplo, Martin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257: 286-288.

Los anticuerpos humanizados o quiméricos de la divulgación también pueden formularse como inmunoliposomas. Los inmunoliposomas se refieren a una composición liposómica, en la que un anticuerpo de la divulgación o un fragmento del mismo está unido, de forma covalente o no covalente, a la superficie liposómica. La química de unión de un anticuerpo a la superficie liposómica se conoce en la técnica y está abarcada dentro de la divulgación, véase, por ejemplo, patente de los Estados Unidos N.º 6.787.153; Allen et al., 1995, Stealth Liposomes, Boca Rotan: CRC Press, 233-44; Hansen et al., 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1239: 133-144. En la mayoría de casos preferidos, los inmunoliposomas para su uso en los métodos y las composiciones de la divulgación se estabilizan adicionalmente de forma estérica. Preferentemente, los anticuerpos humanizados de la divulgación se unen de forma covalente o no covalente a un anclaje hidrófobo, que está anclado de forma estable en la bicapa lipídica del liposoma. Los ejemplos de anclajes hidrófobos incluyen, pero sin limitación, fosfolípidos, por ejemplo, fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI). Para conseguir un enlace covalente entre un anticuerpo y un anclaje hidrófobo, puede usarse cualquiera de las estrategias bioquímicas conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, J. Thomas August, ed., 1997, Gene Therapy: Advances in Pharmacology, Volumen 40, Academic Press, San Diego, CA, págs. 399-435. Por ejemplo, un grupo funcional en una molécula de anticuerpo puede reaccionar con un grupo activo en un anclaje hidrófobo asociado a liposoma, por ejemplo, un grupo amino de una cadena lateral de lisina en un anticuerpo puede acoplarse a N-glutaril-fosfatidiletanolamina asociada a liposoma activada con carbodiimida soluble en agua; o un grupo tiol de un anticuerpo reducido puede acoplarse a liposomas mediante anclajes reactivos con tiol, tales como piridiltiopropionilfosfatidiletanolamina. Véase, por ejemplo, Dietrich et al., 1996, Biochemistry, 35: 1100-1105; Loughrey et al., 1987, Biochim. Biophys. Acta, 901: 157-160; Martin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257: 286-288; Martin et al., 1981, Biochemistry, 20: 4429-38. Aunque sin pretender quedar ligado a un mecanismo de acción particular, las formulaciones inmunoliposómicas que comprenden un anticuerpo de la divulgación son particularmente eficaces como agentes terapéuticos, ya que suministran el anticuerpo al citoplasma de la célula diana, es decir, la célula que comprende el receptor con el que se une el anticuerpo. Los inmunoliposomas tienen preferentemente una semivida aumentada en sangre, se dirigen específicamente a células y pueden internalizarse en el citoplasma de las células diana evitando de este modo la pérdida del agente terapéutico o la degradación por la ruta endolisosómica.

Las composiciones inmunoliposómicas de la divulgación comprenden uno o más lípidos formadores de vesículas, un anticuerpo de la divulgación o un fragmento o derivado del mismo y, opcionalmente, un polímero hidrófilo. Un lípido formador de vesículas es preferentemente un lípido con dos cadenas de hidrocarburo, tales como cadenas de acilo y un grupo de cabeza polar. Los ejemplos de lípidos formadores de vesículas incluyen fosfolípidos, por ejemplo, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, ácido fosfatídico, fosfatidilinositol, esfingomielina y glucolípidos, por ejemplo, cerebrósidos, gangliósidos. Un experto en la materia conoce lípidos adicionales útiles en las formulaciones de la divulgación y estos están abarcados en la divulgación. En algunos casos, las composiciones inmunoliposómicas comprenden además un polímero hidrófilo, por ejemplo, polietilenglicol, y gangliósido GM1, que aumenta la semivida en suero del liposoma. Se conocen bien en la técnica métodos para conjugar polímeros hidrófilos con liposomas y están abarcados en la divulgación. Para una revisión de inmunoliposomas y métodos para prepararlos, véase, por ejemplo, publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos N.º 2003/0044407; publicación internacional de PCT N.º WO 97/38731, Vingerhoeads et al., 1994, Immunomethods, 4: 259-72; Maruyama, 2000, Biol. Pharm. Bull. 23(7): 791-799; Abra et al., 2002, Journal of Liposome Research, 12(1y2): 1-3; Park, 2002, Bioscience Reports, 22(2): 267-281; Bendas et al., 2001 BioDrugs, 14(4): 215-224, J. Thomas August, ed., 1997, Gene Therapy: Advances in Pharmacology, Volumen 40, Academic Press, San Diego, CA, págs. 399-435.

La divulgación también proporciona los anticuerpos humanizados o quiméricos de la divulgación envasados en un recipiente cerrado herméticamente, tal como una ampolla o bolsita, que indica la cantidad de anticuerpo. En un caso, los anticuerpos de la divulgación se proporcionan como un polvo liofilizado esterilizado o concentrado sin agua en un recipiente cerrado herméticamente y puede reconstituirse, por ejemplo, con agua o solución salina hasta la concentración apropiada para administración a un sujeto. Preferentemente, los anticuerpos de la divulgación se proporcionan como un polvo liofilizado estéril en un recipiente cerrado herméticamente a una dosificación unitaria de al menos 5 mg, más preferentemente al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg o al menos 75 mg. Los anticuerpos liofilizados de la divulgación deberían almacenarse a entre 2 y 8 °C en su recipiente original y los anticuerpos deberían administrarse en un periodo de 12 horas, preferentemente en un periodo de 6 horas, en un periodo de 5 horas, en un periodo de 3 horas o en un periodo de 1

hora después de reconstituirse. En un caso alternativo, los anticuerpos de la divulgación se proporcionan en forma líquida en un recipiente cerrado herméticamente que indica la cantidad y concentración del anticuerpo, la proteína de fusión o la molécula conjugada. Preferentemente, la forma líquida de los anticuerpos se proporciona en un recipiente cerrado herméticamente a al menos 1 mg/ml, más preferentemente al menos 2,5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/ml, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 150 mg/ml, al menos 200 mg/ml de los anticuerpos.

La dosis precisa para emplear en la formulación dependerá también de la vía de administración, y la gravedad de la afección, y debería decidirse según el criterio del facultativo y de las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas de respuesta a dosis derivadas de sistemas de ensayo de modelos *in vitro* o animales. Para anticuerpos abarcados por la divulgación, la dosificación administrada a un paciente es típicamente de 0,01 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. Preferentemente, la dosificación administrada a un paciente está entre 0,01 mg/kg y 20 mg/kg, 0,01 mg/kg y 10 mg/kg, 0,01 mg/kg y 5 mg/kg, 0,01 y 2 mg/kg, 0,01 y 1 mg/kg, 0,01 mg/kg y 0,75 mg/kg, 0,01 mg/kg y 0,5 mg/kg, de 0,01 mg/kg a 0,25 mg/kg, de 0,01 a 0,15 mg/kg, de 0,01 a 0,10 mg/kg, de 0,01 a 0,05 mg/kg o de 0,01 a 0,025 mg/kg del peso corporal del paciente. En particular, la divulgación contempla que la dosificación administrada a un paciente es 0,2 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg o 10 mg/kg. Se predice que una dosis tan baja como 0,01 mg/kg mostraría efectos farmacodinámicos apreciables. Se ha predicho que los niveles de dosis de 0,10 - 1 mg/kg son más apropiados. También se esperaría que estuvieran activas dosis mayores (por ejemplo, 1-30 mg/kg). En general, los anticuerpos humanos tienen una semivida más larga en el cuerpo humano que anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmunitaria a los polipéptidos ajenos. Por lo tanto, son con frecuencia posibles dosificaciones menores de anticuerpos humanos y administración menos frecuente. Además, la dosificación y frecuencia de administración de anticuerpos de la divulgación o fragmentos de los mismos pueden reducirse potenciando la captación y penetración tisular de los anticuerpos por modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación.

En otro caso más, las composiciones pueden administrarse en un sistema de liberación controlada o liberación sostenida. Puede usarse cualquier técnica conocida por un experto en la materia para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más anticuerpos de la divulgación. Véase, por ejemplo, patente de los Estados Unidos N.º 4.526.938; publicación de PCT WO 91/05548; publicación de PCT WO 96/20698; Ning et al., 1996, "Intratumoral Radioimmunotheraphy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; y Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760. En un caso, puede usarse una bomba en un sistema de liberación controlada (véase Langer, mencionado anteriormente; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; y Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). En otro caso, pueden usarse materiales poliméricos para conseguir liberación controlada de anticuerpos (véase, por ejemplo, Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; véase también Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 7 1:105); patente de los Estados Unidos N.º 5.679.377; patente de los Estados Unidos N.º 5.916.597; patente de los Estados Unidos N.º 5.912.015; patente de los Estados Unidos N.º 5.989.463; patente de los Estados Unidos N.º 5.128.326; publicación de PCT N.º WO 99/15154; y publicación de PCT N.º WO 99/20253). Los ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero sin limitación, poli(metacrilato de 2-hidroxi etilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-acetato de vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poliacrilamida, poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicólidos) (PLGA) y poliortoésteres. En otro caso más, se puede colocar un sistema de liberación controlada próximo a la diana terapéutica (por ejemplo, los pulmones), requiriendo por tanto solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, mencionada anteriormente, vol. 2, págs. 115-138 (1984)). En otro caso, se usan composiciones poliméricas útiles como implantes de liberación controlada según Dunn *et al.* (véase documento U.S. 5.945.155). Este método particular se basa en el efecto terapéutico de la liberación controlada in situ del material bioactivo del sistema polimérico. La implantación puede producirse en general en cualquier parte en el cuerpo del paciente que necesite tratamiento terapéutico. En otro caso, se usa un sistema de suministro sostenido no polimérico, por el que un implante no polimérico en el cuerpo del sujeto se usa como un sistema de suministro farmacológico. Tras la implantación en el cuerpo, el disolvente orgánico del implante se disipará, dispersará o lixiviará de la composición al fluido tisular circundante y el material no polimérico gradualmente se coagulará o precipitará para formar una matriz sólida, microporosa (véase documento U.S. 5.888.533). Se analizan sistemas de liberación controlada en la revisión de Langer (1990, Science 249:1527-1533). Puede usarse cualquier técnica conocida por un experto en la materia para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la divulgación. Véase, por ejemplo, patente de los Estados Unidos N.º 4.526.938; publicaciones internacionales N.º WO 91/05548 y WO 96/20698; Ning et al., 1996, Radiotherapy & Oncology 39:179-189; Song et al., 1995, PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al., 1997, Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; y Lam et al., 1997, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760.

En un caso específico en el que la composición terapéutica o profiláctica de la divulgación es un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la divulgación o un fragmento de unión a antígeno del mismo, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* para promover la expresión de su anticuerpo codificado, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico y administrándolo de modo que se haga intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retrovírico (véase patente de los Estados Unidos N.º 4.980.286), mediante inyección directa o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont), o recubriendo con lípidos, receptores de superficie celular o agentes de transfección, o administrándolo unido a un péptido de tipo caja homeótica que se sabe que entra en el núcleo (véase, por ejemplo, Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868), etc. Como alternativa, puede introducirse un ácido nucleico por vía intracelular e incorporarse en ADN de la célula hospedadora para expresión por recombinación homóloga.

El tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de anticuerpos de la divulgación puede incluir un único tratamiento o, preferentemente, puede incluir una serie de tratamientos.

D. Composiciones farmacéuticas

Las composiciones de la divulgación incluyen composiciones farmacológicas a granel útiles en la fabricación de composiciones farmacéuticas (es decir, composiciones que son adecuadas para su administración a un sujeto o paciente) que pueden usarse en la preparación de formas farmacéuticas unitarias. Dichas composiciones comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un agente profiláctico y/o terapéutico desvelado en el presente documento o una combinación de esos agentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, las composiciones de la divulgación comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de anticuerpos humanizados de la divulgación y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un caso específico, la expresión “farmacéuticamente aceptable” significa que aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal, o que está enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos o en otra farmacopea reconocida de forma general para su uso en animales y, más particularmente, en seres humanos. El término "transportador" se refiere a un diluyente, adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund (completo e incompleto), excipiente, tensioactivo, crioprotector o vehículo con el que se administra el producto terapéutico. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los de origen en el petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Se pueden emplear también soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol, polisorbato-80 y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares.

En general, los ingredientes de composiciones de la divulgación se proporcionan por separado o se mezclan entre sí en forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un recipiente cerrado herméticamente tal como una ampolla o bolsita que indica la cantidad de principio activo. Cuando la composición se va a administrar mediante infusión, se puede dosificar con un frasco para infusión que contiene agua estéril de uso farmacéutico o solución salina. Cuando la composición se administra mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de modo que los ingredientes se puedan mezclar antes de su administración.

Las composiciones de la divulgación pueden formularse como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, las formadas con aniones tales como las derivadas de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes tales como las derivadas de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

E. Kits

La divulgación proporciona un envase o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes cargados con anticuerpos humanizados de la divulgación. Adicionalmente, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos adicionales útiles para el tratamiento de una enfermedad también pueden incluirse en el envase o kit farmacéutico. La divulgación también proporciona un envase o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes cargados con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la divulgación. Opcionalmente puede haber un aviso asociado con dicho recipiente o recipientes en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, reflejando dicho aviso la aprobación por parte de la agencia de su fabricación, uso o venta para administración humana.

La presente divulgación proporciona kits que pueden usarse en los métodos anteriores. En un caso, un kit comprende uno o más anticuerpos humanizados de la divulgación. En otro caso, un kit comprende además uno o más agentes profilácticos o terapéuticos adicionales útiles para el tratamiento del cáncer, en uno o más recipientes. En otro caso, un kit comprende además uno o más anticuerpos citotóxicos que se unen con uno o más antígenos de cáncer asociados con cáncer. En ciertos casos, el otro agente profiláctico o terapéutico es un producto quimioterapéutico. En otros casos, el agente profiláctico o terapéutico es un producto terapéutico biológico u hormonal.

F. Métodos de diagnóstico

Los anticuerpos de la divulgación y sus fragmentos de unión a antígeno pueden usarse para fines de diagnóstico, tales como detectar, diagnosticar o supervisar enfermedades, trastornos o infecciones asociadas con la expresión de B7-H1 o PD-1. La divulgación posibilita la detección o el diagnóstico de una enfermedad, un trastorno o una infección, particularmente una enfermedad autoinmunitaria que comprende: (a) ensayar la expresión de B7-H1 o de PD-1 en células o en una muestra tisular de un sujeto usando uno o más anticuerpos (o fragmentos de los mismos) que se unen de forma inmunoespecífica con dichos antígenos; y (b) comparar el nivel del antígeno con un nivel de control, por ejemplo, el nivel en una muestra tisular normal, o antes del tratamiento, por lo que un aumento o una reducción en el nivel ensayado de antígeno en comparación con el nivel de control del antígeno es indicativo de la enfermedad, el trastorno o la infección, o de la respuesta del sujeto al tratamiento. Por lo tanto, la divulgación también posibilita la progresión de una enfermedad, un trastorno o una infección, que comprende: (a) ensayar la expresión de B7-H1 o de PD-1 en células o en una muestra tisular de un sujeto en un punto temporal usando uno o más anticuerpos (o fragmentos de los mismos) que se unen de forma inmunoespecífica con dichos antígenos; y (b) comparar el nivel de expresión de B7-H1 o de PD-1 en células o en una muestra tisular de un sujeto en otro punto temporal, o durante un periodo de tiempo, por lo que un aumento o una reducción en el nivel ensayado de antígeno es indicativo de la progresión de enfermedad, trastorno o infección. La divulgación posibilita adicionalmente la supervisión de la respuesta al tratamiento, que comprende: (a) ensayar la expresión de B7-H1 o de PD-1 en células o en una muestra tisular de un sujeto antes del tratamiento con uno o más anticuerpos (o fragmentos de los mismos) que se unen de forma inmunoespecífica con dichos antígenos; y (b) ensayar la expresión de B7-H1 o de PD-1 en células o en una muestra tisular de un sujeto antes en uno o más puntos temporales después del tratamiento y comparar el nivel del antígeno a lo largo del tiempo, por lo que un aumento o una reducción en el nivel ensayado de antígeno en comparación con el nivel pretratamiento del antígeno es indicativo de una respuesta al tratamiento. Dichos anticuerpos y fragmentos se emplean preferentemente en inmunoensayos, tales como el ensayo inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA), el radioinmunoensayo (RIA) y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

Un aspecto de la divulgación se refiere al uso de dichos anticuerpos y fragmentos, y particularmente dichos anticuerpos y fragmentos que se unen con B7-H1 humano, como reactivos para análisis de IHC en células de una muestra tisular *in vitro* o *in situ* o *in vivo*. Por ejemplo, ya que B7-H1 es expresado por células cancerosas pero no por tejido normal (Dong, H. (2003) "B7-H1 Pathway And Its Role In The Evasion Of Tumor Immunity," J. Mol. Med. 81:281-287), la detección de su presencia en una célula por la unión de dichas células con dichos anticuerpos o fragmentos es indicativa y diagnóstica de una célula cancerosa. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona un ensayo citológico para diagnosticar la presencia del cáncer en un sujeto.

Se ha descubierto que la presencia de B7-H1 en células tumorales potencia la apoptosis de linfocitos T que responden al tumor (patente de los Estados Unidos N.º 7.794.710). Por lo tanto, determinando el alcance o grado en que células tumorales de un enfermo de cáncer muestran B7-H1 en sus superficies, la presente divulgación proporciona un medio para determinar la significación clínica del cáncer y la medida en que será refractario a una respuesta inmunitaria.

De forma similar, B7-H1 se expresa en células dendríticas linfoides y mucosas (células dendríticas tanto mieloides como plasmacitoides) y su expresión aumenta significativamente después de la infección por VIS (Xu, Huanbin et al. (2010) "Increased B7-H1 Expression on Dendritic Cells Correlates with Programmed Death 1 Expression on T Cells in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Macaques and May Contribute to T Cell Dysfunction and Disease Progression," J. Immunol. 185:7340-7348). Por lo tanto, la expresión de B7-H1 en dichas células puede usarse para diagnosticar VIH en seres humanos. Adicionalmente, se ha descubierto que la expresión de PD-1 en células CD8+ aumenta en el contexto de infección por VIH (Killian, M.S. et al. (2011) "Natural Suppression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication Is Mediated by Memory CD8+ T Cells," J. Virol. 85(4):1696-1705). Por lo tanto los anticuerpos que se unen tanto con PD-1 como con CD8 tienen utilidad particular en el diagnóstico de infección por VIH y progresión del SIDA.

Un aspecto adicional de la divulgación se refiere al uso de dichos anticuerpos y fragmentos, y particularmente dichos anticuerpos y fragmentos que se unen con PD-1 humano. PD-1 tiene utilidad particular como un marcador de la activación inmunitaria crónica y el agotamiento de linfocitos T. Su expresión está potenciada en linfocitos T de pacientes infectados por VIH virémico y se correlaciona con la carga vírica en estos pacientes (Khaitan, A. et al. (2011) "Revisiting Immune Exhaustion During HIV Inflection," Curr. HIV/AIDS Rep. 8:4-11; Grabmeier-Pfistershammer, K. et al. (2011) "Identification of PD-1 as a Unique Marker for Failing Immune Reconstitution in HIV-

1-Infected Patients on Treatment," J Acquir. Immune Defic. Syndr. 56(2):118-124). Por lo tanto, PD-1 tiene utilidad particular como un marcador de la progresión de VIH. Más preferentemente la expresión de PD-1 se evaluará usando citometría de flujo. Mediante el uso de dichos anticuerpos y fragmentos, los linfocitos T (que expresan PD-1) pueden analizarse con respecto a múltiples parámetros (por ejemplo, recuento celular, tamaño celular, fenotipo y salud celular, etc.) incluso aunque estén presentes en preparaciones heterogéneas. Por lo tanto, en concierto con anticuerpos para PD-1 y sus fragmentos de unión a antígeno, dichos métodos pueden usarse para diagnosticar el alcance o la gravedad de SIDA, leucemias y otras enfermedades que afecten al número y la salud de linfocitos T. Se desvelan métodos de citometría de flujo que pueden adaptarse para los fines de la presente divulgación en y en Peters, J.M. et al. (2011) "Multiparameter Flow Cytometry In The Diagnosis And Management Of Acute Leukemia," Arch. Pathol. Lab. Med. 135(1):44-54; Meyerson, H.J. (2010) "A Practical Approach To The Flow Cytometric Detection And Diagnosis Of T-Cell Lymphoproliferative Disorders," Lab. Hematol. 16(3):32-52; Vandewoestyne, M. et al. (Epub 3 ago 2010) Laser Capture Microdissection In Forensic Research: A Review," Int. J. Legal. Med. 124(6):513-521; Ornatsky, O. et al. (Epub 2010 Jul 21) "Highly Multiparametric Analysis By Mass Cytometry," J. Immunol. Meth. 361(1-2):1-20; Mach, W.J. et al. (Epub 13 jul 2010) "Flow Cytometry And Laser Scanning Cytometry, A Comparison Of Techniques," J. Clin. Monit. Comput. 24(4):251-259; y Chattopadhyay, P.K. et al. (2010) "Good Cell, Bad Cell: Flow Cytometry Reveals T-Cell Subsets Important In HIV Disease," Cytometry A. 77(7):614-622; y en las patentes de los Estados Unidos N.º 7.876.436; 7.847.923; 7.842.244; 7.746.466; 7.590.500; 7.527.978; 7.507.548; 7.491.502; 7.486.387; 7.479.630; 7.465.543; 7.354.773; 6.794.152 y 6.784.981

Por lo tanto, los anticuerpos y fragmentos de la presente divulgación tienen utilidad en la detección y el diagnóstico de una enfermedad, un trastorno o una infección en un ser humano. En un caso, dicho diagnóstico comprende: a) administrar a un sujeto (por ejemplo, por vía parenteral, por vía subcutánea o por vía intraperitoneal) una cantidad eficaz de un anticuerpo marcado o fragmento de unión a antígeno que se une de forma inmunoespecífica con B7-H1 o PD-1; b) esperar durante un intervalo de tiempo después de la administración para permitir que la molécula marcada se concentre preferentemente en sitios en el sujeto en los que se expresa B7-H1 o PD-1 (y para que la molécula marcada no unida se elimine hasta nivel de fondo); c) determinar el nivel de fondo; y d) detectar el anticuerpo marcado en el sujeto, de modo que la detección de anticuerpo marcado por encima del nivel de fondo indique que el sujeto tiene la enfermedad, el trastorno o la infección. De acuerdo con este caso, el anticuerpo se marca con un resto de captura de imágenes que es detectable usando un sistema de captura de imágenes conocido por un experto en la materia. El nivel de fondo puede determinarse por diversos métodos incluyendo, comparar la cantidad de molécula marcada detectada con un valor habitual previamente determinado para un sistema particular.

