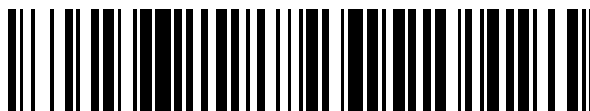


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 450**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 16/28</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/30</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/395</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/22</b>	(2006.01)
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 45/06</b>	(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2015 PCT/US2015/012595**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2015 WO15112805**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2015 E 15703380 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 3097120**

54 Título: **Anticuerpos humanos contra PD-L1**

30 Prioridad:

**23.01.2014 US 201461930582 P**  
**09.12.2014 US 201462089549 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.05.2019**

73 Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.**  
**(100.0%)**  
**777 Old Saw Mill River Road**  
**Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**PAPADOPOULOS, NICHOLAS J.;**  
**MURPHY, ANDREW J.;**  
**THURSTON, GAVIN;**  
**IOFFE, ELLA y**  
**BUROVA, ELENA**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 711 450 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 humanos contra PD-L1

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos humanos y fragmentos de unión al antígeno de los anticuerpos humanos que específicamente se unen al ligando de receptor inmunomodulador ligando de muerte programada 1 (PD-L1), y métodos terapéuticos del uso de estos anticuerpos.

10

**Descripción de la técnica relacionada**

El ligando de muerte programada 1 (PD-L1) (también llamado B7-H1 o CD274) es un ligando del receptor de la proteína de 290 aminoácidos expresado ampliamente tanto en tejidos linfoides como no linfoides, tales como linfocitos T CD4 y CD8, células del linaje de los macrófagos, tejidos periféricos, así como en células tumorales y células infectadas por virus (Dong et al., 1999, Nature Med.). El PD-L1 se une a receptores PD-1 y B7-1 que pertenecen a la familia CD28/CTLA-4 (antígeno de linfocitos T citotóxicos)/ICOS (co-estimulador inducible) de los receptores co-inhibidores de linfocitos T (Chen et al., 2013., Nature Rev. Immunol 13: 227-242) y atenúa la respuesta inmunitaria mediante la inhibición de la activación de linfocitos T. La unión de PD-L1 a PD-1 o B7-1 tiene como resultado una disminución de la proliferación de linfocitos T y la secreción de citocinas, comprometiendo respuestas inmunitarias humorales y celulares en enfermedades como el cáncer y la infección viral.

15

20

25

30

La expresión de PD-L1 en células tumorales y células infectadas por virus es explotada por tumores e infecciones virales crónicas para evadir la respuesta inmunitaria. PD-L1 se expresa en una amplia variedad de tumores y estudios en modelos animales han demostrado que PD-L1 en tumores inhibe la activación de linfocitos T y la lisis de células tumorales y puede conducir a aumento de la muerte de los linfocitos T específicos del tumor. En las infecciones virales crónicas, PD-L1 se expresa en las células infectadas por virus uniéndose a PD-1 en los linfocitos T específicos del virus y estos linfocitos T quedan "agotados" con pérdida de las funciones efectoras y la capacidad proliferativa (Freeman 2008, PNAS 105: 10275 a 10276). El sistema PD-1:PD-L1 también juega un papel importante en el desarrollo de linfocitos T reguladores (Treg) inducidos y en el mantenimiento de la función Treg (Francisco et al., 2010, Immunol Rev. 236: 219- 242) .

35

Puesto que PD-L1 juega un papel importante en la inmunidad tumoral y en la inmunidad infecciosa, es un objetivo ideal para la inmunoterapia. El bloqueo de PD-L1 con antagonistas, incluyendo anticuerpos monoclonales, se ha estudiado en tratamientos del cáncer y de infecciones virales crónicas (Ribas 2012, NEJM 366: 2517-2519; Freeman 2008, PNAS 105: 10275-10276; Sheridan 2012, Nature Biotechnology 30: 729-730).

40

45

50

Los anticuerpos monoclonales contra PD-L1 son conocidos en la técnica y han sido descritos, por ejemplo, en la patente/publicación de los EE.UU. números 7943742, 8383796, 8217149, 20090055944, 20120003056, 20130034559, 20130045200, 20130045201, 20130045202, y en los documentos W02007005874, W02011066389, W02010077634, EP1907424 y EP1899379. En particular, el documento WO 2011/066389 divulga anticuerpos monoclonales humanos contra PD-L1 y usos de estos anticuerpos en diagnósticos y para el tratamiento de enfermedades asociadas con la actividad y/o expresión de PD-L1. El documento WO 2010/077634 divulga anticuerpos anti-PD-L1, los ácidos nucleicos que los codifican, las composiciones terapéuticas y su uso para mejorar la función de los linfocitos T para regular las respuestas inmunitarias mediadas por células y para el tratamiento de los trastornos funcionales de los linfocitos T, incluidas las infecciones y la inmunidad tumoral. El documento WO 2013/166500 divulga anticuerpos monoclonales humanizados madurados por afinidad, anticuerpos biespecíficos, conjugados de anticuerpos y proteínas de fusión que se unen al receptor de quimiocina CCR4. El documento WO 2007/005874 divulga anticuerpos monoclonales aislados, particularmente anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a PD-L1 con alta afinidad.