Se entenderá en la técnica que el tamaño del sujeto y el sistema de captura de imágenes usado determinarán la cantidad de resto de captura de imágenes necesaria para producir imágenes de diagnóstico. La captura de imágenes *in vivo* se describe en S.W. Burchiel et al., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments." (Capítulo 13 en Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel y B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982).

Dependiendo de varias variables, incluyendo el tipo de marcador usado y el modo de administración, el intervalo temporal después de la administración para permitir que la molécula marcada se concentre preferentemente en sitios en el sujeto y para que la molécula marcada no unida se elimine hasta nivel de fondo es de 6 a 48 horas o de 6 a 24 horas o de 6 a 12 horas. En otro caso el intervalo temporal después de la administración es de 5 a 20 días o de 5 a 10 días.

En un caso, la supervisión de una enfermedad, un trastorno o una infección se lleva a cabo repitiendo el método de diagnóstico de la enfermedad, el trastorno o la infección, por ejemplo, un mes después del diagnóstico inicial, seis meses después del diagnóstico inicial, un año después del diagnóstico inicial, etc.

La presencia de la molécula marcada puede detectarse en el sujeto usando métodos conocidos en la técnica para exploración *in vivo*. Estos métodos dependen del tipo de marcador usado. Los expertos en la materia serán capaces de determinar el método apropiado para detectar un marcador particular. Los métodos y dispositivos que pueden usarse en los métodos de diagnóstico de la divulgación incluyen, pero sin limitación, tomografía computarizada (TC), exploración de cuerpo completo tal como tomografía de emisión de positrones (PET), captura de imágenes por resonancia magnética (IRM) y ecografía.

En un caso específico, la molécula se marca con un radioisótopo y se detecta en el paciente usando un instrumento quirúrgico sensible a radiación (Thurston et al., patente de los Estados Unidos N.º 5.441.050). En otro caso, la molécula se marca con un compuesto fluorescente y se detecta en el paciente usando un instrumento de exploración sensible a fluorescencia. En otro caso, la molécula se marca con un metal emisor de positrones y se detecta en el paciente usando tomografía de emisión de positrones. En otro caso más, la molécula se marca con un marcador paramagnético y se detecta en un paciente usando captura de imágenes por resonancia magnética (IRM).

Habiendo ahora descrito en general la divulgación, esta se entenderá más fácilmente mediante referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan como ilustración y no se pretende que sean limitantes de la presente divulgación a no ser que se especifique.

Ejemplo 1

Aislamiento y caracterización de anticuerpos anti B7-H1 humano

Para aislar anticuerpos neutralizantes anti B7-H1 humano de alta afinidad, en primer lugar se inmunizaron ratones y después se reforzaron con B7-H1-Fc humano. Se fusionaron esplenocitos de animales positivos anti B7-H1 con células de mieloma siguiendo el protocolo convencional. Los hibridomas murinos resultantes se exploraron con respecto a los que expresan anticuerpos monoclonales inmunorreactivos a B7-H1. Los anticuerpos se evaluaron adicionalmente para determinar si eran anticuerpos IgG o IgM. En consecuencia, se inmovilizó B7-H1-Fc o control negativo en un soporte sólido. Los sobrenadantes de hibridoma se colocaron después en contacto con el soporte y se determinó la presencia de anticuerpo anti B7-H1 usando anti IgG de ratón o anti IgM de ratón. La Figura 1 muestra los resultados de sobrenadantes de hibridoma ensayados e indica el aislamiento de múltiples líneas de hibridoma que expresan anticuerpo inmunorreactivo con B7-H1 humano.

Los hibridomas identificados se exploraron para determinar si sus anticuerpos expresados eran anticuerpos neutralizantes y como tales capaces de bloquear la unión entre B7-H1 y PD-1. PD-1-Fc se inmovilizó en un soporte sólido, que después se incubó en presencia de medio acondicionado diluido que contenía B7-H1-Fc biotinilado. La capacidad del B7-H1 y PD-1 para unirse entre sí se detectó ensayando con respecto a la unión de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (SA-HRP) con el soporte sólido. El anticuerpo anti B7-H1 capaz de modular la unión de B7-H1 con PD-1 media por lo tanto en una reducción de la unión de SA-HAS en este ensayo. Los resultados del experimento se muestran en la Figura 2, e indican que varios de los hibridomas aislados expresaban anticuerpos neutralizantes de B7-H1 humano. El anticuerpo MIH-1 (anti CD274 humano (B7-H1) (Chen, Y. et al. (Epub 11 nov 2005) "Expression Of B7-H1 In Inflammatory Renal Tubular Epithelial Cells," Nephron. Exp. Nephrol. 102(3-4):e81-e92) se usó como un control positivo. 29E.2AE es un anticuerpo anti PD-1 pero se mostró que no era neutralizante en este ensayo. Se usaron medios acondicionados de un hibridoma no relacionado (Ab aleatorio) y control de vector (CV) como controles negativos.

Para determinar si los anticuerpos neutralizantes expresados eran capaces de unirse con B7-H1 que estaba dispuesto en la superficie de una célula, se realizó un ensayo de unión a células. Se diluyó sobrenadante de cada clon de hibridoma 1:4 y se incubó en presencia de células CHO parentales y una línea de CHO clonal que sobreexpresaba B7-H1 humano de longitud completa. Después de permitir que se produjera unión, las células se lavaron y se detectó la presencia de anticuerpo anti B7-H1 unido a células residual usando anticuerpo anti IgG de ratón marcado con fluorescencia. La mediana de la intensidad de fluorescencia (IFM) para unión con CHO-hB7-H1 se muestra en la Figura 3. No se descubrió que ninguno de los clones ensayados reaccionara de forma cruzada con la línea parental CHO, lo que indica que el anticuerpo expresado era específico para B7-H1 humano.

Como una evaluación adicional, se compararon diferentes concentraciones de tres clones con anticuerpo anti B7-H1 MIH-1. El anticuerpo se purificó usando proteína G y se evaluó con respecto a su capacidad para unirse con B7-H1 cuando estaba presente a niveles endógenos y como se dispuso en la superficie de una APC. Se incubaron células CHO que expresaban B7-H1 humano con diversas concentraciones (10, 1 o 0,1 µg/ml) de anticuerpo anti B7-H1 seguido de incubación con anticuerpo de burro anti ratón conjugado con APC. La unión se indicó midiendo la mediana de intensidad de fluorescencia. Los resultados muestran que los anticuerpos ensayados mostraron mayor avidez por B7-H1 que el anticuerpo de control (MIH1) (Figura 4) y que el anticuerpo 1E12 mostró mayor avidez por B7-H1 que un anticuerpo de control anti B7-H1 (5H1) (Dong, H. et al. (2002) "Tumor-Associated B7-H1 Promotes T-Cell Apoptosis: A Potential Mechanism Of Immune Evasion," Nature Med. 8(8):793-800) (Figura 5).

En resumen, los datos muestran que se obtuvieron múltiples hibridomas que expresaban anti B7-H1 humano. Todos los clones son anticuerpos IgG que reconocen B7-H1-Fc. Los clones 1B3, 1D11, 1E2, 1E4, 1E10, 2A6, 2E12, 2F2, 2F5, 2F11, 3A4 y 3B1 son débiles en el ensayo de unión de exploración. La baja señal podría deberse a niveles de expresión bajos y/o afinidad débil.

De manera significativa, varios clones (por ejemplo, clones: 1D5, 1E12, 1F4, 2A7, 2G11, 3B6, 3D10) mostraron fuerte actividad neutralizante. Todos son neutralizantes a todas las concentraciones ensayadas y parecen unirse bien con el antígeno. La IFM para unión con células CHO-B7-H1 es la siguiente: 1D5 = 50.821; 1E12 = 56.152; 1F4 = 62.015; 2A7 = 49.008; 2G11 = 55.947; 3B6 = 59.638; 3D10 = 53.114.

Ejemplo 2

Aislamiento y caracterización de anticuerpos anti PD-1 humano

Para aislar anticuerpos neutralizantes anti PD-1 humano de alta afinidad, en primer lugar se inmunizaron ratones y después se reforzaron con PD-1-Fc humano. Se fusionaron esplenocitos de animales positivos anti PD-1 con células de mieloma siguiendo el protocolo convencional. Los hibridomas murinos resultantes se exploraron con respecto a los que expresan anticuerpos monoclonales inmunorreactivos a PD-1 humano de alta afinidad. Los anticuerpos se evaluaron adicionalmente para determinar si eran anticuerpos IgG o IgM. En consecuencia, se inmovilizó PD-1-Fc o control negativo (B7-H4-Fc) en un soporte sólido. Los sobrenadantes de hibridoma se colocaron después en

contacto con el soporte y se determinó la presencia de anticuerpo anti PD-1 usando anti IgG de ratón o anti IgM de ratón. La Figura 6 muestra la unión a antígeno e isotipo de los anticuerpos anti PD-1 humano aislados e indica el aislamiento de múltiples líneas de hibridoma que expresan anticuerpo inmunorreactivo con PD-1 humano.

Los hibridomas identificados se exploraron para determinar si sus anticuerpos expresados eran anticuerpos neutralizantes y como tales capaces de bloquear la unión entre B7-DC y PD-1. B7-DC-Fc, una proteína de fusión que se une con PD-1, se inmovilizó en un soporte sólido, que después se incubó en presencia de medio acondicionado diluido que contenía PD-1-Fc biotinilado. La capacidad del B7-DC y PD-1 para unirse entre sí se detectó ensayando con respecto a la unión de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (SA-HRP) con el soporte sólido. El anticuerpo anti PD-1 capaz de modular la unión de B7-DC con PD-1 media por lo tanto en una reducción de la unión de SA-HRP en este ensayo. Los resultados del experimento se muestran en las Figuras 7A y 7B, e indican que varios de los hibridomas aislados expresaban anticuerpos neutralizantes de PD-1 humano (la Figura 7B muestra el mismo gráfico que la Figura 7A, pero a una escala diferente).

Se realizó un ensayo de unión a células para determinar si los anticuerpos neutralizantes expresados eran capaces de unirse con PD-1 dispuesto en una superficie celular. Se diluyó sobrenadante de cada clon de hibridoma 1:4 y se incubó en presencia de células CHO parentales y una línea de CHO clonal que sobreexpresaba PD-1 humano de longitud completa. Después de permitir que se produjera unión, las células se lavaron y se detectó la presencia de anticuerpo anti PD-1 unido a células residual usando anticuerpo anti IgG de ratón marcado con fluorescencia. La mediana de la intensidad de fluorescencia (IFM) para unión con CHO-hPD-1 se muestra en la Figura 8. Los resultados demuestran que los anticuerpos 1E3, 1E8 y 1H3 fueron particularmente capaces de unirse con PD-1 humano expresado en una superficie celular. No se descubrió que ninguno de los clones ensayados reaccionara de forma cruzada con la línea parental CHO, lo que indica que el anticuerpo expresado era específico para PD-1 humano. J116 es un anticuerpo de control anti PD-1 humano disponible en el mercado (eBioscience, Inc.). La isotipificación reveló que 1E3, 1E8, 1H3 son IgG1 / kappa.

Se seleccionaron dos clones (1E3 y 1H3) para estudio adicional. Como una evaluación adicional, se compararon diferentes concentraciones de dos clones con anticuerpos anti PD-1 M3 y EH-12. El anticuerpo se purificó usando proteína G y se evaluó con respecto a su capacidad para unirse con PD-1 expresado en las superficies de células CHO. Las células CHO-hPD1 se tiñeron con anticuerpo anti PD-1 no marcado (10, 1 y 0,1 µg/ml) seguido de anticuerpo de burro anti ratón conjugado con APC y se presentó la mediana de intensidad de fluorescencia. Los resultados del ensayo se presentan en la Figura 9. El control negativo es IgG murino (mIgG1); los controles positivos son M3 (un anticuerpo monoclonal neutralizante contra PD-1 humano (Wu, K. et al. (2009) "Kupffer Cell Suppression of CD8+ T Cells in Human Hepatocellular Carcinoma Is Mediated by B7-H1/Programmed Death-1 Interaction," Cancer Res 69(20):8067-8075) y anticuerpo anti PD-1 EH12 (Dorfman, D.M. et al. (2006) "Programmed Death-1 (PD-1) Is A Marker Of Germinal Center-Associated T Cells And Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma," Am. J. Surg. Pathol. 30(7):802-810).

Se realizó un ensayo de competición basado en células incubando 50.000 células CHO-hPD1 durante 30 minutos con anticuerpo anti PD-1 (presente a concentraciones que varían de 0-0,1 mg/ml). Después se añadieron 10 µg/ml de B7-DC-Fc marcado con APC y la incubación continuó durante 30 minutos adicionales, después de lo cual se midió la fluorescencia de B7-DC-Fc unido. La mediana de intensidad de fluorescencia se muestra en la Figura 10. La competición se repitió a una concentración de anticuerpo fija de 20 µg/ml (Figura 11).

En resumen, los resultados muestran que los clones 1E3, 1E8 y 1H3 muestran actividad neutralizante y reconocen el antígeno bien. El clon 1E6 es capaz de reticular con PD-1 sin neutralizarlo, proporcionando de este modo unión potenciada. Sin embargo este clon no parece unirse con PD-1 en la superficie celular.

Ejemplo 3

Producción de anticuerpos humanizados: Metodología general

Como se ha indicado anteriormente, para determinados fines, incluyendo, por ejemplo, uso en el tratamiento *in vivo* de enfermedad humana, se prefiere emplear un derivado humanizado de los anticuerpos anti B7-H1 humano y/o anti PD-1 humano anteriormente descritos.

Para formar dichos derivados, las secuencias marco conservadas de los anticuerpos 3D10 o 1H3 (las secuencias "parentales") se alinearon en primer lugar con secuencias marco conservadas de un conjunto de anticuerpos humanos "aceptores" para identificar diferencias en las secuencias marco conservadas. Se consiguió humanización sustituyendo restos de marco conservado no coincidentes entre el parental y el aceptor. Se analizaron sustituciones en posiciones potencialmente importantes tales como las de la zona de Vernier, la interfaz intercatenaria de VH/VL o posiciones determinantes de clase canónica de CDR con respecto a retromutaciones prospectivas (véase, Foote, J. et al. (1992) "Antibody Framework Residues Affecting The Conformation Of The Hypervariable Loops," J. Molec. Biol. 224:487-499). Se identificaron un total de 14 secuencias variantes humanizadas.

La base de datos de dominios conservados (COD) (Marchler-Bauer, et al. (2011) "COD: A Conserved Domain Database For The Functional Annotation Of Proteins," Nucleic Acids Res. 39:D225-D229) se usó para determinar el contenido de dominio de cada cadena de aminoácidos y los límites aproximados de cada dominio. Los límites de dominios variables se determinaron con exactitud junto con los límites de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) según varias definiciones usadas habitualmente (Kabat, E.A. et al. (1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Quinta edición. Publicación de NIH N.º 91-3242; Chothia, C. et al. (1987) "Canonical Structures For The Hypervariable Regions Of Immunoglobulins," J. Mol. Biol. 196:901-917); Honegger, A. et al. (2001) "Yet Another Numbering Scheme For Immunoglobulin Variable Domains: An Automatic Modeling And Analysis Tool," J. Molec. Biol. 309(3):657-670; la definición de CDR de Chothia (Chothia, C. et al. (1987) "Canonical Structures For The Hypervariable Regions Of Immunoglobulins," J. Mol. Biol. 196:901-917) se usará posteriormente con respecto a dichas secuencias humanizadas.

Se generaron múltiples alineamientos de la secuencia parental con las secuencias de línea germinal de ratón y humana usando MAFFT (Katoh, K. et al. (2002) "MAFFT: A Novel Method For Rapid Multiple Sequence Alignment Based On Fast Fourier Transform," Nucleic Acids Res. 30: 3059-3066) y las entradas en cada alineamiento se ordenaron según la identidad de secuencia con la secuencia parental. Los conjuntos de referencia se redujeron a un conjunto único de secuencias agrupando a 100 % de identidad de secuencia y excluyendo entradas redundantes.

La selección de marco conservado aceptor óptimo se basó en la identidad de secuencias de anticuerpos parentales general con los aceptores a lo largo del marco conservado de ambas cadenas; sin embargo las posiciones que componen la interfaz intercatenaria de VH/VL son de interés particular. Adicionalmente, las longitudes de bucles de CDR y posiciones de CDR responsables del conjunto discreto de estructuras canónicas que se ha definido para 5 de las CDR (Chothia, C. et al. (1987) "Canonical Structures For The Hypervariable Regions Of Immunoglobulins," J. Mol. Biol. 196:901-917; Martin, A.C. et al. (1996) "Structural Families In Loops Of Homologous Proteins: Automatic Classification, Modelling And Application To Antibodies," J. Molec. Biol 263:800-815; Al-Laziniki, B. et al. (1997) "standard Conformation For The Canonical Structures Of Immunoglobulins," J. Molec. Biol. 273:927-948) se compararon con las líneas germinales, para determinar qué marcos conservados de línea germinal tenían los mismos restos de interfaz y se supo que soportaban conformaciones de bucles de CDR similares. La Tabla 6 y Tabla 7 muestran las posiciones conservadas dentro del interfaz VH/VL y las posiciones que determinan la clase canónica de CDR (respectivamente), con numeración según la definición de Chothia.

Tabla 6
Posiciones conservadas en la interfaz de VH/VL del anticuerpo 1H3

Dominio	Posiciones
VL	34, 36, 38, 43, 44, 46, 87, 88, 89, 91, 96, 98
VH	35, 37, 39, 45, 47, 91 93, 95 100-100K*, 101, 103
* La numeración de la posición uno N terminal de la posición 101 difiere por la longitud de CDR H3	

Tabla 7
Posiciones que determinan la clase canónica de CDR del anticuerpo 1H3

Dominio	Posiciones
L1	2, 25, 29, 30, 30D*, 33, 71
L2	34
L3	90, 94, 95, 97
H1	24, 26, 29, 34, 94
H2	54, 55, 71
* Si CDR L1 es suficientemente largo para contener la posición	

Basándose en el alineamiento de la secuencia de anticuerpo parental con las líneas germinales humanas se identificaron las entradas más estrechamente coincidentes. La elección de la línea germinal humana preferida se basó en los criterios ordenados: (1) Identidad de secuencia por todo el marco conservado; (2) Restos de interfaz intercatenaria idénticos o compatibles; (3) Bucles de apoyo con las conformaciones canónicas de CDR parentales; (4) La combinación de líneas germinales pesadas y ligeras se encuentra en anticuerpos expresados; y (5) Presencia de sitios de N-glucosilación que tienen que retirarse.

Se generó un modelo estructural de la región Fv del anticuerpo 1H3. Los fragmentos molde estructurales candidatos con respecto a las regiones marco conservada (FR) y determinantes de complementariedad (CDR) así como el Fv completo se puntuaron, se clasificaron y se seleccionaron de una base de datos de anticuerpos basándose en su identidad de secuencia con la diana, así como medidas cristalográficas cualitativas de la estructura molde tal como la resolución, en Angstroms (Å).

Para alinear estructuralmente las CDR con los moldes de FR, se incluyeron 5 restos en cada lado de la CDR en el molde de CDR. Se generó un alineamiento de los fragmentos basándose en segmentos solapantes y un alineamiento de secuencias estructurales generado. Los fragmentos molde junto con el alineamiento se procesaron mediante MODELLER (Sali, A. et al. (1993) "Comparative Protein Modelling By Satisfaction Of Spatial Restraints," J. Molec. Biol. 234:779-815). Este protocolo crea restricciones conformacionales derivadas del conjunto de moldes estructurales alineados. Se creó un conjunto de estructuras que satisfacía las restricciones mediante gradiente de conjugado y procedimientos de optimización de hibridación simulados. Se seleccionaron estructuras modelo de este conjunto basándose en la base de una puntuación de energía, derivada de la puntuación de la estructura de las proteínas y la satisfacción de las restricciones conformacionales. Los modelos se inspeccionaron y las cadenas laterales de las posiciones que diferían entre la diana y el molde se optimizaron usando un algoritmo de optimización de cadenas laterales y la energía se minimizó. Se usó un conjunto de herramientas de visualización y computacionales para evaluar la variabilidad conformacional de las CDR, el empaquetamiento local y el análisis de superficie para seleccionar uno o más modelos preferidos.

Se construyó un modelo estructural del anticuerpo parental y se inspeccionó con respecto a imperfecciones tales como mal empaquetamiento atómico, tensión en las longitudes de enlace, ángulos de enlace o ángulos diédricos. Estas imperfecciones pueden indicar problemas potenciales con la estabilidad estructural del anticuerpo. El protocolo de modelación busca minimizar dichas imperfecciones. El modelo estructural inicial del Fv humanizado contiene todas las sustituciones seguras (es decir, sustituciones que no deberían afectar a la afinidad o estabilidad de unión) y sustituciones cuidadosas (es decir, se realiza la sustitución de posición pero la posición puede ser importante para la afinidad de unión). Las sustituciones en posiciones que se considera que están asociadas con un riesgo de reducción de la afinidad de unión o reducción de la estabilidad no se alteran. La búsqueda y selección de molde se realizó por separado con respecto a la búsqueda de molde parental para crear un buen modelo independiente en lugar de un modelo variante estrechamente coincidente del parental. A medida que se realizó la evaluación de sustituciones potenciales el modelo se actualizó para reflejar las sustituciones preferidas y el efecto de retromutaciones.

Ejemplo 4

Producción de anticuerpos anti B7-H1 humanizados

Para ilustrar la producción de dichos derivados humanizados, se produjeron derivados humanizados de anticuerpo anti B7-H1 humano 3D10 de acuerdo con el procedimiento anteriormente descrito.