**Breve resumen de la invención**

55

60

La presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos como se define en las reivindicaciones que se unen a PD-L1. Los anticuerpos de la presente invención son útiles, entre otras., para dirigirse a las células que expresan PD-L1 como las células cancerosas o células infectadas por virus, y para modular la actividad de PD-L1. En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención son útiles para inhibir o neutralizar la actividad de PD-L1 y para estimular la activación de linfocitos T, por ejemplo, en circunstancias en las que la destrucción mediada por linfocitos T es beneficiosa o deseable. Los anticuerpos de la invención anti-PD-L1, o porciones de unión al antígeno del mismo, pueden ser incluidos como parte de una molécula multiespecífica de unión al antígeno, por ejemplo, para modular la respuesta inmunitaria y/o para dirigir los anticuerpos a un tipo de célula específico, tal como un linfocito tumoral, o una célula infectada por virus. Los anticuerpos son útiles en el tratamiento de una enfermedad o trastorno tal como el cáncer y la infección viral.

65

Los anticuerpos de la invención pueden ser de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo IgG1 o anticuerpo IgG4) o pueden comprender solamente una porción de unión al antígeno (por ejemplo, un fragmento Fab, F(ab')<sub>2</sub> o

scFv), y pueden ser modificados para alterar la funcionalidad, por ejemplo, para eliminar las funciones efectoras residuales (Reddy et al., 2000, J. Immunol 164: 1925-1933). En ciertas realizaciones, los anticuerpos pueden ser biespecíficos.

5 En un primer aspecto, la presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales aislados o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen específicamente a PD-L1. Los anticuerpos anti-PD-L1 ilustrativos de la presente invención se enumeran en las Tablas 1 y 2 de la presente memoria. La Tabla 1 presenta los identificadores de secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada (HCVR), las regiones variables de la cadena ligera (LCVR), las regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3), y las regiones determinantes de complementariedad de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) de los anticuerpos anti-PD-L1 ilustrativos. La Tabla 2 expone los identificadores de secuencia de ácido nucleico de las HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de los anticuerpos anti-PD-L1 ilustrativos.

15 La presente divulgación proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que comprenden una HCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCVR listadas en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma.

20 La presente divulgación también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que comprenden una LCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCVR listadas en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma.

25 La presente divulgación también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que comprenden un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR (HCVR/LCVR) que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCVR listadas en la Tabla 1 junto con cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCVR listadas en la Tabla 1. De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que comprenden un par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR contenidas dentro de cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 ilustrativos listados en la Tabla 1. En ciertos aspectos, el par de secuencia de aminoácidos HCVR/LCVR se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/170, 186/194, 202/210, 218/226, 234/242, 250/258, 266/274, 282/274, 290/274, 298/274, 306/274, 314/274, 322/274, 330/274 y 338/274. En ciertos aspectos de la divulgación, el par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR se selecciona de una de SEQ ID NOs: 82/90 (por ejemplo, H2M8314N), 162/170 (por ejemplo, H2M8718N), 306/274 (por ejemplo, H1H9364P2), y 314/274 (por ejemplo, H1 H9373P2). En ciertos otros aspectos de la divulgación, el par de secuencia de aminoácidos HCVR/LCVR se selecciona de una de SEQ ID NOs: 98/106 (por ejemplo, H2M8316N), 146/154 (por ejemplo, H2M8323N), 290/274 (por ejemplo, H1H9351P2) y 330/274 (por ejemplo, H1H9387P2).

40 La presente divulgación también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que comprenden una cadena pesada CDR1 (HCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCDR1 listadas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia.

45 La presente divulgación también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que comprenden una cadena pesada CDR2 (HCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCDR2 listadas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia.

50 La presente divulgación también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que comprenden una cadena pesada CDR3 (HCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCDR3 listadas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia.

55 La presente divulgación también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que comprenden una cadena ligera CDR1 (LCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCDR1 listadas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia.

60 La presente divulgación también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que comprenden una cadena ligera CDR2 (LCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCDR2 listadas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia.

65 La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que comprenden una cadena ligera CDR3 (LCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCDR3 listadas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar

de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia.

La presente divulgación también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que comprenden un par de secuencias de aminoácidos HCDR3 y LCDR3 (HCDR3/LCDR3) que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCDR3 listadas en la Tabla 1 junto con cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCDR3 listadas en la Tabla 1. De acuerdo con ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que comprenden un par de secuencias de aminoácidos HCDR3/LCDR3 contenidas dentro de cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 ilustrativos listados en la Tabla 1. En ciertos aspectos, el par de secuencia de aminoácidos HCDR3/LCDR3 se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 88/96 (por ejemplo, H2M8314N), 168/176 (por ejemplo, H2M8718N), 312/280 (por ejemplo, H1H9364P2) y 320/280 (por ejemplo, H1H9373P2). En ciertos otros aspectos, el par de secuencia de aminoácidos HCDR3/LCDR3 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 104/112 (por ejemplo, H2M8316N), 152/160 (por ejemplo, H2M8323N), 296/280 (por ejemplo, H1H9351 P2), y 336/280 (por ejemplo, H1H9387P2).

La presente divulgación también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que comprenden un conjunto de seis CDR (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contenidos dentro de cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 ilustrativos listados en la Tabla 1. En ciertos aspectos de la divulgación, la secuencia de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 establecida se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 84-86-88-92-94-96 (por ejemplo, H2M8314N); 164-166-168-172-174-176 (por ejemplo, H2M8718N); 308-310-312-276-278-280 (por ejemplo, H1H9364P2); y 316-318-320-276-278-280 (por ejemplo, H1H9373P2). En ciertos otros aspectos, la secuencia de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 establecida se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 100-102-104-108-110-112 (por ejemplo, H2M8316N); 148-150-152-156-158-160 (por ejemplo, H2M8323N); 292-294-296-276-278-280 (por ejemplo, H1H9351P2); y 332-334-336-276-278-280 (por ejemplo, H1H9387P2).

En un aspecto relacionado, la presente divulgación proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que comprenden un conjunto de seis CDR (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contenidas dentro de un par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR como se define por cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 ilustrativos listados en la Tabla 1. Por ejemplo, la presente divulgación incluye anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que comprenden la secuencia de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3- LCDR1-LCDR2-LCDR3 establecida contenida dentro de un par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR seleccionadas de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 82/90 (por ejemplo, H2M8314N), 98/106 (por ejemplo, H2M8316N), 146/154 (por ejemplo, H2M8323N), 162/170 (por ejemplo, H2M8718N), 290/274 (por ejemplo, H1H9351P2), 306/274 (por ejemplo, H1H9364P2), 314/274 (por ejemplo, H1H9373P2) y 330/274 (por ejemplo, H1H9387P2). Los métodos y técnicas para la identificación de las CDR dentro de las secuencias de aminoácidos HCVR y LCVR son bien conocidas en la técnica y pueden ser utilizadas para identificar CDR dentro de las secuencias de aminoácidos HCVR y/o LCVR específicas divulgadas en la presente memoria. Las convenciones ilustrativas que se pueden utilizar para identificar los límites de las CDR incluyen, por ejemplo, la definición de Kabat, la definición Chothia, y la definición AbM. En términos generales, la definición Kabat se basa en la variabilidad de secuencia, la definición de Chothia se basa en la localización de las regiones del bucle estructural, y la definición AbM es un compromiso entre los enfoques de Kabat y Chothia. Véase, por ejemplo, Kabat, "Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico", Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273: 927-948 (1997); y Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 9.268-9.272 (1989). Las bases de datos públicas también están disponibles para la identificación de secuencias de CDR dentro de un anticuerpo.

La presente divulgación incluye anticuerpos anti-PD-L1 que tienen un patrón de glicosilación modificado. En algunos aspectos, la modificación para eliminar los sitios de glicosilación deseados puede ser útil, o un anticuerpo que carece de un resto de fucosa presente en la cadena de oligosacárido, por ejemplo, para aumentar la función de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) (ver Schield et al., (2002) JBC 277: 26733). En otras aplicaciones, la modificación de galactosilación se puede hacer con el fin de modificar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

La presente divulgación también proporciona anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que compiten por la unión específica a PD-L1 con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende las CDR de una HCVR y las CDR de una LCVR, en la que la HCVR y la LCVR cada una tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias HCVR y LCVR listadas en la Tabla 1.

La presente divulgación también proporciona anticuerpos aislados y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que bloquean la unión de PD-L1 a PD-1 o B7-1. En algunos aspectos, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que bloquea la unión de PD-L1 a PD-1 o B7-1 puede unirse al mismo epítipo en PD-L1 como PD-1/B7-1 o puede unirse a un epítipo diferente en PD-L1 como PD-1/B7-1. En ciertos aspectos, los anticuerpos que bloquean la unión de PD-L1 a PD-1 o B7-1 comprenden las CDR de una HCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias HCVR listadas en la Tabla 1; y las CDR de una LCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de LCVR listadas en la Tabla 1.

- En realizaciones alternativas, la presente divulgación proporciona anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que no bloquean la unión de PD-L1 a PD-1 o B7-1. En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona anticuerpos aislados o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen a PD-L1, en el que los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos mejoran la unión de PD-L1 a PD-1 o B7-1. En algunos aspectos, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno aislados de los mismos que mejoran la unión de PD-L1 a PD-1/B7-1 comprenden las CDR de una HCVR, en el que la HCVR tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 18, 66, 114, 130, 202, 218, 266, 282, 298, 322 y 338; y las CDR de una LCVR, en la que la LCVR tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 26, 74, 122, 138, 210, 226, y 274. En algunos aspectos, los anticuerpos aislados o fragmentos de unión al antígeno de los mismos comprenden un par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR seleccionadas de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 18/26 (por ejemplo, H2M8307N), 66/74 (por ejemplo, H2M8312N), 114/122 (por ejemplo, H2M8317N), 130/138 (por ejemplo, H2M8321N), 202/210 (por ejemplo, H1H9323P), 218/226 (por ejemplo, H1H9327P), 266/274 (por ejemplo, H1H9344P2), 282/274 (por ejemplo, H1H9345P2), 298/274 (por ejemplo, H1H9354P2), 322/274 (por ejemplo, H1H9382P2) y 338/274 (por ejemplo, H1H9396P2).
- La presente divulgación también proporciona anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen específicamente a PD-L1 de la especie humana o de otras especies. En ciertos aspectos, los anticuerpos pueden unirse al PD-L1 humano y/o al PD-L1 de Cynomolgus.
- La presente divulgación también proporciona anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que presentan competición cruzada por la unión a PD-L1 con un anticuerpo de referencia o un fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende las CDR de una HCVR y las CDR de una LCVR, en el que la HCVR y la LCVR cada una tiene una secuencia de aminoácidos seleccionadas de las secuencias HCVR y LCVR listadas en la Tabla 1.
- En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno que tiene una o más de las siguientes características: (a) bloquea la unión de PD-L1 a PD-1 o B7-1; (b) se une específicamente a PD-L1 humano y/o PD-L1 Cynomolgus; (c) inhibe la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción mixta de linfocitos (MLR); y (d) aumenta la secreción de IL-2 y/o interferón-gamma en un ensayo MLR.
- En algunos aspectos, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede unirse específicamente al PD-L1 de una manera agonista, es decir, puede aumentar o estimular la unión y/o actividad de PD-L1; en otras realizaciones, el anticuerpo puede unirse específicamente a PD-L1 de manera antagonista, es decir, puede bloquear la unión de PD-L1 a su receptor.
- En ciertos aspectos, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la presente invención son biespecíficos y comprenden una primera especificidad de unión a PD-L1 y una segunda especificidad de unión para un segundo epítipo diana. El segundo epítipo diana puede ser otro epítipo de PD-L1 o de una proteína diferente, tal como un co-inhibidor de linfocitos T. El epítipo diana puede estar en un linfocito diferente, incluyendo por ejemplo, un linfocito T diferente, un linfocito B, una célula tumoral, una célula de tejido autoinmunitario o un linfocito infectado por virus.
- En un segundo aspecto, la presente divulgación proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-PD-L1 o porciones de los mismos. Por ejemplo, la presente divulgación proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCVR listadas en la Tabla 1; en ciertos aspectos la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de HCVR listadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma.
- La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCVR listadas en la Tabla 1; en ciertos aspectos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de LCVR listadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma.
- La presente divulgación también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR1 listadas en la Tabla 1; en ciertos aspectos de la divulgación la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de HCDR1 listadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma.
- La presente divulgación también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCDR2 listadas en la Tabla 1; en ciertos aspectos de la divulgación la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de HCDR2 listadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma.