Se generaron alineamientos de secuencia que comparan dominios variables de cadena ligera 3D10 con las líneas germinales humanas usando: líneas germinales de cadena ligera de IGKV3 (IGKV3-11*01, IGKV3-11*02, IGKV3-NL5*01, IGKV3D-11*01, IGKV3-NL4*01, IGKV3D-7*01, IGKV3D-20*01, IGKV3-20*01, IGKV3-20*02 e IGKV3-15*01), líneas germinales de cadena ligera de IGKV1 (IGKV1-9*01, IGKV1-39*01, IGKV1D-13*01, IGKV1-16*01, IGKV1-8*01, IGKV1-13*02, IGKV1-NL1*01, IGKV1D-43*01, IGKV1-27*01 e IGKV1-12*01) y líneas germinales de cadena ligera de IGKJ (IGKJ4*01, IGKJ2*02, IGKJ2*01, IGKJ2*04, IGKJ2*03, IGKJ5*01, IGKV1*01 e IGKJ3*01).

Se generaron alineamientos de secuencia que comparan dominios variables de cadena pesada 3D10 con las líneas germinales humanas usando: líneas germinales de cadena ligera de IGHV1 (IGHV1-2*02, IGHV1-2*04, IGHV1-f*01, IGRV1-48*01, IGHV1-2*03, IGHV1-2*01, IGHV1-46*02, IGHV1-2*05, IGHV1-3*01 e IGKV1-8*01), líneas germinales de cadena ligera de IGHV3 (IGHV3-49*04, IGHV3-49*01, IGHV3-49*02, IGHV3-49*03, IGHV3-64*01, IGHV3-64*02, IGHV3-72*01, IGKV3-66*01 e IGHV3-23*01) y líneas germinales de cadena pesada de IGHJ (IGHJ3*02, IGHJ6*01, IGHJ3*01, IGHJ6*03, IGHJ5*02, IGHJ5*01, IGHJ4*01, IGHV1*01, IGHJ6*04 e IGHJ2*01).

(A) Humanización de la cadena ligera

Basándose en los criterios anteriores, se descubrió que la cadena ligera del anticuerpo 3D10 era más similar a la cadena ligera de línea germinal IGKV3-11*01 (SEQ ID NO:78):

```
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWP
```

e IGKV1-9*01 (SEQ ID NO:79):

```
DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCRASQGIS SYLAWYQQKP GKAPKLLIYA
ASTLQSGVPS RFSGSGSGTE FTLTISSLQP EDFATYYCQQ LNSYP
```

prefiriéndose IGKV3-11*01, como se muestra en la Tabla 8 (los restos de CDR del anticuerpo 3D10 se muestran en cursiva, los restos alineados idénticos se muestran subrayados):

Tabla 8 Alineamiento de regiones variables de cadena ligera		
Cadena ligera	SEQ ID NO.	Secuencia
		1 10 20 30 40
3D10	9	QIVLSQSPAI LSASPGEKVT MTC***RASSSVS YIY***WFQQKPG
IGKV3-11*01	78	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVSS YLAWYQQKPG
IGKV1-9*01	79	DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCRASQGISS YLAWYQQKPG
		41 50 60 70 80
3D10	9	SSPKPWIY***AT FNLAS***GVPAR FSGSGSGTSY SLTISRVETE
IGHV3-11*01	78	QAPRLLIYDA SNRATGIPAR FSGSGSGTDF TLTISSLEPE
IGKV1-9*01	79	KAPKLLIYAA STLQSGVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPE
		81 90 100 106
3D10	9	DAATYYC***QQW SNNPLT***FGAG TKLELK
IGKV3-11*01	78	DFAVYYCQQR SNWP---- --------
IGKV1-9*01	79	**D**FATYYCQQL NSYP---- --------

Los genes de segmento J se compararon con la secuencia parental sobre FR4 y el segmento J IGKJ4*01 (SEQ ID NO:80: LTFGGGTKVEIK) se seleccionó con respecto a la cadena ligera.

Como se ha mostrado anteriormente, la cadena ligera del anticuerpo 3D10 tiene una CDR L1 de diez restos cortos similar a bucles de clase I canónicos. Las líneas germinales humanas no tienen dicho CDR L1 corto. Cada una de las líneas germinales seleccionadas, IGKV3-11*01 e IGKV1-9*01, tienen bucles L1 más cortos que contienen los restos de marco conservado correcto para apoyar este tipo de bucle. Se observa una buena similitud de secuencia general entre marcos conservados aceptores y la secuencia parental, sin embargo se observan diferencias importantes en las posiciones de interfaz Y33 y P45. El resto Y33 está en CDR LI y aunque las dos familias aceptoras seleccionadas no contienen tirosina en esta posición, otras secuencias de línea germinal sí. La diferencia entre los marcos conservados aceptores y la secuencia parental en la posición P45 es una consecuencia de la línea germinal parental que posee una FR2 diferente a cualquier línea germinal humana. Como resultado se propusieron cambios en esta región independientemente del marco conservado aceptor elegido, de modo que IGKV3-11*01 e IgKV1-9*01 se propusieron como los marcos conservados aceptores.

Se crearon tres cadenas humanizadas para cada uno de los dos marcos conservados aceptores preferidos, IGKV3-11*01 e IGKV1-9*01. Las tres cadenas de LC1 se obtuvieron de IGKV3-11*01; las tres cadenas de LC2 se obtuvieron de IGKV-9*01. La primera cadena humanizada para cada marco conservado aceptor contenía todas las sustituciones humanizantes consideradas posibles y es la más humana de las tres cadenas. La segunda cadena humanizada para cada marco conservado aceptor contenía varias retromutaciones en posiciones que alteran la carga, potencialmente interfieren con el empaquetamiento principal o podrían afectar a la conformación de las CDR. La tercera cadena, para cada uno de los marcos conservados aceptores, contenía el mayor número de retromutaciones, incluyendo sustituciones que alteran la carga y podrían potencialmente la afinidad de unión. Las secuencias de estas seis cadenas humanizadas se muestran a continuación.

LC1_1 (SEQ ID NO:81)
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASSSVS YIYWFQQKPG
QAPRLLIYAA FNRATGIPAR FSGSGSGTDY TLTISSLEPE
DFAVYYCQQW SNNPLTFGQG TKVEIK

LC1_2 (SEQ ID NO:82)
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASSSVS YIYWFQQKPG
QSPRPLIYAA FNRATGIPAR FSGSGSGTDY TLTISSLEPE
DFAVYYCQQW SNNPLTFGQG TKVEIK

LC1_3 (SEQ ID NO:83)
QIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASSSVS YIYWFQQKPG
QSPRPLIYAT FNLASGIPAR FSGSGSGTSY TLTISRLEPE
DFAVYYCQQW SNNPLTFGQG TKVEIK

LC2_1 (SEQ ID NO:84) DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASSGVS YIYWFQQKPG KAPKLLIYAA FNLASGVPSR FSGSGSGTEY TLTISSLQPE DFATYYCQQW SNNPLTFGQG TKVEIK

LC2_2 (SEQ ID NO:85) DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASSGVS YIYWFQQKPG KAPKPLIYAA FNLASGVPSR FSGSGSGTEY TLTISSLQPE DFATYYCQQW SNNPLTFGQG TKVEIK

LC2_3 (SEQ ID NO:86) QIQLTQSPSI LSASVGDRVT ITCRASSSVS YIYWFQQKPG KAPKPLIYAT FNLASGVPSR FSGSGSGTSY TLTISSLQPE DFATYYCQQW SNNPLTFGQG TKVEIK

Las secuencias para estas seis cadenas humanizadas se muestran en la Tabla 9 con diferencias relativas a la cadena ligera de 3D 10 parental mostrada en negrita y subrayada.

Tabla 9
Cadenas ligeras humanizadas de anticuerpo 3D10

Cadena ligera	SEQ ID NO	Secuencia
LC1_1	81	**E**IVL**T**QSPA**T** LS**L**SPGE**RA**T **LS**CRASSSVS YIYWFQQKPG **QA**P**RLL**IYA**A** FN**R**A**T**G**I**PAR FSGSGSGT**D**Y **T**LTIS**SL**E**P**E D**F**A**V**YYCQQW SNNPLTFG**Q**G TK**V**E**I**K
LC1_2	82	**E**IVL**T**QSPA**T** LS**L**SPGE**RA**T **LS**CRASSSVS YIYWFQQKPG **Q**SP**R**P**L**IYA**A** FN**R**A**T**G**I**PAR FSGSGSGT**D**Y **T**LTIS**SL**E**P**E D**F**A**V**YYCQQW SNNPLTFG**Q**G TK**V**E**I**K
LC1_3	83	QIVL**T**QSPA**T** LS**L**SPGE**RA**T **LS**CRASSSVS YIYWFQQKPG **Q**SP**R**P**L**IYAT FNLASG**I**PAR FSGSGSGTSY **T**LTISR**L**E**P**E D**F**A**V**YYCQQW SNNPLTFG**Q**G TK**V**E**I**K
LC2_1	84	**D**I**Q**L**T**QSP**SS** LSAS**V**G**DR**VT **I**TCRASSGVS YIYWFQQKPG **KA**P**KLL**IYA**A** FNLASGVP**S**R FSGSGSGT**E**Y **T**LTIS**SLQP**E D**F**ATYYCQQW SNNPLTFG**Q**G TK**V**E**I**K
LC2_2	85	**D**I**Q**L**T**QSP**SS** LSAS**V**G**DR**VT **I**TCRASSGVS YIYWFQQKPG **KA**P**KPL**IYA**A** FNLASGVP**S**R FSGSGSGT**E**Y **T**LTIS**SLQP**E D**F**ATYYCQQW SNNPLTFG**Q**G TK**V**E**I**K
LC2_3	86	**D**I**Q**L**T**QSP**S**I LSAS**V**G**DR**VT **I**TCRASSSVS YIYWFQQKPG **KA**P**KPL**IYAT FNLASGVP**S**R FSGSGSGTSY **T**LTIS**SLQP**E D**F**ATYYCQQW SNNPLTFG**Q**G TK**V**E**I**K

(B) Humanización de la cadena pesada

A la luz de los criterios anteriormente analizados, dos marcos conservados aceptores de línea germinal candidatos: IGHV1-2*02 (línea germinal IGHV1) e IGHV3-49*04 (línea germinal IGHV3) se seleccionaron para la humanización de la cadena pesada del anticuerpo 3D10.

El marco conservado aceptor IGHV 1-2*02 se seleccionó debido a su similitud de secuencia con la secuencia parental y al hecho de que contenía restos muy similares implicados en el empaquetamiento principal del dominio. El marco conservado aceptor IGHV3-49*04 se seleccionó después de la consideración y el rechazo de otras secuencias de línea germinal similares a IGHV 1-2*02. Como el marco conservado aceptor IGHV3-49*04 es ligeramente más distinto a la secuencia parental que IGHV 1-2*02, fue necesario un mayor número de sustituciones, sin embargo este marco conservado aceptor de línea germinal puede soportar las CDR parentales. Las secuencias del marco conservado aceptor IGHV 1-2*02 y el marco conservado aceptor IGHV3-49*04 se muestran a continuación:

Marco conservado aceptor IGHV 1-2*02 (SEQ ID NO:87):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT GYYMHWVRQA PGQGLEWMGW
INPNSGGTNY AQKFQGRVTM TRDTSISTAY MELSRLRSDD TAVYYCAR

Marco conservado aceptor IGHV3-49*04 (SEQ ID NO:88):

EVQLVESGGG LWQPGRSLRL SCTASGFTFG DYAMSWVRQA PGKGLEWVGF
IRSKAYGGTT EYAASVKGRF TISRDDSKSI AYLQMNSLKT EDTAVYYCTR

La Tabla 10 muestra el alineamiento de estas secuencias con la cadena pesada del anticuerpo 3D10 (los restos de CDR del anticuerpo 3D10 se muestran en cursiva, los restos alineados idénticos se muestran subrayados):

Tabla 10
Alineamiento de regiones variables de cadena pesada

Cadena pesada	SEQ ID NO.	Secuencia
		1 10 20 30 40
3D10	10	EVQLQQSGPD LVTPGASVRI SCQAS***GYTFP DYYMN***WJVKQS
IGHV 1-2*02	87	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT GYYMHWVRQA
IGHV3-49*04	88	EVQLVESGGG LWQPGRSLRL SCTASGFTFG DYAMSWVRQA
		41 50 60 70 80
3D10	10	HGKSLEWIG***D IDP--NYGGTTY NQKFKG***KAIL TVDRSSSTAY
IGHV 1-2*02	87	PGQGLEWMGW INP--NSGGTNY AQKFQGRVTM TRDTSISTAY
IGHV3-49*04	88	PGKGLEWVGF IRSKAYGGTTEY AASVKGRFTI SRDDSKSIAY
		81 90 100 110 114
3D10	10	MELRSLTSED SAVYYCAR***GA L***TDWGQGTSL TVSS
IGHV 1-2*02	87	MELSRLRSDD TAVYYCAR
IGKV3-49*04	88	LQMNSLKTED TAVYYCTR

Los genes de segmento J se compararon con la secuencia parental sobre FR4 y el segmento J IGHJ3*02 (SEQ ID NO:89: DAFDIWGQGTMVTVSS) se seleccionó con respecto a la cadena pesada.

Se crearon tres cadenas humanizadas para cada uno de los dos marcos conservados aceptores preferidos, IGHV1-2*02 e IGHV3-49*04. Las tres cadenas de HC1 se obtuvieron de IGHV1-2*02; las tres cadenas de HC2 se obtuvieron de IGHV3-49*04). La primera cadena humanizada para cada marco conservado aceptor contenía todas las sustituciones humanizantes consideradas posibles y es la más humana de las tres cadenas. La segunda cadena humanizada para cada marco conservado aceptor contenía varias retromutaciones en posiciones que alteran la carga, potencialmente interfieren con el empaquetamiento principal o podrían afectar a la conformación de las CDR. La tercera cadena, para cada uno de los marcos conservados aceptores, contenía el mayor número de retromutaciones, incluyendo sustituciones que alteran la carga y podrían potencialmente la afinidad de unión. Las secuencias para estas seis cadenas humanizadas se muestran a continuación:

HC1_1 (SEQ ID NO:90)
QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFP DYYMNWVRQA
PGQGLEWMGD IDPNYGGTNY AQKFQGRVTM TRDTSISTAY
MELSRLRSDD TAVYYCARGA LTDWGQGTMV TVSS

HC1_2 (SEQ ID NO:91)
QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFP DYYMNWVRQA
PGQSLEWMGD IDPNYGGTNY NQKFQGRVTM TRDTSISTAY
MELSRLRSDD TAVYYCARGA LTDWGQGTMV TVSS

HC1_3 (SEQ ID NO:92)
EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFP DYYMNWVRQA
PGQSLEWMGD IDPNYGGTNY NQKFQGRVTM TVDRSSSTAY
MELSRLRSDD TAVYYCARGA LTDWGQGTMV TVSS

HC2_1 (SEQ ID NO:93) EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCTASGYTFP DYYMNWVRQA PGKGLEWVGD IDPNYGGTTY AASVKGRFTI SVDRSKSIAY LQMSSLKTED TAVYYCTRGA LTDWGQGTMV TVSS

HC2_2 (SEQ ID NO:94) EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCTASGYTFP DYYMNWVRQA PGKGLEWVGD IDPNYGGTTY NASVKGRFTI SVDRSKSIAY LQMSSLKTED TAVYYCARGA LTDWGQGTMV TVSS

HC2_3 (SEQ ID NO:95) EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCTASGYTFP DYYMNWVRQA PGKGLEWVGD IDPNYGGTTY NQSVKGRFTI SVDRSKSIAY LQMSSLKTED TAVYYCARGA LTDWGQGTMV TVSS

Las secuencias para estas seis cadenas humanizadas se muestran en la Tabla 11 con diferencias relativas a la cadena pesada de 3D 10 parental mostrada en negrita y subrayada.

Tabla 11
Cadenas pesadas humanizadas de anticuerpo 3D10

Cadena pesada	SEQ ID NO	Secuencia
HC1_1	90	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFP DYYMNWVRQA PGQGLEWMGD IDPNYGGTNY AQKFQGRVTM TRDTSISTAY MELSRLRSDD TAVYYCARGA LTDWGQGTMV TVSS
HC1_2	91	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFP DYYMNWVRQA PGQSLEWMGD IDPNYGGTNY NQKFQGRVTM TRDTSISTAY MELSRLRSDD TAVYYCARGA LTDWGQGTMV TVSS
HC1_3	92	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFP DYYMNWVRQA PGQSLEWMGD IDPNYGGTNY NQKFQGRVTM TVDRSSSTAY MELSRLRSDD TAVYYCARGA LTDWGQGTMV TVSS
HC2_1	93	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCTASGYTFP DYYMNWVRQA PGKGLEWVGD IDPNYGGTTY AASVKGRFTI SVDRSKSIAY LQMSSLKTED TAVYYCTRGA LTDWGQGTMV TVSS
HC2_2	94	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCTASGYTFP DYYMNWVRQA PGKGLEWVGD IDPNYGGTTY NASVKGRFTI SVDRSKSIAY LQMSSLKTED TAVYYCARGA LTDWGQGTMV TVSS
HC2_3	95	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCTASGYTFP DYYMNWVRQA PGKGLEWVGD IDPNYGGTTY NQSVKGRFTI SVDRSKSIAY LQMSSLKTED TAVYYCARGA LTDWGQGTMV TVSS

(C) Derivados humanizados de anticuerpo 3D10

Una búsqueda confirmó que los anticuerpos con una combinación de líneas germinales, similar al emparejamiento de IGKV3-11*01 con IGHV1-2*02, existían. El emparejamiento se marca como Aceptor 1. Adicionalmente, se descubrieron anticuerpos con una combinación de líneas germinales, similar al emparejamiento de IGKV 1-9*01 con IGHV3-49*04. El emparejamiento se marca como Aceptor 2.

Las cadenas humanizadas ligeras y pesadas descritas anteriormente se combinaron para crear 14 anticuerpos humanizados variantes, cuyas secuencias se describen en la Tabla 12.

Tabla 12
Anticuerpos 3D10 humanizados

Anticuerpo	Cadena ligera	SEQ ID NO.	Cadena pesada	SEQ ID NO.
h3D10 Var 1	LC1_1	81	HC1_1	90

Tabla 12 Anticuerpos 3D10 humanizados				
h3D10 Var 2	LC1_2	82	HC1_2	91
h3D10 Var 3	LC1_3	83	HC1_2	91
h3D10 Var 4	LC1_2	82	HC1_3	92
h3D10 Var 5	LC1_3	83	HC1_3	92
h3D10 Var 6	LC2_1	84	HC2_1	93
h3D10 Var 7	LC2_2	85	HC2_2	94
h3D10 Var 8	LC2_3	86	HC2_2	94
h3D10 Var 9	LC2_2	85	HC2_3	95
h3D10 Var 10	LC2_3	86	HC2_3	95
h3D10 Var 11	LC1_1	81	HC2_1	93
h3D10 Var 12	LC2_1	84	HC1_1	90
h3D10 Var 13	LC1_3	83	HC2_3	95
h3D10 Var 14	LC2_3	86	HC1_3	92

Ejemplo 5

Producción de anticuerpos anti PD-1 humanizados

Para ilustrar la producción de dichos derivados humanizados, se produjeron derivados humanizados de anticuerpo anti PD-1 humano 1H3 de acuerdo con el procedimiento anteriormente descrito (un anticuerpo quimérico que incorpora la región variable de 1H3 y una región Fc IgG1 humano se usó como el anticuerpo parental).

Se generaron alineamientos de secuencia que comparan dominios variables de cadena ligera 1H3 con las líneas germinales humanas usando: líneas germinales de cadena ligera de IGKV3 (IGKV3-11*01, IGKV3-11*02, IGKV3D-11*01, IGKV3D-20*01, IGKV3-NL4*01, IGKV3D-7*01, IGKV3-20*01, IGKV3-NL5*01, IGKV3-15*01, IGKV3-NL1*01, IGKV3-20*01, IGKV3-NL2*01, IGKV3-NL3*01), líneas germinales de cadena ligera de IGKV1 (IGKV1-9*01, IGKV1D-43*01, IGKV1-39*01, IGKV1D-13*02, IGKV1-8*01, IGKV1D-13*01, IGKV1-12*01, IGKV1D-16*01, IGKV1-5*01 e IGKV1-NL1*01) y líneas germinales de cadena ligera de IGKJ (IGKJ2*02, IGKJ2*01, IGKJ2*04, IGKJ2*03, IGKJ5*01, IGKJ4*01, IGKJ3*01 e IGKJ1*01).

Se generaron alineamientos de secuencia que comparan dominios variables de cadena pesada 1H3 con las líneas germinales humanas usando: líneas germinales de cadena ligera de IGHV3 (IGHV3-48*01, IGHV3-48*02, IGHV3-48*03, IGHV3-11*01, IGKV3-21*01, IGHV3-11*03, IGHV3-30*03, IGHV3-9*01, IGHV3-7*01 e IGHV3-30*10), líneas germinales de cadena ligera de IGHV1 (IGHV1-3*01, IGHV1-69*08, IGHV1-69*11, IGHV1-46*01, IGHVI-69*05, IGHV1-69*06, IGHV1-69*01, IGHV1-46*02, IGHV1-69*02 e IGHV1-69*10) y líneas germinales de cadena pesada de IGHJ (IGHJ6*01, IGHJ6*03, IGHJ4*01, IGHJ6*04, IGHJ5*02, IGHJ3*02, IGHJ5*01, IGHJ3*01, IGHJ2*01 e IGHJ1*01).

Basándose en la identidad de secuencia general, posiciones de interfaz coincidentes y posiciones canónicas de CDR clasificadas de forma similar, se identificaron dos familias de línea germinal para cada una de las cadenas ligeras y pesadas como posibles marcos conservados aceptores (IGKV3 e IGKV1 para la cadena ligera y 1GHV3 e IGHV1 para la cadena pesada). Se descubrió que el anticuerpo 1H3 era más similar a la cadena ligera de línea germinal 1GKV3-11*01 y pesada IGHV3-48*01. Basándose en la identidad de secuencia general, posiciones de interfaz coincidentes y posiciones canónicas de CDR clasificadas de forma similar, se identificaron dos familias de línea germinal para cada una de las cadenas ligeras y pesadas como posibles marcos conservados aceptores (IGKV3 e IGKV1 para la cadena ligera e IGHV3, IGHV1 para la cadena pesada.