- 5 La presente divulgación también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR3 listadas en la Tabla 1; en ciertos aspectos de la divulgación la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de HCDR3 listadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma.
- 10 La presente divulgación también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCDR1 listadas en la Tabla 1; en ciertos aspectos de la divulgación la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de LCDR1 listadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma.
- 15 La presente divulgación también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCDR2 listadas en la Tabla 1; en ciertos aspectos de la divulgación la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de LCDR2 listadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma.
- 20 La presente divulgación también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR3 listadas en la Tabla 1; en ciertos aspectos de la divulgación la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de LCDR3 listadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma.
- 25 La presente divulgación también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican una HCVR, en la que la HCVR comprende un conjunto de tres CDR (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3), en la que la secuencia de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3 establecida es como se define por cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 ilustrativos listados en la Tabla 1.
- 30 La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican una LCVR, en la que la LCVR comprende un conjunto de tres CDR (es decir, LCDR1-LCDR2-LCDR3), en la que la secuencia de aminoácidos LCDR1-LCDR2-LCDR3 establecida es como se define por cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 ilustrativos listados en la Tabla 1.
- 35 La presente divulgación también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican tanto una HCVR como una LCVR, en la que la HCVR comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR listadas en la Tabla 1, y en la que la LCVR comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCVR listadas en la Tabla 1. En ciertos aspectos, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de HCVR listadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma, y una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de LCVR listadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma. En ciertos aspectos, la molécula de ácido nucleico codifica una HCVR y una LCVR, en la que la HCVR y la LCVR derivan ambas del mismo anticuerpo anti-PD-L1 listado en la Tabla 1. En una realización, la presente invención proporciona una molécula de polinucleótido aislada que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que comprende un par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR de SEQ ID NOS: 82/90.
- 40
- 45
- 50 En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona vectores de expresión recombinantes capaces de expresar un polipéptido que comprende una región variable de la cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención. La presente divulgación incluye vectores de expresión recombinantes que comprenden cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente, es decir, las moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de HCVR, LCVR, y/o CDR como se expone en la Tabla 1. También se incluyen dentro del alcance de la presente invención células hospederas en las que se han introducido tales vectores, así como métodos de producción de los anticuerpos o porciones de los mismos mediante el cultivo de las células hospederas en condiciones que permiten la producción de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, y la recuperación de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos producidos.
- 55
- 60 En un tercer aspecto, la presente divulgación proporciona moléculas de unión al antígeno multiespecíficas y fragmentos de unión al antígeno que comprenden una primera especificidad de unión al antígeno que se une específicamente a PD-L1 y una segunda especificidad de unión al antígeno que se une específicamente a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en PD-L1, un antígeno específico de célula tumoral, un antígeno específico de las células infectadas, y un co-inhibidor de linfocitos T. En ciertos aspectos de la divulgación, la primera especificidad de unión al antígeno puede comprender tres CDR derivadas de una HCVR con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias de HCVR de la Tabla 1 y tres CDR derivadas de una LCVR con
- 65

una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias de LCVR de la Tabla 1. En un aspecto, la primera especificidad de unión al antígeno puede comprender un dominio extracelular de PD-1 o de B7-1, o un fragmento del mismo. La segunda especificidad de unión al antígeno se puede dirigir a un antígeno en la misma célula que PD-L1 o a una célula diferente del mismo tipo de tejido o de un tipo de tejido diferente. Por ejemplo, la molécula de unión al antígeno multiespecífica se puede unir a un linfocito T en el que la primera especificidad de unión al antígeno puede unirse específicamente a PD-L1 y la segunda especificidad de unión al antígeno puede unirse a un co-inhibidor de los linfocitos T en el linfocito T. Como alternativa, en otro aspecto, la primera especificidad de unión al antígeno se une específicamente a PD-L1 en un linfocito T y la segunda especificidad de unión al antígeno se dirige a un antígeno/receptor en un linfocito B o un macrófago o célula presentadora de antígeno. En ciertos aspectos, la segunda especificidad de unión al antígeno se dirige a un antígeno de una célula tumoral, o de una célula infectada con un virus. En un aspecto, la primera especificidad de unión al antígeno comprende un dominio extracelular de PD-1 y la segunda especificidad de unión al antígeno se une a un epítipo diferente en PD-L1. En algunos casos, la primera especificidad de unión al antígeno se une a PD-L1 con una menor afinidad, por ejemplo, con una  $K_D$  de más de  $10^{-8}$  M, más de  $10^{-7}$  M, más de  $10^{-6}$  M, o más de  $10^{-5}$  M.