(A) Humanización de la cadena ligera

El anticuerpo 1H3 tiene una CDR L1 de 10 restos corta y se clasifica en la clase canónica I. Ninguna línea germinal humana tiene una CDR L1 tan corta, pero las líneas germinales más cercanas en cada familia seleccionada (IGKV3-II*01 e IGKV1-9*01) tienen bucles L1 cortos y contienen los restos de marco conservado correctos para soportar un bucle LI de clase I. La similitud de secuencia general fue buena para ambos marcos conservados aceptores; sin embargo hay diferencias en dos posiciones de interfaz (Y33 y P45). Y33 está en CDR L1 y aunque las dos familias aceptoras no contienen tirosina en esta posición otras familias aceptoras potenciales sí. La diferencia en P45 estaba a la par de varias otras diferencias en FR2 de la cadena ligera parental. En pocas palabras, la línea germinal parental pertenece a una familia de línea germinal de ratón con una FR2 distinta a cualquiera en las líneas germinales humanas.

Las líneas germinales 1GKV3-11*01 e IGKV 1-9*01 se seleccionaron como marcos conservados aceptores de cadena ligera. Las secuencias de las cadenas ligeras de 1GKV3-11 *01 e IGKV 1-9*01 se han mostrado anteriormente como SEQ ID NO:78 y SEQ ID NO:79, respectivamente. Los alineamientos de estas secuencias con la cadena ligera del anticuerpo 1H3 se muestran en la Tabla 13 (los restos de CDR del anticuerpo 1H3 se muestran en cursiva, los restos alineados idénticos se muestran subrayados):

Tabla 13
Alineamiento de regiones variables de cadena ligera

Cadena ligera	SEQ ID NO.	Secuencia
		1 10 20 30 40
1H3	15	QIVLTQSPAL MSASPGEKVT MTC***SASSSVS YMY***WYQQKPR
IGKV3-11*01	78	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVSS YLAWYQQKPG
IGKV1-9*01	79	DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCRASQGISS YLAWYQQKPG
		41 50 60 70 80
1H3	15	SSPKPWIY***LT SNLAS***GVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMEAE
IGKV3-11*01	78	QAPRLLIYDA SNRATGIPAR FSGSGSGTDF TLTISSLEPE
IGKV1-9*01	79	KAPKLLIYAA STLQSGVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPE
		81 90 100 106
1H3	15	DAATYYC***QQW SSNPFT***FGSG TKLEIK
IGKV3-11*01	78	DFAVYYCQQR SNWP------ ------
IGKV1-9*01	79	DFATYYCQQL NSYP------ ------

Los genes de segmento J se compararon con la secuencia parental sobre FR4 y el segmento J IGKJ2*02 (SEQ ID NO:96: CTFGQGTKLEIK) se seleccionó con respecto a la cadena ligera.

Se crearon dos cadenas humanizadas para cada uno de los dos marcos conservados aceptores preferidos, IGKV3-11*01 e IGKV1-9*01. Las dos cadenas de LC1 se obtuvieron de IGKV3-11*01; las dos cadenas de LC2 se obtuvieron de IGKV1-9*01. La primera cadena humanizada para cada marco conservado aceptor contenía todas las sustituciones humanizantes consideradas posibles y es la más humana de las tres cadenas. La segunda cadena humanizada para cada marco conservado aceptor contenía varias retromutaciones en posiciones que alteran la carga, potencialmente interfieren con el empaquetamiento principal o podrían afectar a la conformación de las CDR. Las secuencias de estas cuatro cadenas humanizadas se muestran a continuación:

LC1_1 (SEQ ID NO:97)
```
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASSSVS YMYWYQQKPG
QAPRLLIYLA SNRATGIPAR FSGSGSGTDY TLTISSLEPE
DFAVYYCQQW SSNPFTFGQG TKLEIK
```

LC1_2 (SEQ ID NO:98)
```
QIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCSASSSVS YMYWYQQKPG
QAPRLLIYLT SNRATGIPAR FSGSGSGTDY TLTISSLEPE
DFAVYYCQQW SSNPFTFGQG TKLEIK
```

LC2_1 (SEQ ID NO:99)
```
DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASSSVS YMYWYQQKPG
KAPKLLIYLA SNLASGVPSR FSGSGSGTEY TLTISSLEPE
DFATYYCQQW SSNPFTFGQG TKLEIK
```

LC2_2 (SEQ ID NO:100)
```
QIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASSSVS YMYWYQQKPG
KAPKLLIYLT SNLASGVPSR FSGSGSGTEY TLTISSLEPE
DFATYYCQQW SSNPFTFGQG TKLEIK
```

Las secuencias para estas cuatro cadenas humanizadas se muestran en la Tabla 14 con diferencias relativas a la cadena ligera de 1H3 Var1 parental mostrada en negrita y subrayada.

Tabla 14 Cadenas ligeras humanizadas de anticuerpo 1H3		
Cadena ligera	SEQ ID NO	Secuencia
LC1_1	97	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASSSVS YMYWYQQKPG QAPRLLIYLA SNRATGIPAR FSGSGSGTDY TLTISSLEPE DFAVYYCQQW SSNPFTFGQG TKLEIK
LC1_2	98	QIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCSASSSVS YMYWYQQKPG QAPRLLIYLT SNRATGIPAR FSGSGSGTDY TLTISSLEPE DFAVYYCQQW SSNPFTFGQG TKLEIK
LC2_1	99	DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASSSVS YMYWYQQKPG KAPKLLIYLA SNLASGVPSR FSGSGSGTEY TLTISSLEPE DFATYYCQQW SSNPFTFGQG TKLEIK
LC2_2	100	QIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASSSVS YMYWYQQKPG KAPKLLIYLT SNLASGVPSR FSGSGSGTEY TLTISSLEPE DFATYYCQQW SSNPFTFGQG TKLEIK

(B) Humanización de la cadena pesada

A la luz de los criterios anteriormente analizados, dos marcos conservados aceptores de línea germinal candidatos: IGHV3-48*01 (línea germinal IGHV3) e IGRV1-3*01 (línea germinal IGHV1) se seleccionaron para la humanización de la cadena pesada del anticuerpo 1H3 Var1.

El marco conservado aceptor 1GHV3-48*01 se seleccionó como el marco conservado aceptor pesado primario debido a su similitud de secuencia general. Los restos de interfaz coinciden excepto por H35, una posición en la que se permite cierta variación y contiene los restos correctos para determinar la clase canónica para CDR H1. CDR H2 no está en ninguna clase canónica basada en secuencia debido a una tirosina en la posición 56. La elección del segundo marco conservado aceptor de cadena pesada se realizó después de retirar cualquier línea germinal estrechamente relacionada con IGHV3-48*01. La línea germinal más cercana se convirtió después en IGHV1-3*01. El número de diferencias para tener en cuenta se hace mayor ya que el empaquetamiento del núcleo inferior es diferente, sin embargo la línea germinal debería soportar las CDR y actuar como un marco conservado aceptor adecuado. Se observó que la secuencia parental contiene una cisteína en la posición conservada 60, en la que todas las líneas germinales humanas tienen una tirosina. Las secuencias del marco conservado aceptor 1GHV3-48*01 y el marco conservado aceptor IGHV1-3*01 se muestran a continuación:

Marco conservado aceptor IGHV3-48*01 (SEQ ID NO:101):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY
ISSSSSTIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAR

Marco conservado aceptor IGHV1-3*01 (SEQ ID NO:102):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYAMHWVRQA PGQRLEWMGW
INAGNGNTKY SQKFQGRVTI TRDTSASTAY MELSSLRSED TAVYYCAR

La Tabla 15 muestra el alineamiento de estas secuencias con la cadena pesada del anticuerpo 1H3 (los restos de CDR del anticuerpo 1H3 se muestran en cursiva, los restos alineados idénticos se muestran subrayados):

Tabla 15 Alineamiento de regiones variables de cadena pesada		
Cadena pesada	SEQ ID NO.	Secuencia
		1 10 20 30 40
1H3	16	EVQLVESGGG LVKPGGSLKL SCAAS***GFTFS DYGMH***WVRQA
IGHV3-48*01	101	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA
IGKV1-3*01	102	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYAMHWVRQA
		41 50 60 70 80

Tabla 15 Alineamiento de regiones variables de cadena pesada		
1H3	16	PEKGLEWVA***Y ISSGSYTIYY TDTVKG***RFTI SRDNAKNTLF
IGHV3-48*01	101	PGKGLEWVSY ISSSSSTIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY
IGHV1-3*01	102	PGQRLEWMGW INAGNGNTKY SQKFQGRVTI TRDTSASTAY
		81 90 100 110 120
1H3	16	LQMTSLRSED TAMYYCAR***RG YGSFYEYYFD Y***WGQGTTLTV SS
IGHV3-48*01	101	LQMNSLRAED TAVYYCAR
IGKV1-3*01	102	MELSSLRSED TAVYYCAR

Los genes de segmento J se compararon con la secuencia parental sobre FR4 y el segmento J IGHJ6*01 (SEQ ID NO:103: WGQGTTVTV) se seleccionó con respecto a la cadena pesada.

Se crearon tres cadenas humanizadas para cada uno de los dos marcos conservados aceptores preferidos, IGHV3-48*01 e IGHV1-3*01. Las tres cadenas de HC1 se obtuvieron de IGHV3-48*01; las tres cadenas de HC2 se obtuvieron de IGHV1-3*01). La primera cadena humanizada para cada marco conservado aceptor contenía todas las sustituciones humanizantes consideradas posibles y es la más humana de las tres cadenas. La segunda cadena humanizada para cada marco conservado aceptor contenía varias retromutaciones en posiciones que alteran la carga, potencialmente interfieren con el empaquetamiento principal o podrían afectar a la conformación de las CDR. La tercera cadena, para cada uno de los marcos conservados aceptores, contenía el mayor número de retromutaciones, incluyendo sustituciones que alteran la carga y podrían potencialmente la afinidad de unión. Las secuencias de estas seis cadenas humanizadas se muestran a continuación:

HC1_1 (SEQ ID NO: 104)
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYGMHWVRQA
PGKGLEWVSY ISSGSSTIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNTLY
LQMSSLRAED TAVYYCARRG YGSFYEYYFD YWGQGTTVTV
SS

HC1_2 (SEQ ID NO:105)
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYGMHWVRQA
PGKGLEWVAY ISSGSYTIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNTLY
LQMSSLRAED TAVYYCARRG YGSFYEYYFD YWGQGTTVTV
SS

HC1_3 (SEQ ID NO:106)
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYGMHWVRQA
PGKGLEWVAY ISSGSYTIYS ADSVKGRFTI SRDNAKNTLY
LQMSSLRAED TAVYYCARRG YGSFYEYYFD YWGQGTTVTV
SS

HC2_1 (SEQ ID NO:107)
QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGFTFS DYGMHWVRQA
PGQRLEWMGY ISSGSSTIYY SQKFQGRVTI TRDNSASTLY
MELSSLRSED TAVYYCARRG YGSFYEYYFD YWGQGTTLTV
SS

HC2_2 (SEQ ID NO:108)
EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCAASGFTFS DYGMHWVRQA
PGQRLEWMGY ISSGSYTIYY SQKFQGRVTI TRDNSASTLY
MELSSLRSED TAVYYCARRG YGSFYEYYFD YWGQGTTLTV
SS

HC2_3 (SEQ ID NO:109)
EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCAASGFTFS DYGMHWVRQA
PGQRLEWVAY ISSGSYTIYY SQKFQGRVTI TRDNSASTLY
MELSSLRSED TAVYYCARRG YGSFYEYYFD YWGQGTTLTV
SS

Las secuencias para estas seis cadenas humanizadas se muestran en la Tabla 16 con diferencias relativas a la cadena pesada de 1H3 parental mostrada en negrita y subrayada.

Tabla 16 Cadenas pesadas humanizadas de anticuerpo 3H1		
Cadena pesada	SEQ ID NO	Secuencia
HC1_1	104	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYGMHWVRQA PGKGLEWVSY ISSGSSTIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCARRG YGSFYEYYFD YWGQGTTVTV SS
HC1_2	105	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYGMHWVRQA PGKGLEWVAY ISSGSYTIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCARRG YGSFYEYYFD YWGQGTTVTV SS
HC1_3	106	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYGMHWVRQA PGKGLEWVAY ISSGSYTIYS ADSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCARRG YGSFYEYYFD YWGQGTTVTV SS
HC2_1	107	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGFTFS DYGMHWVRQA PGQRLEWMGY ISSGSSTIYY SQKFQGRVTI TRDNSASTLY MELSSLRSED TAVYYCARRG YGSFYEYYFD YWGQGTTLTV SS
HC2_2	108	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCAASGFTFS DYGMHWVRQA PGQRLEWMGY ISSGSYTIYY SQKFQGRVTI TRDNSASTLY MELSSLRSED TAVYYCARRG YGSFYEYYFD YWGQGTTLTV SS
HC2_3	109	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCAASGFTFS DYGMHWVRQA PGQRLEWVAY ISSGSYTIYY SQKFQGRVTI TRDNSASTLY MELSSLRSED TAVYYCARRG YGSFYEYYFD YWGQGTTLTV SS

(C) Derivados humanizados de anticuerpo 1H3

Una búsqueda confirmó que existen anticuerpos con una combinación de líneas germinales cercana al emparejamiento de IGKV3-11*01 con IGKV3-48*01 pesado. El emparejamiento se marca como Aceptor 1. Posteriormente, se encontraron anticuerpos con un emparejamiento similar a IGKVI-9*01 con IGHVI-3*01. El emparejamiento se marca como Aceptor 2.

Las cadenas humanizadas ligeras y pesadas descritas anteriormente se combinaron para crear 14 anticuerpos humanizados variantes, cuyas secuencias se describen en la Tabla 17.

Tabla 17 Anticuerpos 1H3 humanizados				
Anticuerpo	Cadena ligera	SEQ ID NO.	Cadena pesada	SEQ ID NO.
h1H3 Var 1	LC1_1	97	HC1_1	104
h1H3 Var 2	LC1_1	97	HC1_2	105
h1H3 Var 3	LC1_1	97	HC1_3	106
h1H3 Var 4	LC1_2	98	HC1_1	104
h1H3 Var 5	LC1_2	98	HC1_2	105
h1H3 Var 6	LC1_2	98	HC1_3	106
h1H3 Var 7	LC2_1	99	HC2_1	107
h1H3 Var 8	LC2_1	99	HC2_2	108
h1H3 Var 9	LC2_1	100	HC2_3	109
h1H3 Var 10	LC2_2	100	HC2_1	107
h1H3 Var 11	LC2_2	99	HC2_2	108
h1H3 Var 12	LC2_2	99	HC2_2	108
h1H3 Var 13	LC1_1	96	HC2_1	107
h1H3 Var 14	LC2_1	98	HC1_1	104

Ejemplo 6

Caracterización de anticuerpo anti PD-1 humano 1H3

Para evaluar las propiedades de los anticuerpos anti PD-1 de la presente divulgación, se produjo una construcción que posee regiones Fab murinas quiméricas ("qu") anti PD-1 humano del anticuerpo 1H3 y una región Fc IgG1 humana (construcción 1H3). La construcción se ensayó con respecto a su capacidad para unirse con PD-1 humano.

La Figura 12 muestra los resultados de un experimento en el que se preincubaron células CHO transfectadas con PD-1 de longitud completa humano con una dosis saturada de mAb PD-1 antes de teñirse por mFc anti-hB7-HI-F*c* o anti-hB7-DC marcado con biotina. La Figura 12 muestra que una construcción de anticuerpo monoclonal murino que posee regiones Fab murinas quiméricas ("qu") anti PD-1 humano del anticuerpo 1H3 y una región Fc IgG1 humana bloquea la unión de B7-H1-Fc y B7-DC-Fc con células que expresan PD-1 humano, como resultado de la unión del anticuerpo con las células. M1, m3 y 1E8 son todos anticuerpos anti-PD-1 de control positivo. En geles no reductores, la construcción migró como una única banda de aproximadamente 200 PM; esta banda se reemplazó con la banda a aproximadamente 52 PM en condiciones reductoras.

La construcción de 1H3 mostró una K_D de afinidad de 2,19 nM, una "velocidad de asociación" K_a de 0,734 x 10^{-5} /Ms y una "velocidad de disociación" K_d de 1,61 x 10^{-4} /s. Se descubrió que la CE_{50} de la construcción era de 75 ng. La Figura 13 compara la unión obtenida con esta construcción con la del anticuerpo anti PD-1 disponible en el mercado, EH12. Se descubrió que la construcción era capaz de bloquear completamente la capacidad de hPD-1 (expresado por células CHO) para unirse con B7-H1-Fc o B7-DC-Fc como se muestra en la Figura 14. La Figura 15 muestra que la construcción de 1H3 quimérica era capaz de unirse con hPD-1-Fc y bloquear la unión de dicho hPD-1-Fc con hB7-H1 expresado por células CHO.

La capacidad de la construcción de 1H3 para unirse con linfocitos T primarios humanos se evaluó en relación con un anticuerpo de control (palivizumab; SYNAGIS®, Medimmune, Inc.); 1H3 demostró la unión potenciada con células tanto CD8 como CD4 (Figuras 16A-16B).

Para ilustrar las características funcionales de los anticuerpos de la presente divulgación, se evaluó la capacidad de la construcción 1H3 y de construcciones de anticuerpo quimérico que tienen las regiones FAB del anticuerpo 1H3 ("construcción de 1H3"), 1E3 ("construcción de 1E3") y anticuerpo 3D10 ("construcción de 3D10") para potenciar la actividad de linfocitos T. Se expusieron células dendríticas (CD) inmaduras a TNFα y PGE2 durante dos días (las células se incubaron en presencia de toxoide del tétanos (TT) 50 µg/ml durante una noche el segundo día de la maduración). Se descubrió que las células resultantes se habían convertido en CD maduras como se determinó por su capacidad adquirida para expresar B7-H1 y B7-DC. Las células CD maduras se incubaron después durante dos semanas en presencia de linfocitos T autólogos marcados con carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) y TT 100 ng/ml y las construcciones de anticuerpos descritas anteriormente. Como se muestra en la Figura 17, los anticuerpos de la presente divulgación fueron capaces de bloquear las interacciones de B7-H1-PD-1 como se mide por expansión de linfocitos T de memoria específicos de antígeno. El día 7, se realizó un análisis de las citocinas presentes en los sobrenadantes celulares (Tabla 18).

Tabla 18

Citocina (pg/ml)	Ig de control	Construcción de 1H3	Construcción de 1E3	Construcción de 3H10
G-CSF	8,04	18,41	17,39	20,40
GM-CSF	35,12	379,05	162,30	445,78
IFN-γ	61,78	5967,64	1247,81	5337,78
IL-2	12,72	12,25	9,45	13,96
IL-4	3,16	9,93	6,98	9,59
IL-5	3,51	31,34	9,40	110,40
IL-6	125,40	418,24	134,56	124,31
IL-7	7,88	21,81	13,67	11,93
IL-8	5027,28	7978,03	5010,73	4292,56
IL-10	6,99	29,45	15,30	18,33
IL-12p70	23,18	106,55	74,84	110,13
IL-13	18,90	378,05	79,33	738,62
IL-17	368,98	503,01	407,81	421,37
MCP-1	2174,36	9954,89	4792,30	5895,81
MIP-1β*	1453,85	5750,63	9197,32	8511,53

Tabla 18				
TNF-α	51,75	486,39	353,89	949,85
* día 6				

Como se muestra en la Tabla 18, ambas de las construcciones de anticuerpo anti hPD-1 promovieron respuestas tanto Th1 como Th2. Se descubrieron cantidades muy bajas de IL-1β, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10 y G-CSF en los sobrenadantes. Todos los mAb tienen muy baja endotoxina, menor de 0,01 UE/mg; adicionalmente, las CD y los linfocitos T se mantuvieron en medios sin suero. La tinción con IFN-γ intracelular de células del día 7 reveló que solamente 0,15 % de las células de control eran IFN-γ^+, 1,9 % de las células que se habían incubado con la construcción de 1H3, 0,91 % de las células que se habían incubado con la construcción de 1E3 y 3,2 % de las células que se habían incubado con la construcción de 3D10 eran IFN-γ^+.

Por lo tanto, en resumen, se descubrió que la construcción de 1H3 media en un aumento de aproximadamente 7 veces en proliferación de linfocitos T y un aumento de aproximadamente 12 veces en la producción de IFN-γ por célula. El efecto acumulado de dicha acción es un aumento de aproximadamente 100 veces en la secreción de IFN-γ.

Como caracterización funcional adicional, las CD derivadas de monocitos se maduraron por incubación con TNFα y PGE2. Las células se sometieron después a pulsos durante 2 horas en presencia de un grupo de péptidos CEF restringidos de clase I y clase II mixtos (es decir, péptidos de citomegalovirus, virus de Epstein-Barr y en virus de la gripe) y se incubaron con linfocitos T autólogos marcados con CFSE (columna LD, 95 % de pureza) durante dos semanas. Las células tratadas se incubaron después durante dos semanas en presencia de linfocitos T autólogos marcados con CFSE (columna LD, 95 % de pureza) y las construcciones de anticuerpos descritas anteriormente. El día 7, se descubrió que el porcentaje de linfocitos T diluidos en CFSE era del 40 % para células incubadas con el anticuerpo de control, 37 % para células incubadas con la construcción de 1H3, 50 % para células incubadas con la construcción de 3D10, 57 % para células incubadas con el anticuerpo CA-18C3 (un anticuerpo monoclonal específico anti-IL-1α). El día 11, el porcentaje de linfocitos T diluidos en CFSE se evaluó de nuevo. Después se descubrió que el porcentaje de linfocitos T diluidos en CFSE era del 17 % para células incubadas con el anticuerpo de control y del 38 % para células incubadas con la construcción de 1H3. Se descubrió que el porcentaje de linfocitos T diluidos en CFSE era del 27 % para células incubadas con el anticuerpo CA-18C3.

Los sobrenadantes de las células tratadas también se analizaron con respecto a citocinas IL-2 e IFN-γ el día 7 (Tabla 19).

Tabla 19				
Citocina (pg/ml)	Ig de control	Construcción de 1H3	Construcción de 1E3	Construcción de 3H10
IFN-γ	26816,44	39423,11	39658,19	31954,72
IL-2	432,03	868,17	1182,30	1379,07

Los sobrenadantes de las células tratadas también se analizaron con respecto a citocinas IFN-γ, TNFα y GM-CSF el día 11. Se ha descubierto que la construcción de 1H3 media en una potenciación de las tres citocinas en relación con un anticuerpo de control (Tabla 20).

Tabla 20			
Citocina (pg/ml)	Ig de control	Construcción de 1H3	Construcción de 3H10
GM-CSF	52,75	150,66	70,71
IFN-γ	223,15	786,11	228,50
TNF-α	21,06	46,26	51,75

Como caracterización funcional adicional, se maduraron CD derivadas de monocitos (obtenidas de PBMC donantes HLA-A2 positivas) por exposición a TNFα y PGE2 y las CD maduradas se sometieron después a pulsos con péptidos MART-1 y Flu M1 restringidos a HLA-A2 durante 2 horas. A continuación, las células se incubaron durante dos semanas en presencia de linfocitos T autólogos marcados con CFSE (columna LD, 95 % de pureza) y la construcción de 1H3 o construcción de 3D10 descritas anteriormente. El efecto de los péptidos MART-1 y M1 en la producción de citocinas se muestra en

Tabla 21.

Tabla 21			
Citocina (pg/ml)	Ig de control	Construcción de 1H3	Construcción de 3H10
IFN-γ	0	357,64	0
IL-17	0	225,81	19,76

Ejemplo 7

Caracterización de anticuerpos humanizados anti PD-1

Los anticuerpos 1H3_var 1 -1H3_var 14 humanizados anteriormente descritos (véase Tabla 17) se evaluaron para confirmar su capacidad de unirse con PD-1 humano y sus capacidades terapéuticas. Los polipéptidos que codificaban los anticuerpos se expresaron en células CHO y los títulos de anticuerpos bifuncionales se determinaron por ELISA (Tabla 22).

Tabla 22			
Anticuerpo	Cadena ligera	Cadena pesada	Título de anticuerpo (ng/ml)
h1H3 Var 1	LC1_1	HC1_1	623
h1H3 Var 2	LC1_1	HC1_2	6520
h1H3 Var 3	LC1_1	HC1_3	1344
h1H3 Var 4	LC1_2	HC1_1	1160
h1H3 Var 5	LC1_2	HC1_2	8840
h1H3 Var 6	LC1_2	HC1_3	1906
h1H3 Var 7	LC2_1	HC2_1	35
h1H3 Var 8	LC2_1	HC2_2	22
h1H3 Var 9	LC2_1	HC2_3	4
h1H3 Var 10	LC2_2	HC2_1	232
h1H3 Var 11	LC2_2	HC2_2	66
h1H3 Var 12	LC2_2	HC2_2	17
h1H3 Var 13	LC1_1	HC2_1	219
h1H3 Var 14	LC2_1	HC1_1	134
Anticuerpo de control parental 1H3	--	--	158
Control	--	--	11

Para asegurar que la unión era específica de PD-1 humano, se evaluó la unión usando células CHO que se habían transfectado para expresar PD-1 humano. Los resultados de dichos experimentos de unión se muestran en las Figuras 18A-18D. Repitiendo dichos experimentos de unión en presencia de 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 o 3000 ng de la variante h1H3, se descubrió que la capacidad de dichos anticuerpos humanizados para unirse con PD-1 dependía en todos los casos de la concentración de anticuerpo.

Para demostrar la capacidad de los anticuerpos anti-PD-1 humanizados de la presente divulgación para bloquear las interacciones entre PD-1 y sus ligandos naturales, se incubaron células HEK293 que expresaban PD-1 en presencia de B7-H1 (o B7-DC) y variantes de h1H3 seleccionadas. Se descubrió que los anticuerpos variantes h1H3 eran capaces de bloquear la unión del B7-H1 con las células HEK293 (Figura 19A (B7-H1); Figura 19B (B7-DC) (Ctl = synagis, WT = 1H3 quimérico).

La Tabla 23 proporciona los resultados obtenidos en un procedimiento de expresión transitoria y purificación a una escala de 500 ml. Los geles no reductores mostraron que los anticuerpos expresados migraron predominantemente como una única banda de aproximadamente 160 kD; cuando se analizaron en geles reductores, esta banda se reemplazó por bandas de aproximadamente 60 kD y 30 kD. Los resultados muestran que las variantes h1H3 de aceptor 1: h1H3 Var1, h1H3 Var3, h1H3 Var4 y h1H3 Var6 mostraron buena unión con PD-1 humano mientras que las variantes h1H3 de aceptor 2: h1H3 Var7 - h1H3 Var14 mostraron peor unión con PD-1 humano. En consecuencia, las cadenas pesadas y ligeras de variantes h1H3 de aceptor 1: h1H3 Var1 - h1H3 Var6 se clonaron en el vector génico doble (DGV; Lonza Biologics, Berkshire, Reino Unido; Bebbington, C.R. et al. (1992) "High-Level Expression Of A Recombinant Antibody From Myeloma Cells Using A Glutamine Synthetase Gene As An Amplifiable Selectable Marker," Biotechnology (NY) 10(2):169-175) y se transfectaron en células CHO para permitir la producción de líneas celulares productoras de anticuerpos estables.

Tabla 23					
Variante h1H3	Concentración (mg/ml)	Volumen (ml)	Total (mg)	UE/µg	CE_{50} (nM)
h1H3 Var 1	1,31	1,5	2,0	0,012 *	6
h1H3 Var 2	0,99	1,7	1,7	0,003	3
h1H3 Var 3	0,61	1,6	1,0	0,005	3
h1H3 Var 4	1,67	1,6	2,7	0,003	6
h1H3 Var 5	1,44	1,5	2,2	0,003	3
h1H3 Var 6	0,69	1,6	1,1	0,008	3
Parental					3
* Nivel de endotoxinas comercial muy bajo <0,01 UE/µg					

El análisis de unión a concentraciones de anticuerpo de 0,5, 1,5, 5, 15, 50, 150 y 500 ng/ml así como 1,5, 5, 15 y 50 µg/ml reveló que la unión era dependiente de la concentración. La capacidad de unión específica de PD-1 de las variantes se determinó a concentraciones de anticuerpo que variaron de 0 a aproximadamente 350 nM. La Figura 20 muestra las curvas resultantes para h1H3 Var 1 - h1H3 Var 6 e indica que estos anticuerpos se unen con PD-1. Los anticuerpos h1H3 Var 1 y h1H3 Var 4 muestran unión reducida en relación con el anticuerpo parental. Por el contrario, h1H3 Var 2, h1H3 Var 3, h1H3 Var 5 y h1H3 Var 6 mostraron unión que era comparable con la del anticuerpo parental. Los datos de CE50 de estos ensayos se muestran en la Tabla 23.

Aunque la divulgación se ha descrito en relación con casos específicos de la misma, se entenderá que tiene capacidad para modificaciones adicionales y se pretende que esta solicitud abarque cualquier variación, uso o adaptación de la divulgación siguiendo, en general, los principios de la divulgación e incluyendo diferencias con respecto a la presente divulgación tales como las que están dentro de la práctica conocida o habitual en la técnica a la que pertenece la divulgación y que puedan aplicarse a las características esenciales expuestas anteriormente en el presente documento.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Amplimmune, Inc. Langermann, Solomon Liu, Linda Marshall, Shannon Yao, Sheng

<120> Anticuerpos y otras moléculas que se unen con B7-H1 y PD-1

<130> 1000.00011

<150> US 61/147.414
<151> 20/04/2011

<160> 109

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 107
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 1

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

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

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys
100 105

<210> 2
<211> 118
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 2

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

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

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Val
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg Tyr Gly Gly Trp Leu Ser Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 3
<211> 107
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 3

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

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

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
    50                  55                  60

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

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys
            100                 105
```

<210> 4
<211> 120
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 4

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr
20 25 30

Ser Ile Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Met Trp Ala Gly Gly Gly Thr Asn Ser Asn Ser Val Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg Tyr Tyr Gly Asn Ser Pro Tyr Tyr Ala Ile Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5
<211> 113
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 5

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

Glu Lys Val Ser Met Gly Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Asp Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

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

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

Lys

<210> 6
<211> 118
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 6

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

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

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Leu
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg Arg Gly Gly Trp Leu Leu Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 106
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 7

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Arg Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Ser
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ala Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 8
<211> 118
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 8

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Phe Pro Arg Asp Asn Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe
50 55 60

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

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

Thr Lys Glu Asn Trp Val Gly Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Leu Ser Ser
115

<210> 9
<211> 106
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 9

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30

Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Phe Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Thr Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asn Asn Pro Leu Thr
85 90 95

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

<210> 10
<211> 114
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 10

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

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

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile Asp Pro Asn Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ala Leu Thr Asp Trp Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 11
<211> 106
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 11

Asp Ile Gln Met Thr Gln Phe Pro Ser Ser Leu Cys Ala Ser Gln Gly
1 5 10 15

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

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

His Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 12
<211> 119
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 12

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

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

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

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

Thr Ala Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 13
<211> 107
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 13

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Thr Asn
20 25 30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 14
<211> 116
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 14

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

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

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

Gly His Ile Asn Pro Ser Ser Gly Phe Thr Thr Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Asp Tyr Asp Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 15
<211> 106
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 15

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 16
<211> 122
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 16

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

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

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Thr Ile Tyr Tyr Thr Asp Thr Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Gly Tyr Gly Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 17

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile Tyr
1 5 10

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 18

Ser Ala Ser Ser Ser Ile Arg Tyr Met His
1 5 10

<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 19

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 20

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Ser Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 21

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 22
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia consenso de CDR1 de cadena ligera anti B7-H1 humano

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> R, S o K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> A o S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> R, N, D, Q, E, H, K, M o S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> SLLYSS o ausente

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Ausente o N o D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> A, Q, E, L, K, M, P, S, T, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> R, N, S o T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> A, R, N, C, Q, E, H, I, L, K, M, F, S, T, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> I, L, M o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> A, R, N, Q, E, H, I, K, M, F, S, T o Y

<400> 22

```
Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1               5                   10
```

<210> 23
<211> 6
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 23

```
Ser Leu Leu Tyr Ser Ser
1               5
```

<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 24

```
Ala Thr Phe Asn Leu Ala Ser
1               5
```

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 25

Asp Thr Ser Lys Leu Thr Ser
1 5

<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 26

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 27

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 28
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 28

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia consenso de CDR2 de cadena ligera anti B7-H1 humano

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> A, C, G, S, T o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> A, C, H, I, L, M, F, S, T, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> R, N, D, Q, E, K, S o T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> A, R, Q, L, K, M, S, T o Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> A, R, N, D, Q, E, G, H, K, M, F, P, S, T o Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> A, N, S o T

<400> 29

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 30

Gln Gln Trp Ser Asn Asn Pro Leu Thr
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 31

His Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 32

Gln Gln Asp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 33

Gln Gln Tyr Tyr Gly Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 34

Gln Gln Asp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia consenso de CDR3 de cadena ligera anti B7-H1 humano

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> R, N, Q, E o H

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> A, R, N, C, Q, E, H, I, L, K, M, F, S, T, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> N, G o S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> A, R, N, D, Q, E, G, H, K, M, P, S, T o Y

<400> 35

Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr
1 5

<210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 36

Gly Tyr Thr Phe Pro Asp Tyr Tyr Met Asn
1 5 10

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 37

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asp Ile Asn
1 5 10

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 38

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Trp Asn
1 5 10

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 39

Gly Tyr Ser Ile Ile Ser Asp Tyr Trp Asn
1 5 10

<210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 40

Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr Ser Ile Asn
1 5 10

<210> 41
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia consenso de CDR1 de cadena pesada anti B7-H1 humano

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Y o F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> T o S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> I, L, M o F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> A, R, N, D, C, Q, E, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> N, D, Q, E, K, P, S o T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> A, R, C, Q, E, H, I, L, K, M, F, S, T, W, Y o V

<400> 41

Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn
1 5 10

<210> 42
<211> 17
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 42

Asp Ile Asp Pro Asn Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 43
<211> 17
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 43

Trp Ile Phe Pro Arg Asp Asn Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 44
<211> 16
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 44

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

<210> 45
<211> 16
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 45

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

<210> 46
<211> 16
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 46
Val Met Trp Ala Gly Gly Gly Thr Asn Ser Asn Ser Val Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 47
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia consenso de CDR2 de cadena pesada anti B7-H1 humano

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> I, L, M, F o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> P o ausente

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> A, R, N, Q, E, H, K, M, S, T, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> A, R, N, D, C, Q, E, G, H, K, M, F, P, S, T, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> N, G o S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> N, G o S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> A, R, N, Q, E, H, K, M, S, T o Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> A, R, N, C, Q, E, H, I, L, K, M, F, S, T, W, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> A, D, Q, E, K, P, S o T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> I, L, M o F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> A, G o S

<400> 47

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Xaa Lys
1 5 10 15

Xaa

<210> 48

<400> 48

000

<210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 49

Glu Asn Trp Val Gly Asp Phe
1 5

<210> 50
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 50

Tyr Gly Gly Trp Leu Ser Pro Phe
1 5

<210> 51
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 51

Arg Gly Gly Trp Leu Leu Pro Phe
1 5

<210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 52
Tyr Tyr Gly Asn Ser Pro Tyr Tyr Ala Ile
1 5 10

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia consenso de CDR3 de cadena pesada anti B7-H1 humano

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> A, R, N, Q, E, H, K, M, S, T o Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> A, R, N, D, C, Q, E, G, H, K, M, F, P, S, T, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Q, G, H, T o W

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(7)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> F o Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Al o ausente

<400> 53

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 54

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
1 5 10

<210> 55
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 55

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Met Ala
1 5 10

<210> 56
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 56

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Thr Asn Val Ala
1 5 10

<210> 57
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia consenso de CDR1 de cadena ligera anti PD-1 humano

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> N, Q, E, K o S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> N, D, Q, E, K o S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> N, D, Q, E o S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> A, C, I, L, M, F, S, T, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, K, M, F, P, S, T, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> N, S o T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> A, R, N, D, Q, E, G, H, K, M, P, S, T o Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10) .. (10)
<223> I, L, M o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> A, R, N, C, Q, E, H, I, L, K, M, F, S, T, Y o V

<400> 57
Xaa Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 58
Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 59

Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Ser
1 5

<210> 60
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 60

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia consenso de CDR2 de cadena ligera anti PD-1 humano

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> A, R, C, Q, I, L, K, M, F, S, T, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> A, S, T o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> A, R, N, Q, E, H, K, M, S, T o Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> A, R, N, Q, L, K, M, S, T o Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> A, R, C, Q, I, L, K, M, F, S, T, Y o V

<400> 61

Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Ser
1 5

<210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 62

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
1 5

<210> 63
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 63

Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Trp Thr
1 5

<210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 64

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia consenso de CDR3 de cadena ligera anti PD-1 humano

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> A, R, N, Q, L, K, M, S, T, W, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> W o Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> N, D, Q, E o S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> N, S o T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> A, R, N, C, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> F, W o Y

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 65

Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr
1 5

<210> 66
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 66

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly Met His
1 5 10

<210> 67
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 67

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Asn
1 5 10

<210> 68
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 68

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Met His
1 5 10

<210> 69
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia consenso de CDR1 de cadena pesada anti PD-1 humano

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> F o T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> S o T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> N o D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> A, R, C, Q, E, G, H, K, M, F, S, T, W, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> N o H

<400> 69

Gly Xaa Thr Phe Xaa Xaa Tyr Xaa Met Xaa
1 5 10

<210> 70
<211> 17
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 70

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

Gly

<210> 71
<211> 17
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 71

Asn Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 72
<211> 17
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 72

His Ile Asn Pro Ser Ser Gly Phe Thr Thr Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 73
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia consenso de CDR2 de cadena pesada anti PD-1 humano

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> A, R, N, Q, E, H, K, M, S, T o Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> N o S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> A, D, Q, E, K, P, S o T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> A, R, N, D, C, Q, E, G, H, K, M, F, P, S, T, W, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> N o S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> A, R, N, D, C, Q, E, G, H, K, M, F, P, S, T, W, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> A, R, N, D, C, Q, E, G, H, K, M, F, S, T, W, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> A, C, I, L, M, T o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> A, R, N, C, Q, E, H, I, L, K, M, F, S, T, W, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> N, S o T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> N, D, Q, E o S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> R, N, D, Q, E, K, S o T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> I, L, M, W, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> N, D, G o S

<400> 73

Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Lys
1 5 10 15

Xaa

<210> 74
<211> 13
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 74

Arg Gly Tyr Gly Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 75
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 75

Gly Arg Ile Tyr Asp Gly Ser Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 76
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 76

Glu Asp Tyr Asp Val Asp Tyr
1 5

<210> 77
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia consenso de CDR3 de cadena pesada anti PD-1 humano

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> A, R, N, D, Q, E, G, H, K, P, S o T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> A, R, N, D, Q, E, G, H, K, P, S o T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> I, L, M, F, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> A, R, N, D, C, Q, E, G, H, K, M, F, P, S, T, W, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, K, M, F, P, S, T, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> A, R, N, D, C, Q, E, G, H, K, M, F, S, T, W, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> A, R, N, C, Q, E, H, I, L, K, M, F, S, T, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> A, R, N, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> YYF o ausente

<400> 77

```
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Tyr
1               5                   10
```

<210> 78
<211> 95
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 78

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro
85 90 95

<210> 79
<211> 95
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 79

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

<210> 80
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 80

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 81
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> LC1_1 de cadena ligera humanizado anti B7-H1 humano

<400> 81

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
            20                  25                  30

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

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

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65                  70                  75                  80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asn Asn Pro Leu Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 82
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> LC1_2 de cadena ligera humanizado anti B7-H1 humano

<400> 82

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asn Asn Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 83
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> LC1_3 de cadena ligera humanizado anti B7-H1 humano

<400> 83

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30

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

Ala Thr Phe Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asn Asn Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 84
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> LC2_1 de cadena ligera humanizado anti B7-H1 humano

<400> 84

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

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

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

Ala Ala Phe Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 85
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> LC2_2 de cadena ligera humanizado anti B7-H1 humano

<400> 85

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

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

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

Ala Ala Phe Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 86
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> LC2_3 de cadena ligera humanizado anti B7-H1 humano

<400> 86

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

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

Ala Thr Phe Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 87
<211> 98
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 87

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

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

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

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

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

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

Ala Arg
```

<210> 88
<211> 100
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 88

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Trp Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Phe Ile Arg Ser Lys Ala Tyr Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Arg
100

<210> 89
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 89

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

<210> 90
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HC1_1 de cadena pesada humanizado anti B7-H1 humano

<400> 90

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Leu Thr Asp Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 91
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HC1_2 de cadena pesada humanizado anti B7-H1 humano

<400> 91

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

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

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

Gly Asp Ile Asp Pro Asn Tyr Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Leu Thr Asp Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 92
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HC1_3 de cadena pesada humanizado anti B7-H1 humano

<400> 92

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

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

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

Gly Asp Ile Asp Pro Asn Tyr Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Leu Thr Asp Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 93
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HC2_1 de cadena pesada humanizado anti B7-H1 humano

<400> 93

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

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

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

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

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

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

Thr Arg Gly Ala Leu Thr Asp Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 94
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HC2_2 de cadena pesada humanizado anti B7-H1 humano

<400> 94

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Leu Thr Asp Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 95
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HC2_3 de cadena pesada humanizado anti B7-H1 humano

<400> 95

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1               5                   10                  15

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Leu Thr Asp Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val
            100                 105                 110