En otra realización, la invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a PD-L1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un aspecto relacionado, la invención presenta una composición que es una combinación de un anticuerpo anti-PD-L1 y un segundo agente terapéutico. El segundo agente terapéutico puede ser cualquier agente que se combine ventajosamente con un anticuerpo anti-PD-L1. Los agentes ilustrativos que se pueden combinar ventajosamente con un anticuerpo anti-PD-L1 incluyen, sin limitación, otros agentes que se unen y/o modulan la señalización de PD-L1 (incluyendo otros anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, etc.) y/o agentes que no se unen directamente a PD-L1 pero no obstante modulan la activación de células inmunitarias. Las terapias de combinación adicionales y las co-formulaciones que implican los anticuerpos anti-PD-L1 y moléculas de unión al antígeno multiespecíficas de la presente invención se divulgan en otro lugar de la presente memoria.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno o composición farmacéutica de la invención para su uso en la estimulación de la respuesta inmunitaria en un sujeto, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-PD-L1 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención al sujeto en necesidad. En una realización, la invención también proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno o composición farmacéutica de la invención para su uso en un método para estimular o potenciar la activación de linfocitos T en un sujeto, comprendiendo el método la administración de un anticuerpo de bloqueo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención al sujeto en necesidad del mismo. En un aspecto, la divulgación proporciona métodos para inhibir un linfocito T regulador (Treg) en un sujeto, comprendiendo los métodos administrar un anticuerpo de bloqueo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención al sujeto en necesidad del mismo. En ciertas realizaciones, el sujeto en necesidad del mismo puede sufrir una enfermedad o trastorno tal como cáncer o infección viral. En aspectos alternativos, la presente divulgación proporciona métodos para inhibir la activación de linfocitos T, comprendiendo los métodos la administración de un anticuerpo de activación o fragmento de unión al antígeno del mismo a un sujeto en necesidad del mismo. En ciertos aspectos adicionales, el sujeto en necesidad del mismo puede sufrir una enfermedad autoinmunitaria.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno o composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento del cáncer o infección viral, en un sujeto, en el que los métodos terapéuticos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de un anticuerpo de la invención al sujeto en necesidad del mismo. En ciertas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención se administra en combinación con un segundo agente terapéutico al sujeto en necesidad del mismo. El segundo agente terapéutico puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo contra un co-inhibidor de linfocitos T, un anticuerpo contra un antígeno de célula tumoral, un anticuerpo contra un receptor de linfocitos T, un anticuerpo contra un receptor Fc, un anticuerpo contra un epítipo en una célula infectada por virus, un anticuerpo contra PD-1, un agente citotóxico, un fármaco anti-cancerígeno, un fármaco anti-vírico, un fármaco anti-inflamatorio (por ejemplo, corticosteroides), un antagonista del VEGF, y cualquier otro fármaco o terapia conocida en la técnica. En ciertas realizaciones, el segundo agente terapéutico puede ser un agente que ayuda a contrarrestar o reducir cualquier efecto secundario posible asociado con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención, si tal el efecto o efectos secundarios ocurriese.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un anticuerpo de la invención para su uso en la supresión del crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención aumentan la supervivencia de los pacientes con cáncer. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, cáncer primario y/o cáncer recurrente, incluyendo el cáncer de cerebro (por ejemplo, glioblastoma multiforme), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico), carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma de células renales, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de próstata, y cáncer de colon. Los métodos comprenden la administración de una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-PD-L1 de la presente invención en combinación con un segundo agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (por ejemplo, aflibercept ,

bevacizumab), un inhibidor de la angiopoyetina-2 (Ang2) (por ejemplo, un anticuerpo anti-Ang2 como nesvacumab), un inhibidor del gen de activación de linfocitos 3 (LAG-3), un inhibidor del antígeno de linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA-4) (por ejemplo, ipilimumab), un inhibidor de CCR4 (por ejemplo, mogamulizumab), un agente quimioterapéutico, y radioterapia. Otros ejemplos de terapias adicionales/agentes terapéuticos adicionales que se pueden utilizar en combinación con un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención para su uso en el tratamiento del cáncer se describen en la presente memoria.

El anticuerpo o fragmento del mismo se puede administrar por vía subcutánea, intravenosa, intradérmica, intraperitoneal, por vía oral, por vía intramuscular, o por vía intracraneal. El anticuerpo o fragmento del mismo se pueden administrar en una dosis de aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg /kg de peso corporal del sujeto.

La presente divulgación también incluye el uso de un anticuerpo anti-PD-L1 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer e infección viral crónica) que se beneficiarían del bloqueo o potenciación de la unión y/o señalización de PD-L1.

Otras realizaciones serán evidentes a partir de una revisión de la descripción detallada que se incluye a continuación.

### Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** es un esquema del bioensayo PD-L1 basado en luciferasa descrito en el Ejemplo 8 de la presente memoria. Panel A: células Jurkat inactivas; Panel B: células Jurkat activadas por medio del receptor de linfocitos T (TCR) a través de la combinación del anticuerpo biespecífico CD3xCD20; Panel C: la activación de PD-1 atenúa la respuesta en las células Jurkat activadas; Panel D: el bloqueo de PD-L1 rescata la respuesta en las células Jurkat activadas.

La **Figura 2** ilustra el crecimiento del tumor y los resultados de supervivencia de los ratones implantados con células de tumor de colon-26 en el día 0 y tratados con las combinaciones indicadas de moléculas por inyección en los días 3, 6, 10, 13 y 19 ("modelo de tratamiento temprano del tumor"). El gráfico muestra el volumen del tumor (en mm<sup>3</sup>) para los diferentes grupos experimentales en diversos puntos de tiempo después de la implantación. Las flechas hacia arriba a lo largo del eje X indican los puntos temporales de las inyecciones del tratamiento. "mIgG2a" es el control del isotipo IgG2; "Fc" es el control Fc humano; "trampa del VEGF" es aflibercept; "anti-PD-1" es anti-PD-1 de ratón clon RPMI-14; "anti-PD-L1" es un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 como se describe en la presente memoria.

La **Figura 3** ilustra el crecimiento del tumor y los resultados de supervivencia de los ratones implantados con células de tumor de colon 26 en el día 0 y tratados con las combinaciones indicadas de moléculas por inyección en los días 3, 6, 10, 13 y 19 ("modelo de tratamiento temprano del tumor"). El gráfico muestra el volumen del tumor (en mm<sup>3</sup>) de ratones individuales en cada grupo experimental en el día 28 después de la implantación. "mIgG2a" es el control del isotipo IgG2; "Fc" es el control Fc humano; "trampa del VEGF" es aflibercept; "anti-PD-1" es anti-PD-1 de ratón clon RPMI-14; "anti-PD-L1" es un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 como se describe en la presente memoria.

### Descripción detallada

Antes de describir los presentes métodos, se debe entender que esta invención no está limitada a los métodos particulares, y las condiciones experimentales descritas, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. También se debe entender que la terminología utilizada en la presente memoria tiene el propósito de describir solamente realizaciones particulares, y no pretende ser limitante, dado que el alcance de la presente invención se limitará únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria se pueden usar en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen ahora los métodos y materiales preferidos.

El término "PD-L1" se refiere al ligando de muerte programada 1, también conocido como CD274 y B7H1. La secuencia de aminoácidos de longitud completa PD-L1 se proporciona en GenBank con el número de acceso NP\_054862.1 y también se denomina en la presente memoria como SEQ ID NO: 351. El término "PD-L1" también incluye variantes de la proteína PD-L1 que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 345, 346, 347 o 348. El término "PD-L1" incluye PD-L1 recombinante o un fragmento del mismo. El término también abarca PD-L1 o un fragmento del mismo acoplado a, por ejemplo, etiqueta de histidina, Fc de ratón o humano, o una secuencia de señal tal como ROR1. Por ejemplo, el término incluye secuencias ilustradas por las SEQ ID NOs: 347 o 348, que comprende un Fc de ratón (mIgG2a) o Fc humano (hIgG1) en el extremo C terminal, acoplado a los restos de aminoácidos 19-239 del PD-L1 de longitud completa (SEQ ID NO: 351; NP\_054862.1). Las variantes de la proteína



como se ilustra por la SEQ ID NO: 345 comprenden una etiqueta de histidina en el extremo C terminal, acoplada a los residuos de aminoácidos 19-239 de NP\_054862.1. A menos que se especifique como procedente de una especie no humana, el término "PD-L1" significa PD-L1 humano.

5 PD-L1 es una proteína de 290 aminoácidos con dominios de tipo IgV e IgC extracelulares (aminoácidos 19-239 de PD-L1 de longitud completa), un dominio transmembrana y un dominio intracelular de aproximadamente 30 aminoácidos. PD-L1 se expresa constitutivamente en muchas células tales como las células presentadoras de antígeno (por ejemplo, células dendríticas, macrófagos y linfocitos B) y en células hematopoyéticas y no hematopoyéticas (por ejemplo, células endoteliales vasculares, islotes pancreáticos y sitios de privilegio inmunitario).  
10 PD-L1 se expresa también en una amplia variedad de tumores y células infectadas por virus y es un componente del medio inmunosupresor (Ribas 2012, NEJM 366: 2517-2519). PD-L1 se une a uno de los dos co-inhibidores de los linfocitos T, PD-1 y B7-1.

15 El término "PD-1" se refiere a la proteína de muerte programada 1, un co-inhibidor de los linfocitos T, también conocido como CD279. La secuencia de aminoácidos de longitud completa PD-1 se proporciona en GenBank con el número de acceso NP\_005009.2 y también se denomina en la presente memoria como SEQ ID NO: 352. El término también abarca PD-1 o un fragmento de la misma acoplado a, por ejemplo, etiqueta de histidina, Fc de ratón o humano, o una secuencia señal tal como ROR1. Por ejemplo, el término incluye secuencias ilustradas por las SEQ ID NOs: 349 o 350, que comprenden un Fc de ratón (mIgG2a) o Fc humano (hIgG1) en el extremo C terminal, acoplado a los restos de aminoácidos 25-170 de NP\_005009.2 con un cambio C93S.