Ser Ser
```

<210> 96
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 96

```
Cys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1               5                   10
```

<210> 97
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> LC1_1 de cadena ligera humanizado anti PD-1 humano

<400> 97

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Leu Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 98
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> LC1_2 de cadena ligera humanizado anti PD-1 humano

<400> 98

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Leu Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 99
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> LC2_1 de cadena ligera humanizado anti PD-1 humano

<400> 99

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Leu Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 100
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> LC2_2 de cadena ligera humanizado anti PD-1 humano

<400> 100

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 101
<211> 98
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 101

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 102
<211> 98
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 102

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg

<210> 103
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 103

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
1 5

<210> 104
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HC1_1 de cadena pesada humanizado anti PD-1 humano

<400> 104

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Gly Tyr Gly Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 105
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HC1_2 de cadena pesada humanizado anti PD-1 humano

<400> 105

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Gly Tyr Gly Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 106
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HC1_3 de cadena pesada humanizado anti PD-1 humano

<400> 106

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Thr Ile Tyr Ser Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Gly Tyr Gly Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 107
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HC2_1 de cadena pesada humanizado anti PD-1 humano

<400> 107

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

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

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

Gly Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Gly Tyr Gly Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 108
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HC2_2 de cadena pesada humanizado anti PD-1 humano

<400> 108

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

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

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

Gly Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Thr Ile Tyr Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Gly Tyr Gly Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 109
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HC2_3 de cadena pesada humanizado anti PD-1 humano

<400> 109

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Gly Tyr Gly Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a PD-1 humano, que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:98 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:106.

2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo

(A) atenúa la capacidad de un ligando de PD-1 para unirse con PD-1;
(B) atenúa o neutraliza completamente la capacidad de PD-1 para mediar en la transducción de señal;
(C) media en la proliferación de linfocitos T; o
(D) potencia la producción de IFN-γ.

3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc).

4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 3, en el que la región constante de inmunoglobulina (Fc) es una región constante de inmunoglobulina humana (Fc).

5. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 4, en el que los dominios constantes humanos son dominios IgA, IgD, IgE, IgG o IgM.

6. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en el que los dominios constantes de IgG humano son dominios IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

7. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se marca de forma detectable o comprende una toxina conjugada, fármaco, receptor, enzima, ligando de receptor.

8. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo monocatenario.

9. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico, triespecífico o multiespecífico.

10. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable.

11. Una composición farmacéutica según la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.

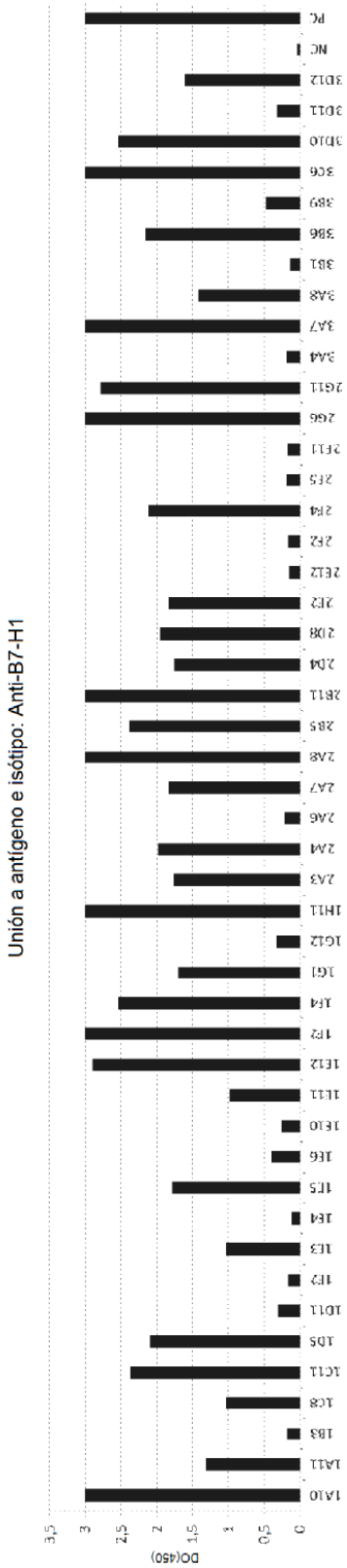


Figura 1

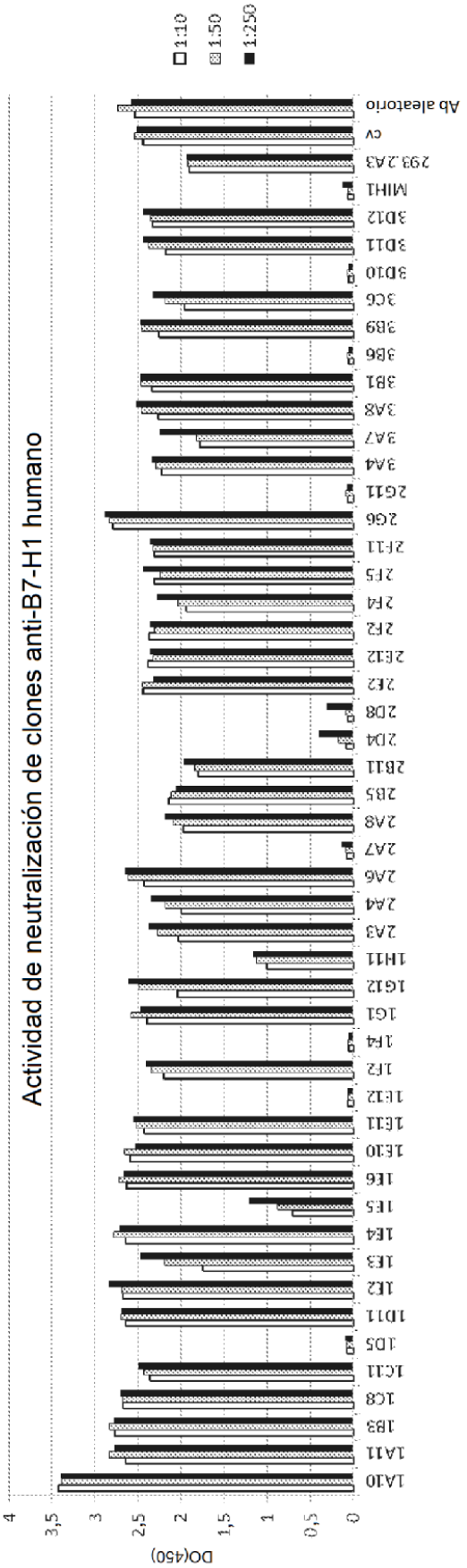


Figura 2

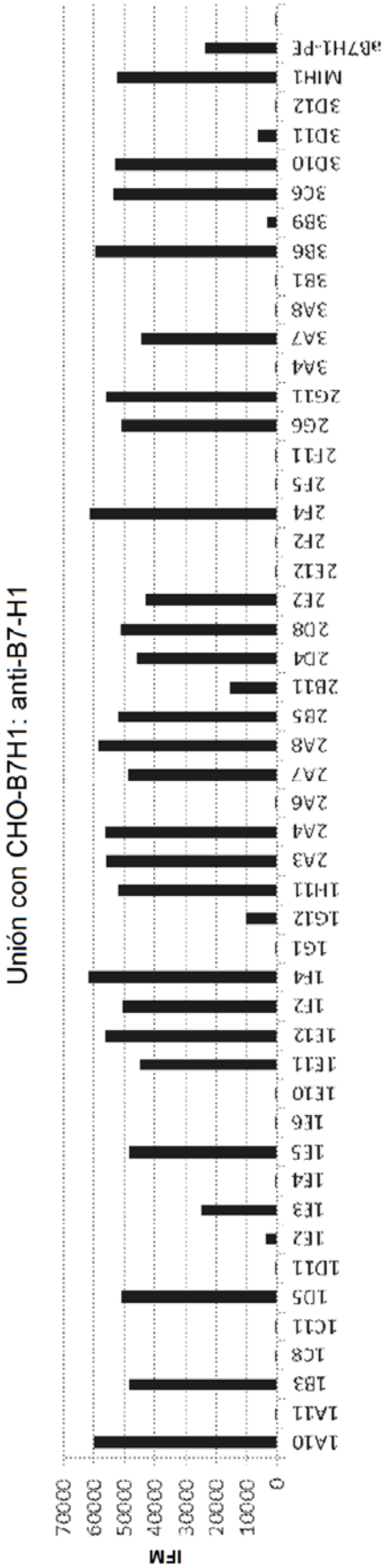

Unión con CHO-B7H1: anti-B7-H1
IFM
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
1A10
1A11
1B3
1C8
1C11
1D5
1D11
1E2
1E3
1E4
1E5
1E6
1E10
1E11
1E12
1F2
1F4
1G1
1G12
1H11
2A3
2A4
2A6
2A7
2A8
2B5
2B11
2D4
2D8
2E2
2E12
2F2
2F4
2F5
2F11
2G6
2G11
3A4
3A7
3A8
3B1
3B6
3B9
3C6
3D10
3D11
3D12
MIH1
aB7H1-PE

Figura 3

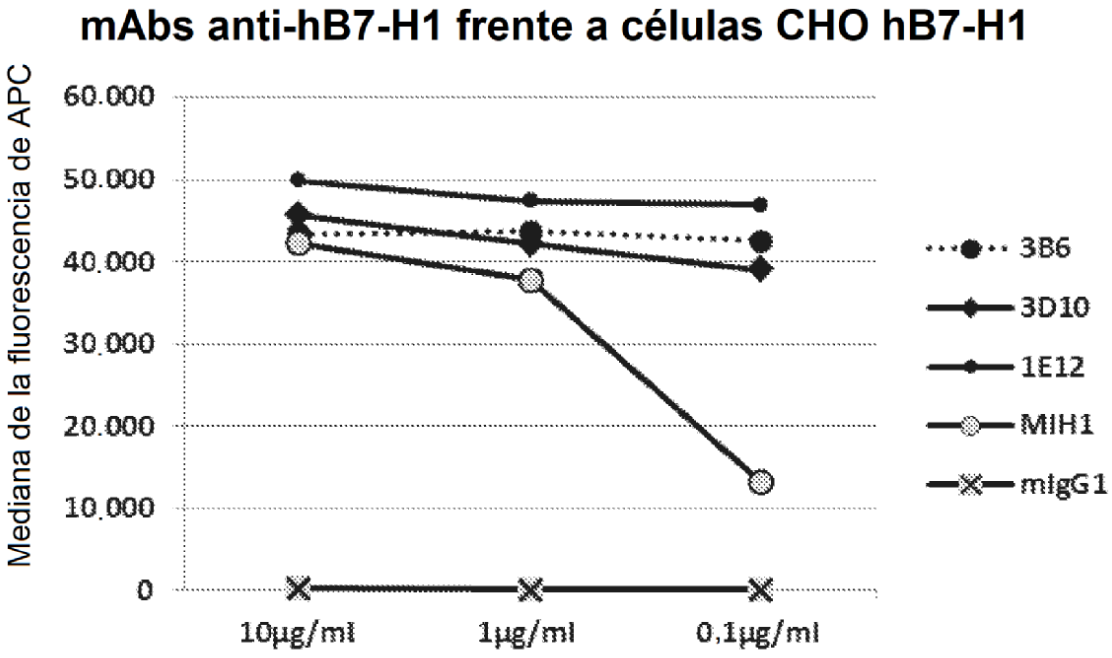


Figura 4

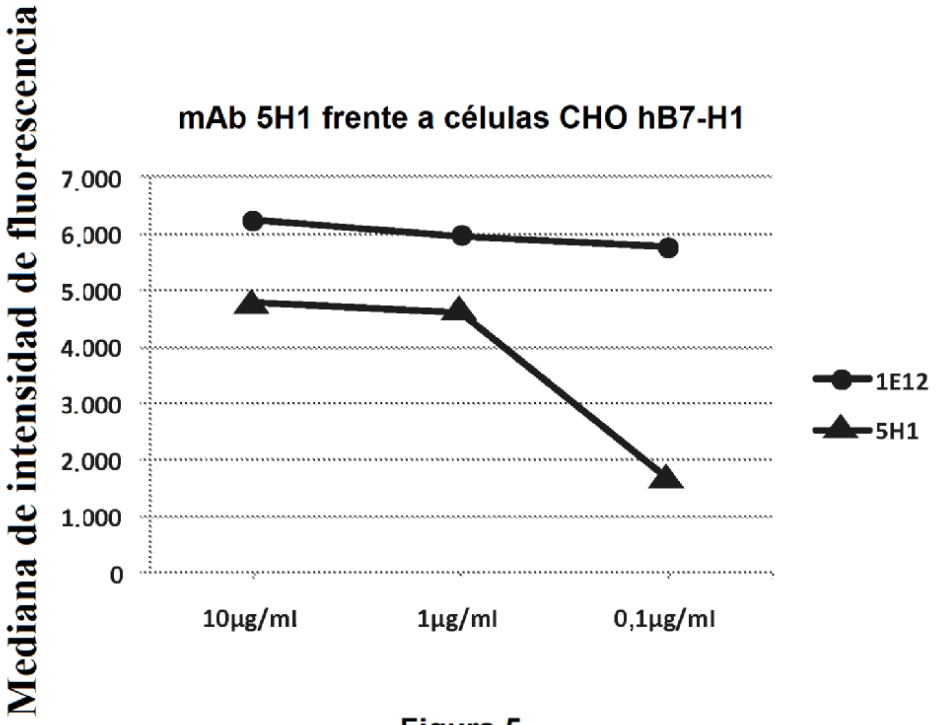


Figura 5

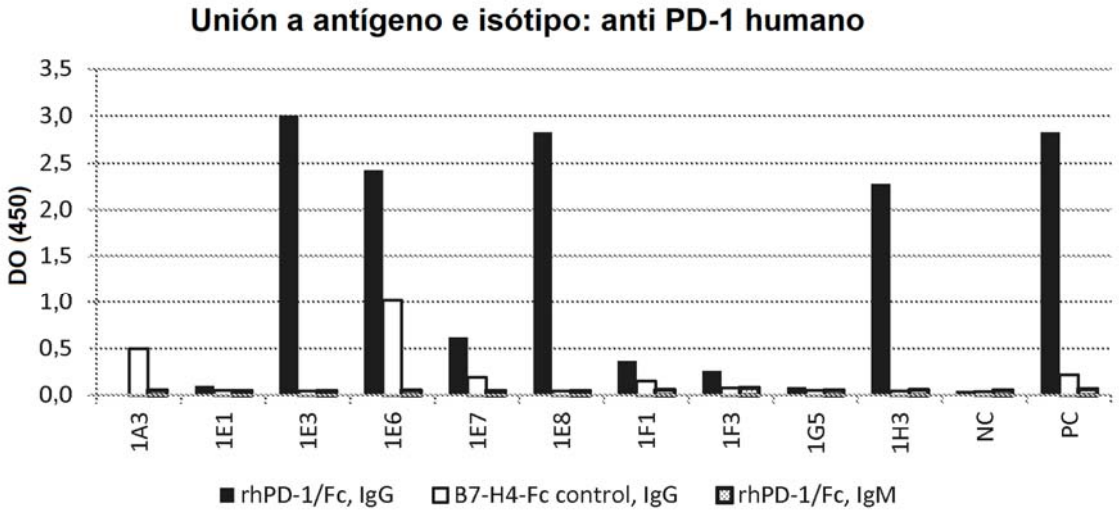

Unión a antígeno e isótipo: anti PD-1 humano
DO (450)