20 PD-1 es un miembro de la familia CD28/CTLA-4/ICOS de co-inhibidores de linfocitos T. PD-1 es una proteína de 288 aminoácidos con un dominio N-terminal extracelular similar a IgV, un dominio transmembrana y un dominio intracelular que contiene un motivo inhibidor de inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM) y un motivo de cambio de inmunoreceptor basado en tirosina (ITSM) (Chattopadhyay et al., 2009, Immunol. Rev.). El receptor PD-1 tiene dos ligandos, PD-L1 y PD-L2.

25 El término "B7-1" se refiere al antígeno de activación de los linfocitos T, también conocido como factor coestimulador CD80. B7-1 es un receptor de membrana de aminoácidos 288 con un dominio extracelular N-terminal que comprende regiones similares a IgV (aa 37-138) y similares a IgC (aa 154- 232), un dominio transmembrana (aa 243 - 263) y una región intracelular C terminal (aa 263 - 288). La secuencia de aminoácidos de longitud completa B7-1 se proporciona en GenBank con el número de acceso NP\_005182.1.

30 Como se usa en la presente memoria, la expresión "co-inhibidor de linfocitos T" se refiere a un ligando y/o receptor que modula la respuesta inmunitaria a través de la activación o supresión de linfocitos T. La expresión "co-inhibidor de linfocitos T", también conocido como co- molécula de señalización de linfocitos T, incluye, pero no se limita a, PD-1, proteína del gen 3 de activación de linfocitos (LAG-3, también conocida como CD223), antígeno de linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA-4), atenuador de linfocitos B y T (BTLA), CD-28, 2B4, LY108, inmunoglobulina de linfocitos T y mucina-3 (TIM3), inmunoreceptor de linfocitos T con inmunoglobulina e ITIM (TIGIT; también conocido como VSIG9), receptor de leucocitos similar a inmunoglobulina 1 (LAIR1; también conocido como CD305), coestimulador inducible de linfocitos T (ICOS; también conocido como CD278), B7-1 (CD80), y CD160.

35 El término "anticuerpo", como se usa en la presente memoria, pretende referirse a moléculas de inmunoglobulina compuestas de cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro (es decir, "moléculas de anticuerpo completas"), así como multímeros de las mismas (por ejemplo, IgM) o fragmentos de unión al antígeno de las mismas. Cada cadena pesada está compuesta de una región variable de la cadena pesada ("HCVR" o "V<sub>H</sub>") y una región constante de la cadena pesada (compuesta de los dominios de C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> y C<sub>H3</sub>). Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de la cadena ligera ("LCVR" o "V<sub>L</sub>") y una región constante de la cadena ligera (C<sub>L</sub>). Las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> pueden subdividirse a su vez en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones flanqueantes (FR) . Cada V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo amino terminal al extremo carboxi terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En ciertas realizaciones de la invención, las FR del anticuerpo (o fragmento de unión al antígeno del mismo) pueden ser idénticas a las secuencias de la línea germinal humana, o pueden ser modificadas de forma natural o artificial. Una secuencia de consenso de aminoácidos puede definirse basándose en un análisis de lado a lado de dos o más CDR.

45 La sustitución de uno o más restos de CDR o la omisión de una o más CDR también es posible. En la literatura científica se han descrito anticuerpos en los cuales se pueden prescindir de la unión de una o dos CDR. Padlan et al., (1995 FASEB J. 9:133-139) analiza las regiones de contacto entre los anticuerpos y sus antígenos, basándose en estructuras cristalinas publicadas, y llegaron a la conclusión de que solo aproximadamente de un quinto a un tercio de los restos de CDR hacen contactos en realidad con el antígeno. Padlan también descubrió muchos anticuerpos en los que una o dos CDR no tenían aminoácidos en contacto con un antígeno (véase también, Vajdos et al., 2002 J Mol Biol 320:415-428).

60 Los restos de CDR que no hacen contacto con el antígeno pueden ser identificados en base a estudios anteriores

(por ejemplo, frecuentemente no se requieren los restos H60-H65 de CDRH2), de las regiones de CDR de Kabat que se encuentran fuera de las CDR de Chothia, por modelado molecular y/o empíricamente. Si se omite un CDR o resto(s), por lo general es sustituida con un aminoácido que ocupa la posición correspondiente en otra secuencia de anticuerpo humano o un consenso de tales secuencias. Las posiciones de sustitución dentro de las CDR y aminoácidos para sustituir también se pueden seleccionar empíricamente. Las sustituciones empíricas pueden ser sustituciones conservadoras o no conservadoras.