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
1A3
1E1
1E3
1E6
1E7
1E8
1F1
1F3
1G5
1H3
NC
PC
rhPD-1/Fc, IgG
B7-H4-Fc control, IgG
rhPD-1/Fc, IgM

Figura 6

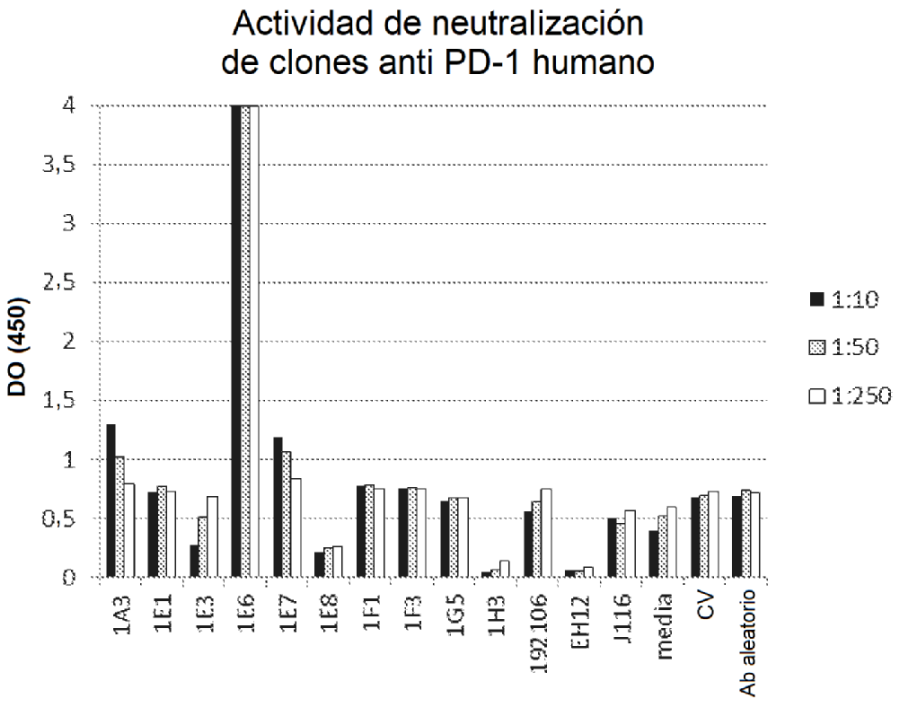


Figura 7A

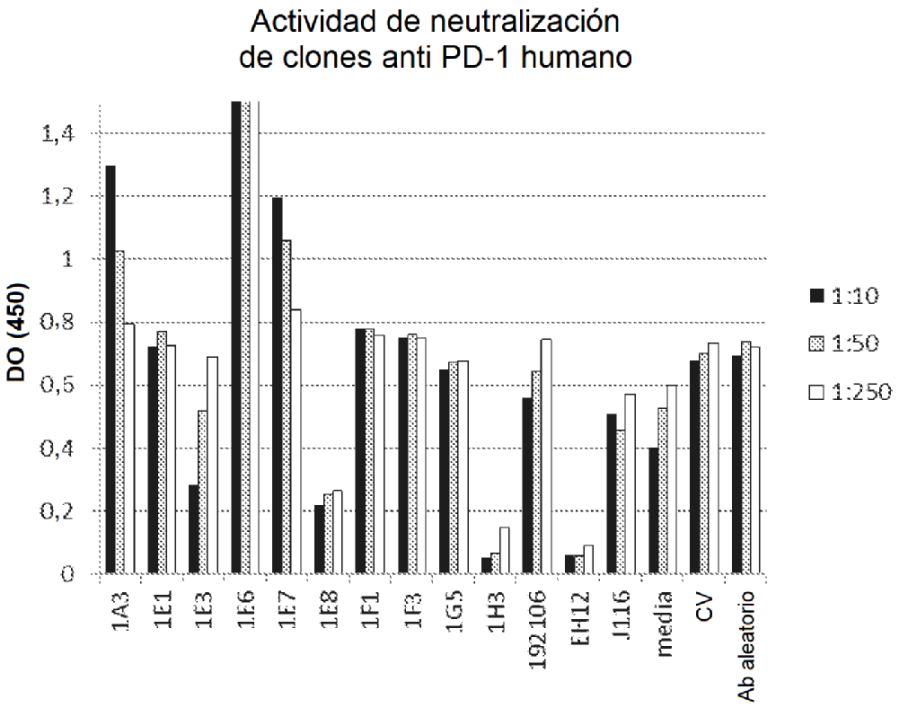


Figura 7B

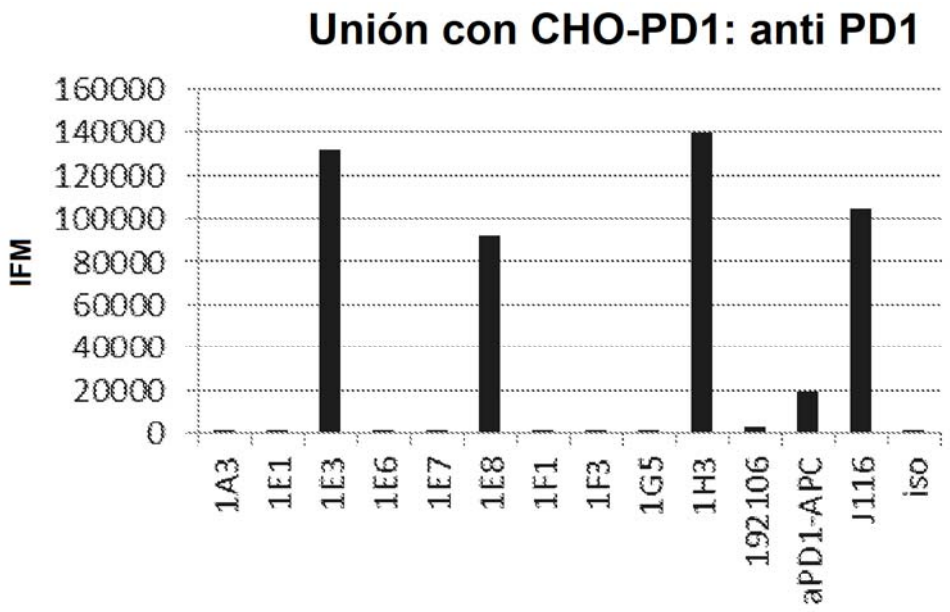

Unión con CHO-PD1: anti PD1
IFM
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
1A3
1E1
1E3
1E6
1E7
1E8
1F1
1F3
1G5
1H3
192.106
aPD1-APC
J116
iso

Figura 8

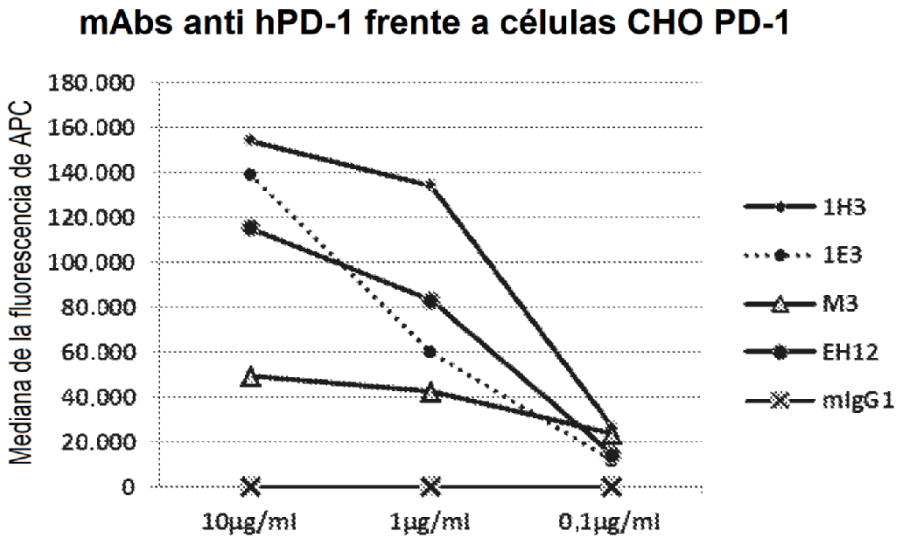


Figura 9

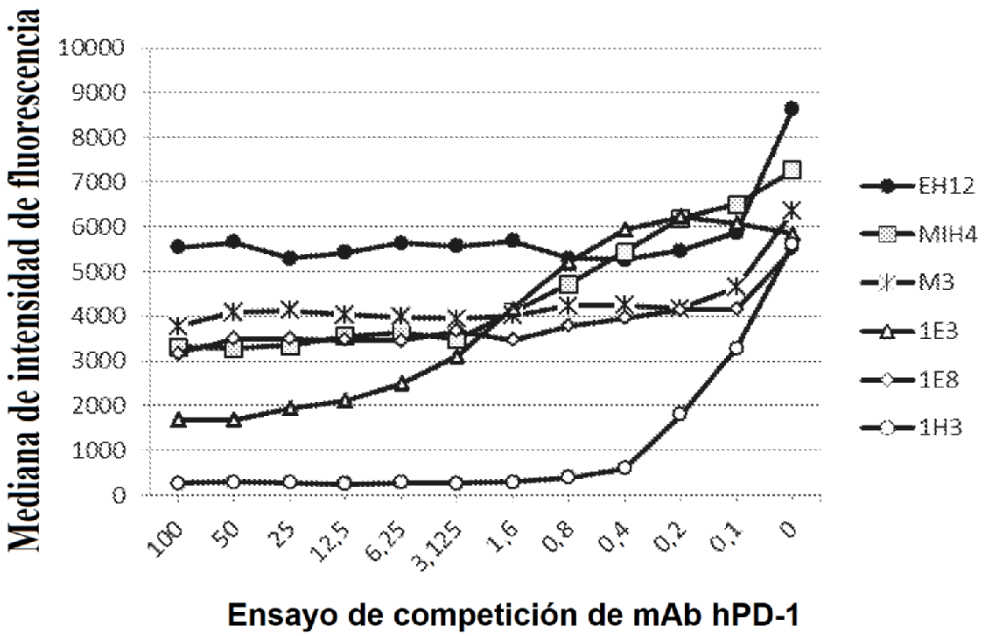


Figura 10

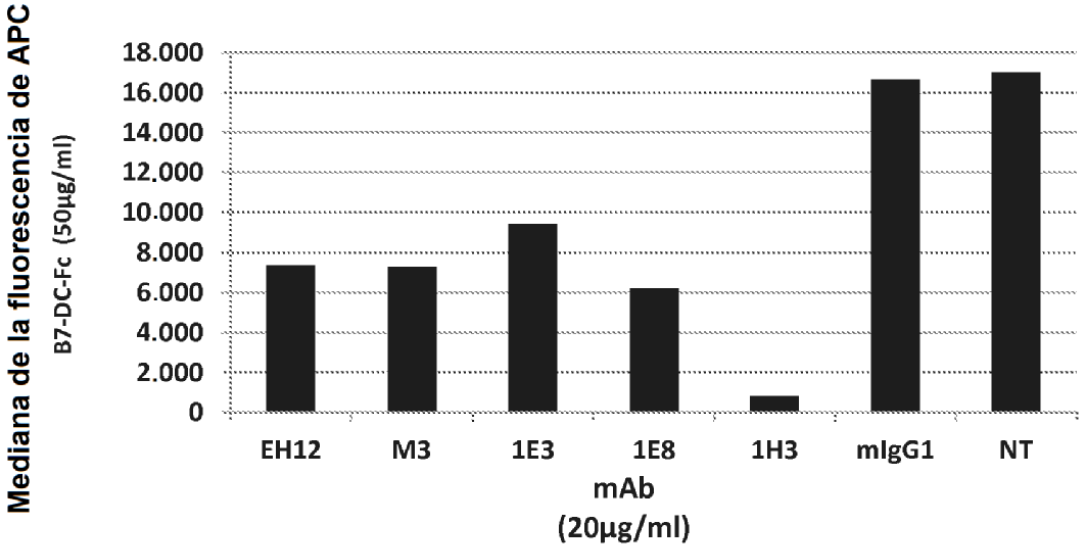


Figura 11

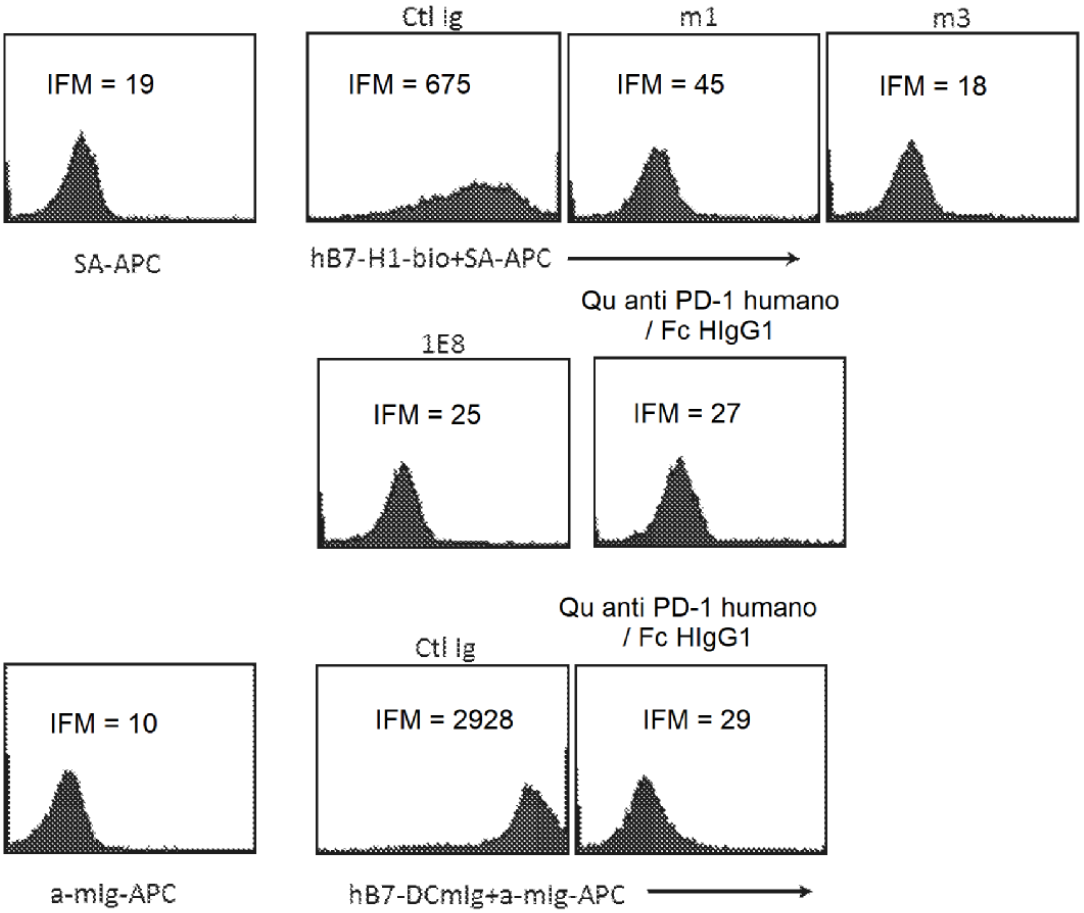
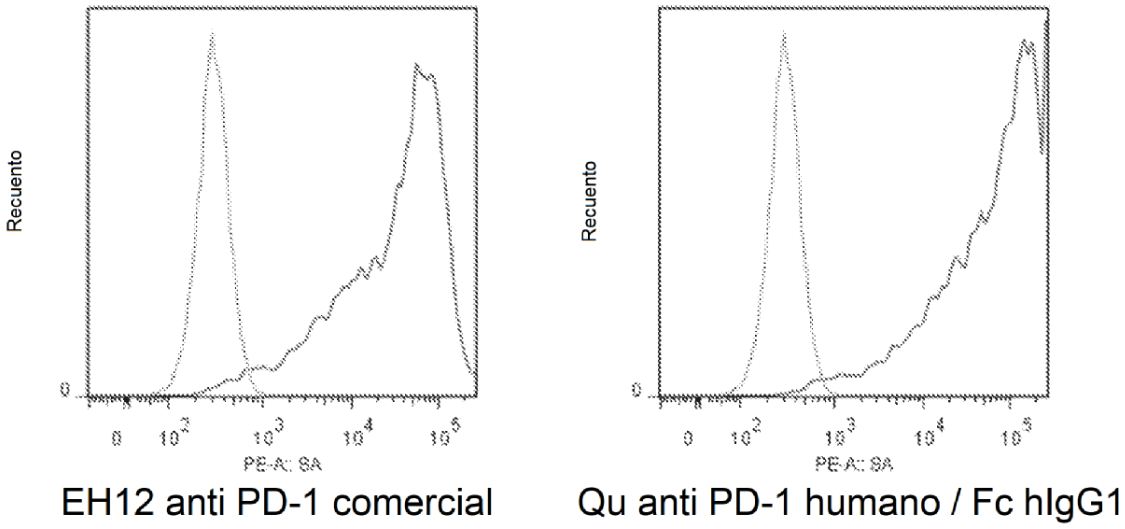
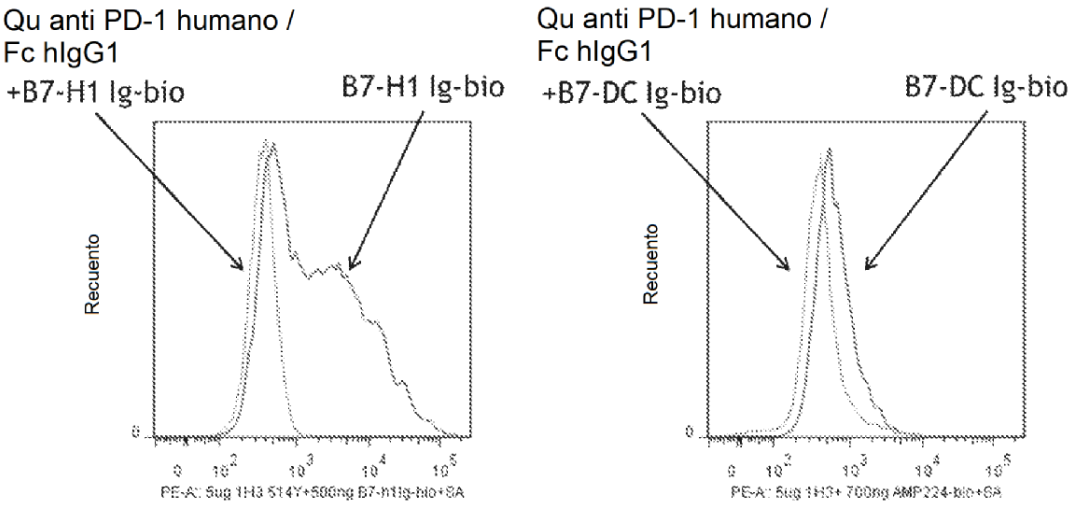


Figura 12



A B

Figura 13



A B

Figura 14

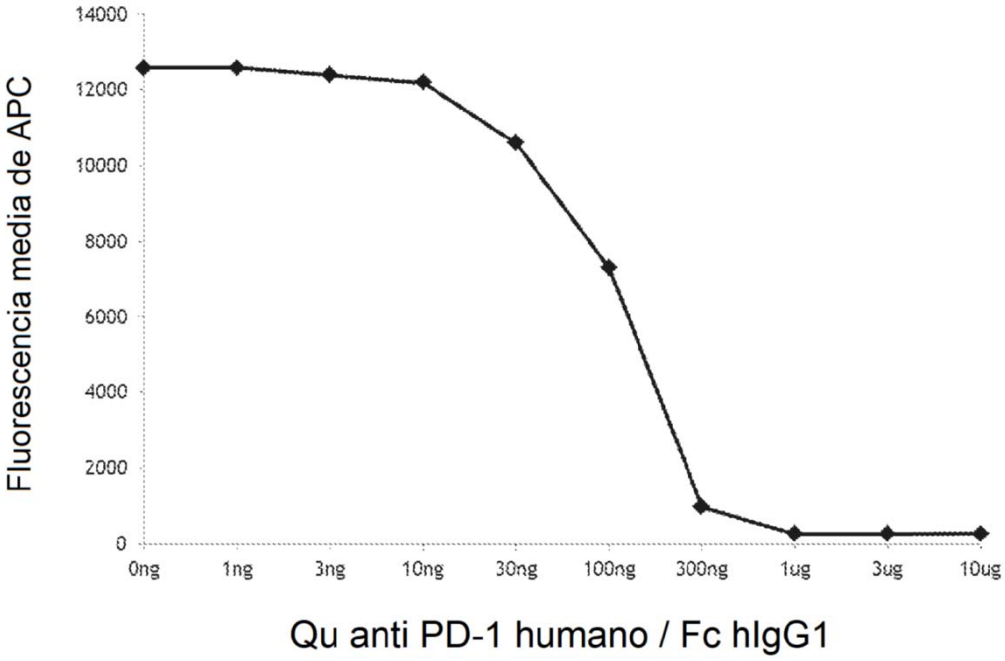

Fluorescencia media de APC
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0ng
1ng
3ng
10ng
30ng
100ng
300ng
1ug
3ug
10ug
Qu anti PD-1 humano / Fc hIgG1

Figura 15

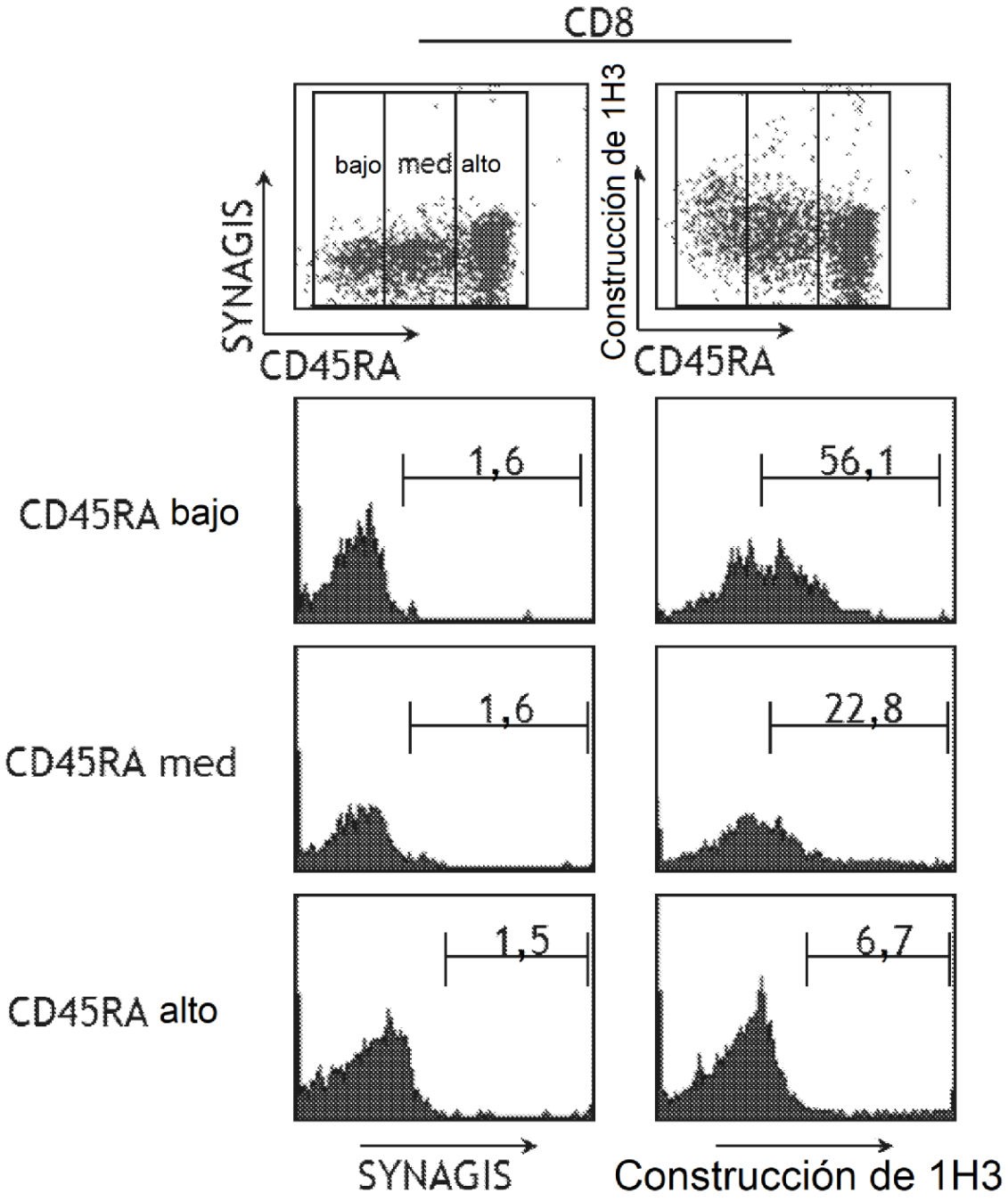

CD8
bajo
med
alto
SYNAGIS
CD45RA
Construcción de 1H3
CD45RA
CD45RA bajo
1,6
56,1
CD45RA med
1,6
22,8
CD45RA alto
1,5
6,7
SYNAGIS
Construcción de 1H3

Figura 16A

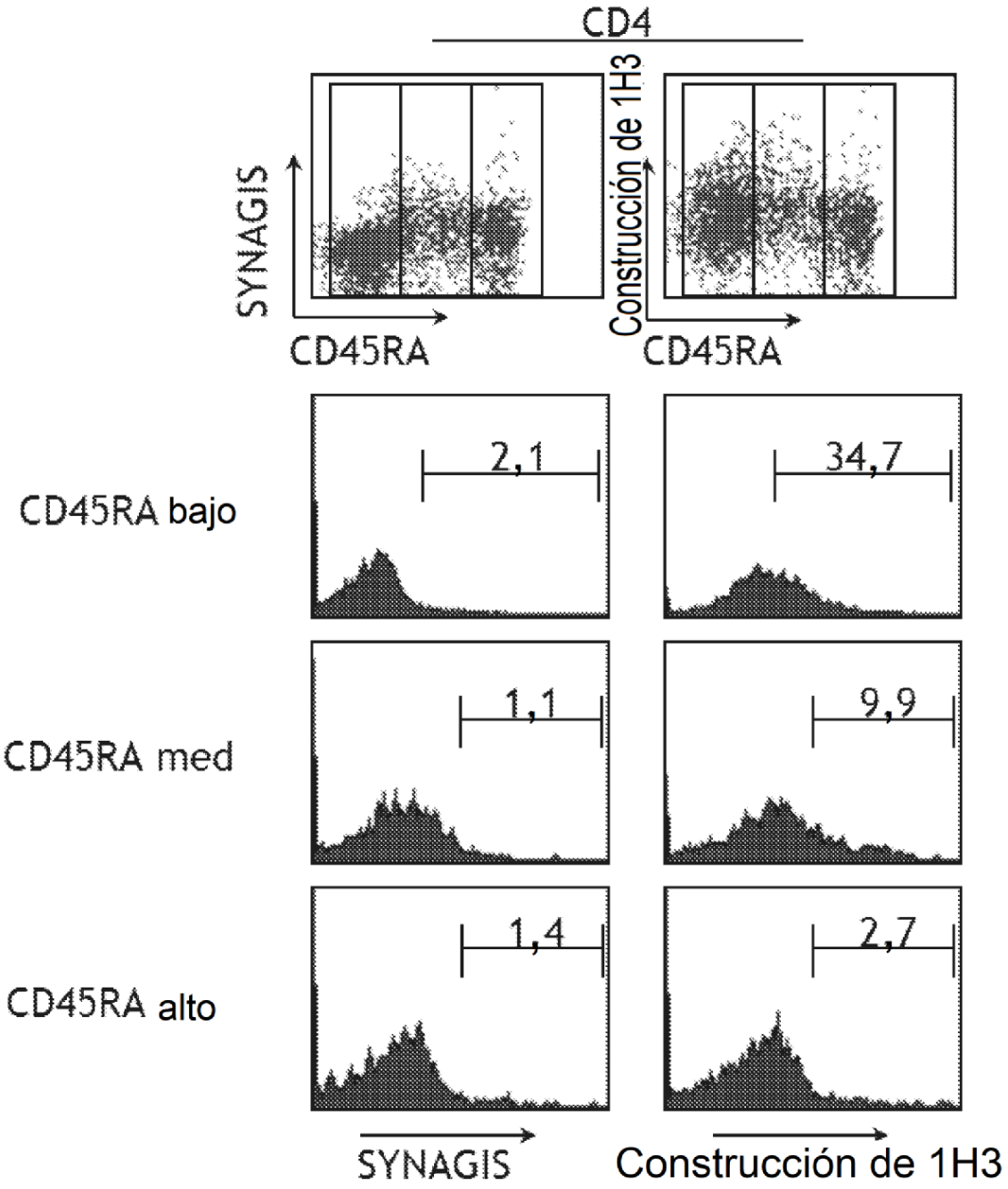

CD4
SYNAGIS
CD45RA
Construcción de 1H3
CD45RA
CD45RA bajo
2,1
34,7
CD45RA med
1,1
9,9
CD45RA alto
1,4
2,7
SYNAGIS
Construcción de 1H3

Figura 16B

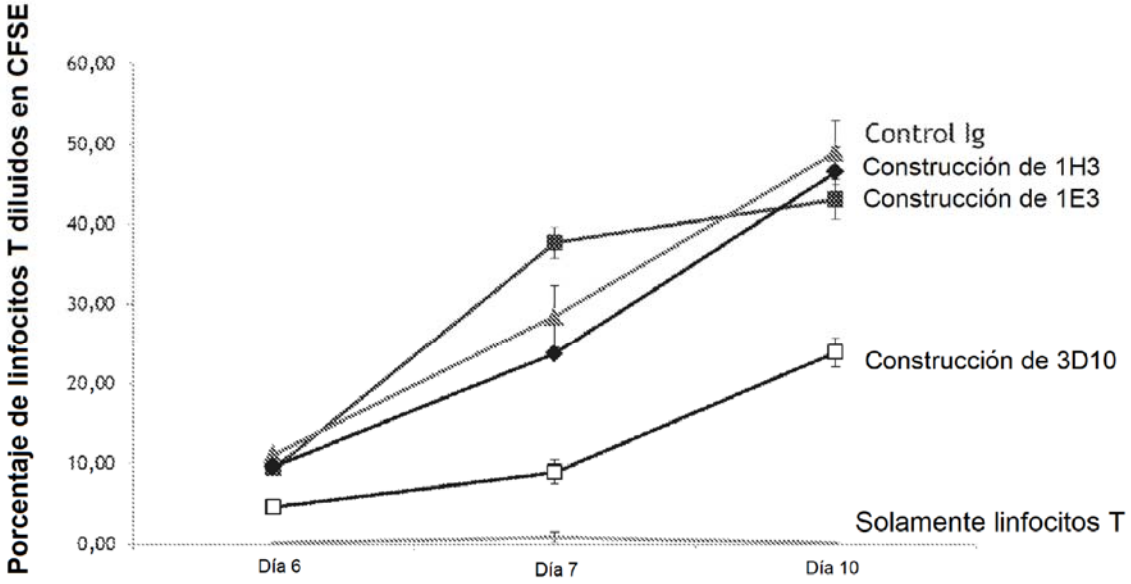

Porcentaje de linfocitos T diluidos en CFSE
60,00
50,00
40,00
30,00
20,00
10,00
0,00
Día 6
Día 7
Día 10
Control Ig
Construcción de 1H3
Construcción de 1E3
Construcción de 3D10
Solamente linfocitos T

Figura 17

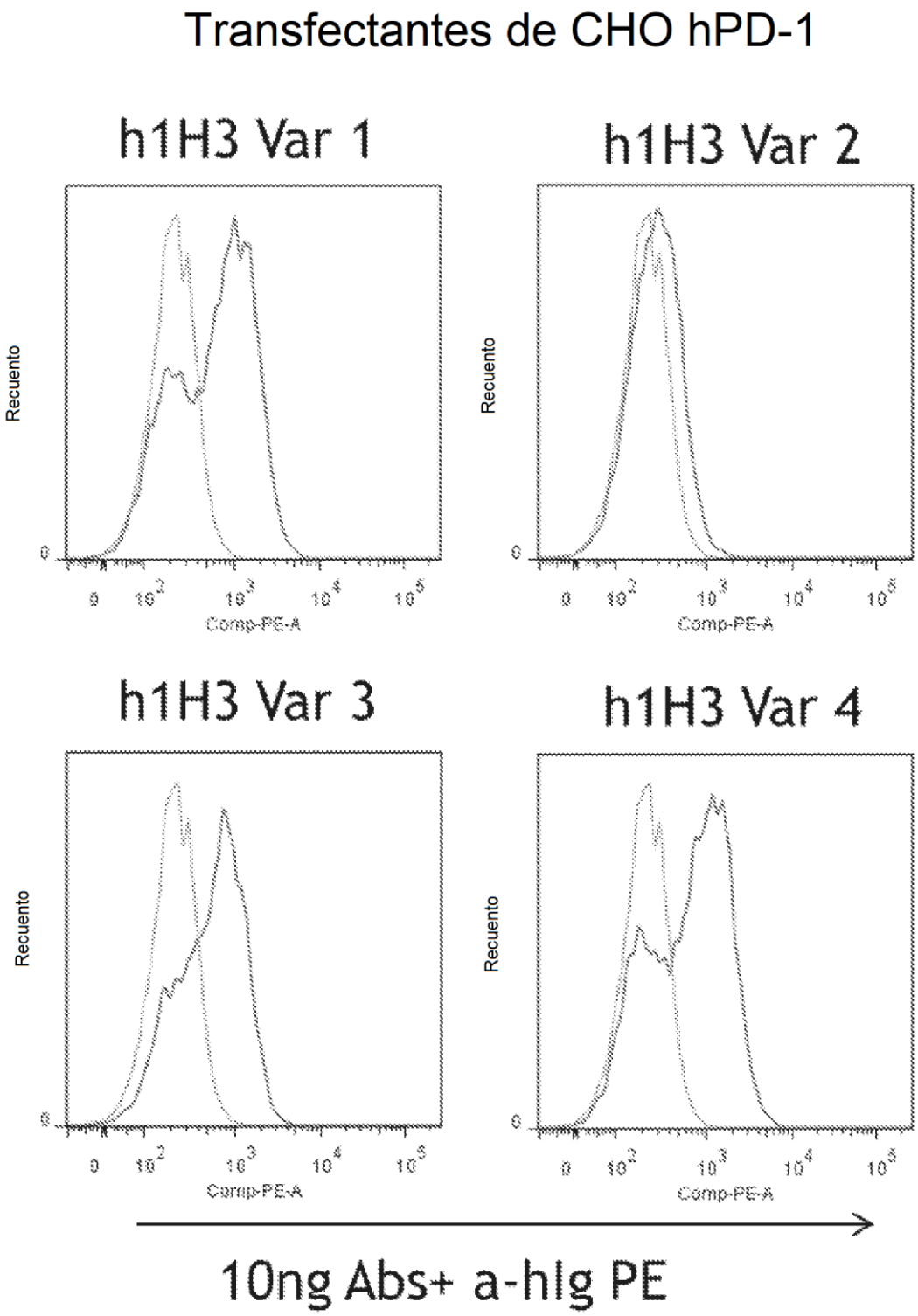

Transfectantes de CHO hPD-1
h1H3 Var 1
h1H3 Var 2
h1H3 Var 3
h1H3 Var 4
Recuento
Comp-PE-A
0
10ng Abs+ a-hIg PE

Figura 18A

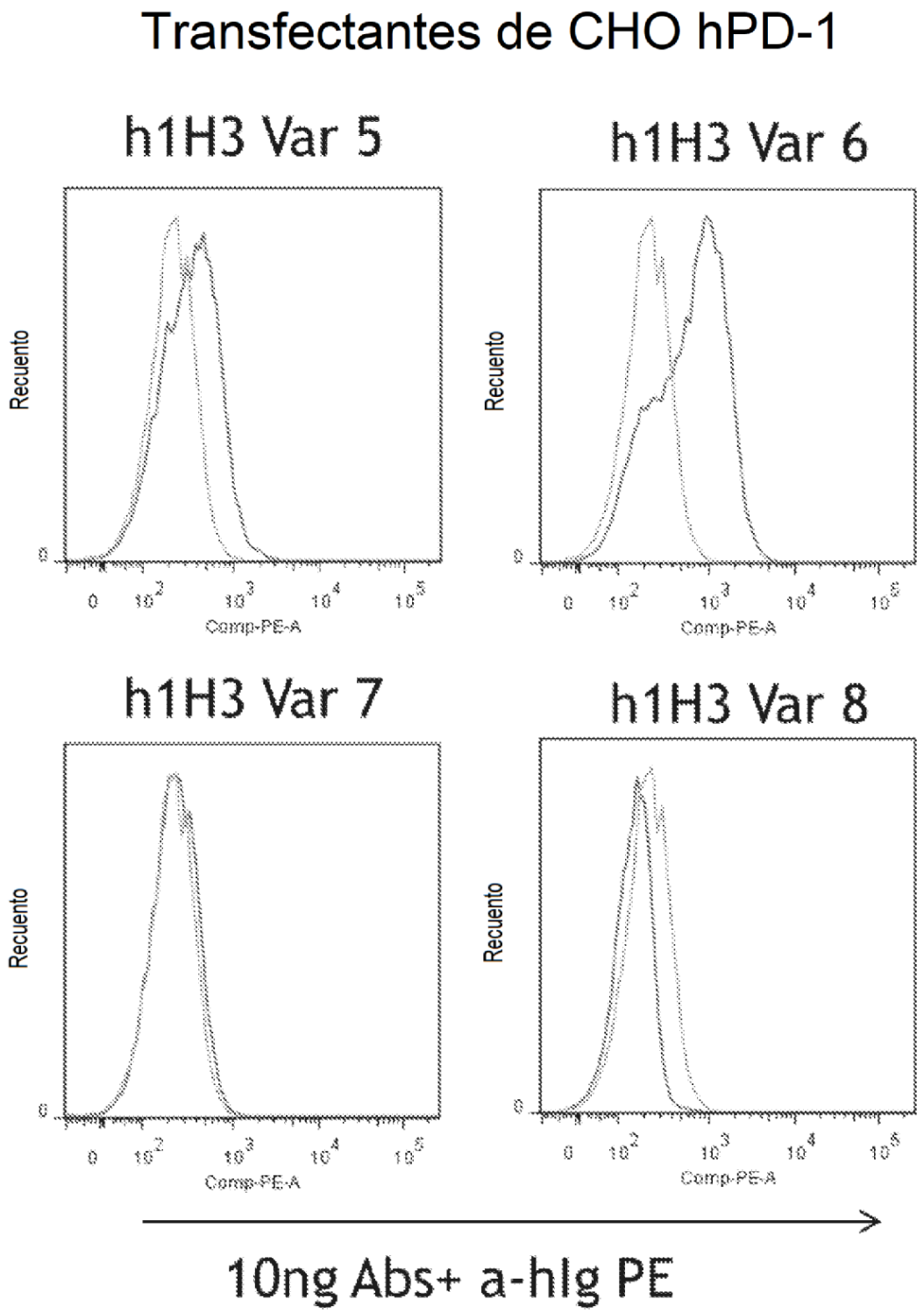

Transfectantes de CHO hPD-1
h1H3 Var 5
h1H3 Var 6
h1H3 Var 7
h1H3 Var 8
Recuento
Comp-PE-A
0
10ng Abs+ a-hIg PE

Figura 18B

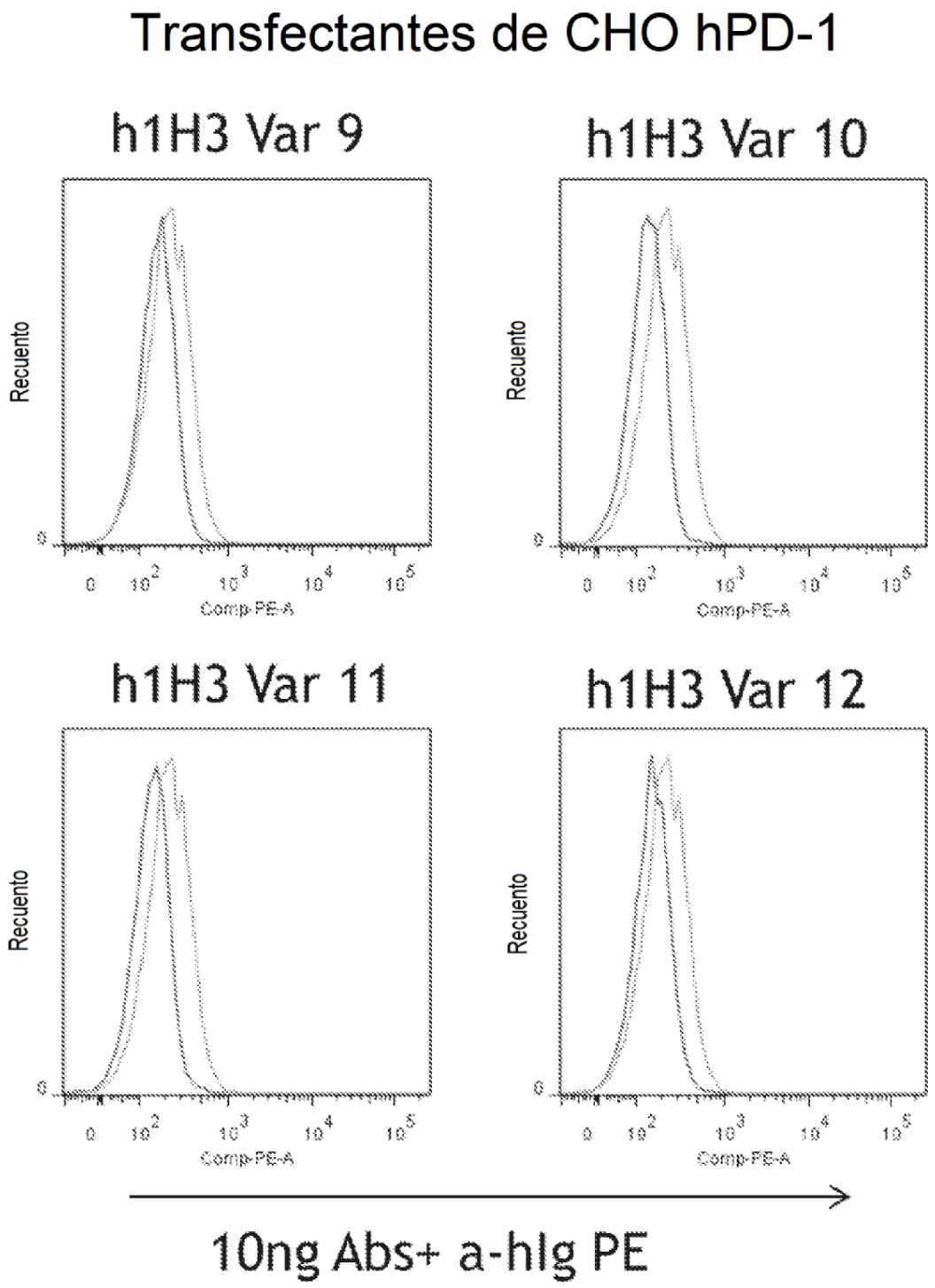

Transfectantes de CHO hPD-1
h1H3 Var 9
h1H3 Var 10
h1H3 Var 11
h1H3 Var 12
Recuento
0
0
10^2
10^3
10^4
10^5
Comp-PE-A
10ng Abs+ a-hIg PE

Figura 18C

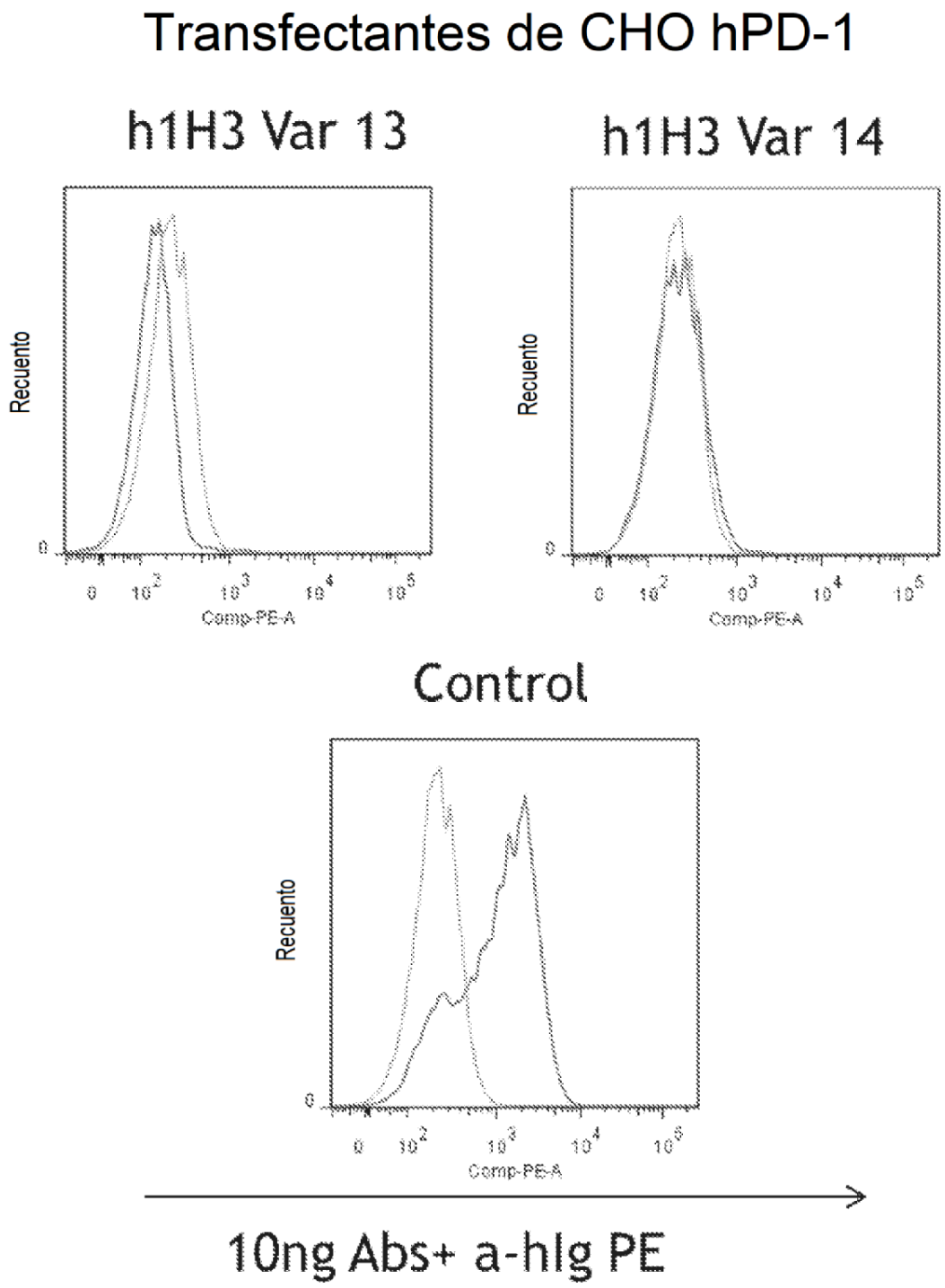

Transfectantes de CHO hPD-1
h1H3 Var 13
h1H3 Var 14
Recuento
Recuento
0
0
0
10^2
10^3
10^4
10^5
Comp-PE-A
Control
Recuento
0
Comp-PE-A
10ng Abs+ a-hIg PE

Figura 18D

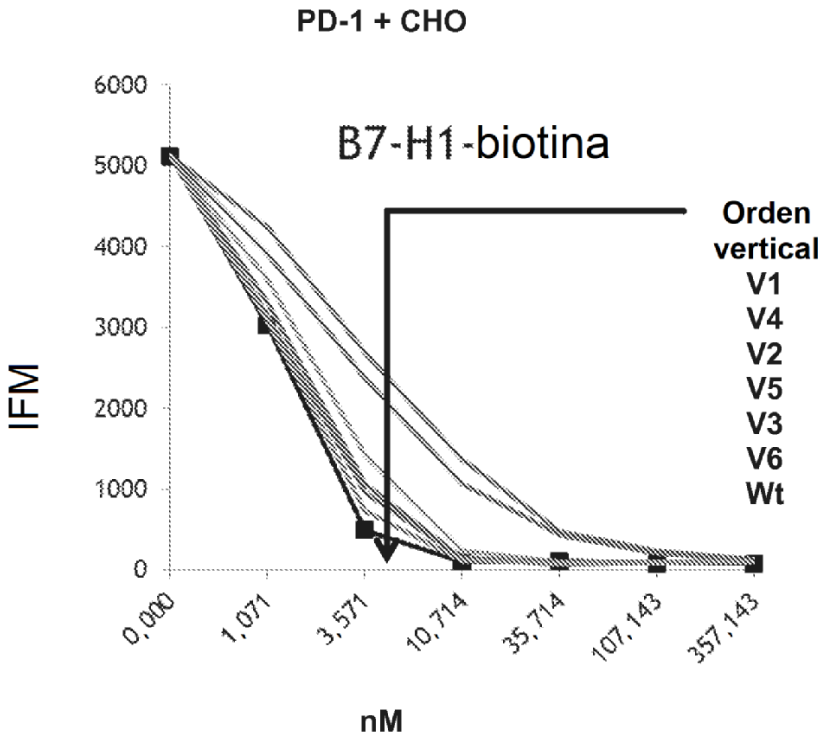


Figura 19A

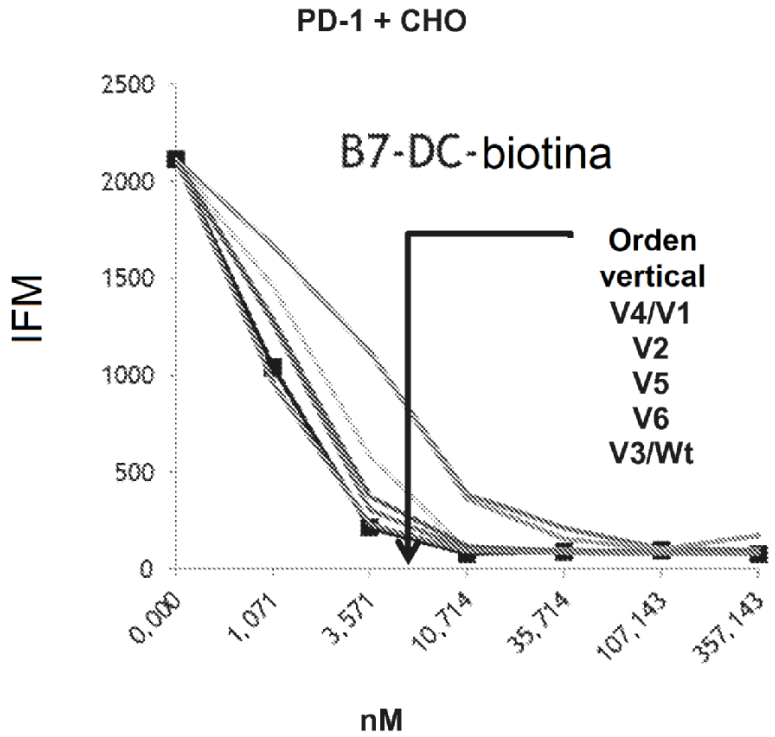


Figura 19B

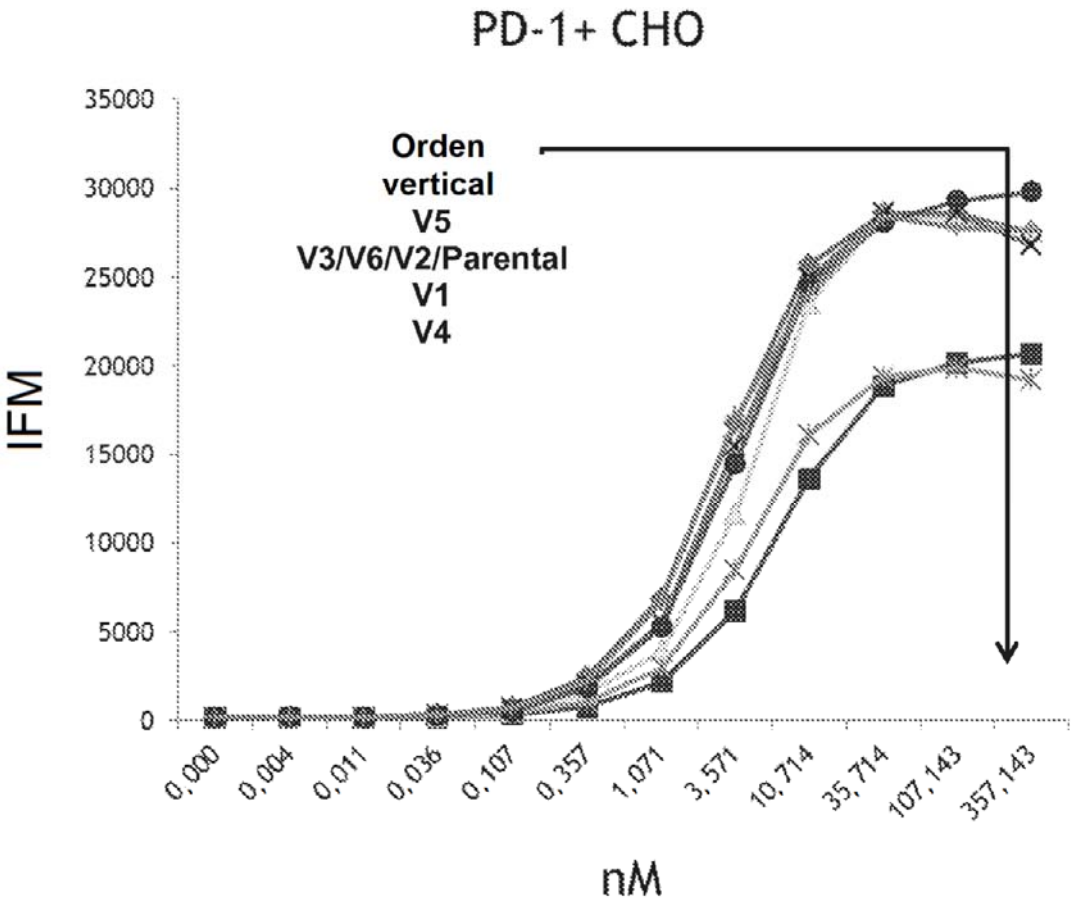

PD-1+ CHO
Orden
vertical
V5
V3/V6/V2/Parental
V1
V4
IFM
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0,000
0,004
0,011
0,036
0,107
0,357
1,071
3,571
10,714
35,714
107,143
357,143
nM

Figura 20