Los anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 completamente humanos divulgados en la presente memoria pueden comprender una o más sustituciones de aminoácidos, inserciones y/o deleciones en el marco y/o regiones CDR de los dominios variables de cadena pesada y ligera en comparación con las secuencias de la línea germinal correspondientes. Tales mutaciones se pueden determinar fácilmente mediante la comparación de las secuencias de aminoácidos divulgadas en la presente memoria con las secuencias de la línea germinal disponibles en, por ejemplo, bases de datos de secuencias de anticuerpos públicas. La presente divulgación incluye anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que se derivan de cualquiera de las secuencias de aminoácidos divulgadas en la presente memoria, en las que uno o más aminoácidos dentro de uno o más marcos y/o regiones CDR están mutadas al resto o restos correspondientes de la secuencia de la línea germinal de la que se derivó el anticuerpo, o al resto o restos correspondientes de otra secuencia de la línea germinal humana, o a una sustitución conservadora de aminoácidos del resto o restos de la línea germinal correspondiente (tales cambios de secuencia se denominan aquí colectivamente como "mutaciones de la línea germinal"). Una persona de habilidad ordinaria en la técnica, a partir de las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera divulgadas en la presente memoria, puede producir fácilmente numerosos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno que comprenden una o más mutaciones de la línea germinal individuales o combinaciones de las mismas. En ciertos aspectos, todos los restos de marco y/o de CDR dentro de los dominios de  $V_H$  y/o  $V_L$  están mutados de nuevo a los restos encontrados en la secuencia de la línea germinal original de la que se derivó el anticuerpo. En otros aspectos, solamente ciertos restos están mutados de nuevo a la secuencia de la línea germinal original, por ejemplo, solamente los restos mutados se encuentran dentro de los primeros 8 aminoácidos de FR1 o dentro de los últimos 8 aminoácidos de FR4, o solamente los restos mutados se encuentran dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otros aspectos, uno o más de los restos de marco y/o CDR se mutan al resto o restos correspondientes de una secuencia diferente de la línea germinal (es decir, una secuencia de la línea germinal que es diferente de la secuencia de la línea germinal de la que se derivó originalmente el anticuerpo). Además, los anticuerpos de la presente divulgación pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de la línea germinal en las regiones de marco y/o CDR, por ejemplo, en las que ciertos restos individuales están mutados al resto correspondiente de una secuencia de la línea germinal particular, mientras que algunos otros restos que difieren de la secuencia de la línea germinal original se mantienen o se mutan al resto correspondiente de una secuencia de la línea germinal diferente. Una vez obtenidos, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno que contienen una o más mutaciones de la línea germinal se pueden ensayar fácilmente respecto a una o más propiedades deseadas, tales como, la mejora de la especificidad de unión, mayor afinidad, propiedades biológicas antagonistas o agonistas mejoradas o mejoras de unión (según el caso), inmunogenicidad reducida, etc. Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno obtenidos de esta manera están en general abarcados dentro de la presente divulgación.

La presente divulgación también incluye anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 completamente humanos que comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCVR, LCVR, y/o CDR divulgadas en la presente memoria que tienen una o más sustituciones conservadoras. Por ejemplo, la presente divulgación incluye anticuerpos anti-PD-L1 que tienen secuencias de aminoácidos HCVR, LCVR, y/o CDR con, por ejemplo, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etc. sustituciones de aminoácidos conservadoras en relación a cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCVR, LCVR, y/o de CDR divulgadas en la presente memoria.

La expresión "anticuerpo humano", como se usa en la presente memoria, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los mAbs humanos incluyen restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDR y en particular, CDR3. Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en la presente memoria, no pretende incluir mAbs en los cuales las secuencias de CDR que derivan de la línea germinal de otra especie de mamífero (por ejemplo, de ratón), se han injertado en las secuencias de FR humanas. La expresión incluye anticuerpos producidos de forma recombinante en un mamífero no humano, o en células de un mamífero no humano. La expresión no pretende incluir anticuerpos aislados o generados en un sujeto humano.

La expresión "moléculas de unión al antígeno multiespecíficas", tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a moléculas de unión al antígeno biespecíficas, triespecíficas o multiespecíficas, y fragmentos de unión al antígeno de las mismas. Las moléculas de unión al antígeno multiespecíficas pueden ser específicas de diferentes epítopos de un polipéptido diana o pueden contener dominios de unión al antígeno específicos para epítopos de más de un polipéptido diana. Una molécula de unión al antígeno multiespecífica puede ser un solo polipéptido multifuncional, o puede ser un complejo multimérico de dos o más polipéptidos que están asociados entre sí de forma covalente o de forma no covalente. La expresión "moléculas de unión al antígeno multiespecíficas" incluye anticuerpos de la presente invención que pueden estar unidos o co-expresarse con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido

o proteína. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo pueden estar unidos funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares, tales como una proteína o fragmento de la misma para producir una molécula biespecífica o una molécula multiespecífica de unión al antígeno con una segunda especificidad de unión. De acuerdo con la presente invención, la expresión “moléculas de unión al antígeno multiespecíficas” también incluye anticuerpos biespecíficos, triespecíficos o multiespecíficos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la presente invención está funcionalmente ligado a otro anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para producir un anticuerpo biespecífico con una segunda especificidad de unión. Los anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos de la presente invención se describen en otra parte de la presente memoria.

La expresión “se une específicamente” o “se une específicamente a”, o similares, significa que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo forma un complejo con un antígeno que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. La unión específica puede caracterizarse por una constante de equilibrio de disociación de al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-8}$  M o menos (por ejemplo, una  $K_D$  menor indica una unión más fuerte). Los métodos para determinar si dos moléculas se unen específicamente son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, diálisis de equilibrio, resonancia de plasmón superficial, y similares. Como se describe en la presente memoria, los anticuerpos han sido identificados por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, BIACORE™, los cuales se unen específicamente a PD-L1. Además, los anticuerpos multiespecíficos que se unen a un dominio de PD-L1 y uno o más antígenos adicionales o uno biespecífico que se une a dos diferentes regiones de PD-L1 se consideran, sin embargo, anticuerpos que “se unen específicamente”, como se usa en la presente memoria.

La expresión anticuerpo de “alta afinidad” se refiere a aquellos mAbs que tienen una afinidad de unión a PD-L1, expresada como  $K_D$ , de al menos  $10^{-8}$  M, preferiblemente  $10^{-9}$  M; más preferiblemente  $10^{-10}$  M, incluso más preferiblemente  $10^{-11}$  M, incluso más preferiblemente  $10^{-12}$  M, medido por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, BIACORE™ o solución de afinidad ELISA.

Por la expresión “constante de disociación lenta”, “Koff” o “kd” se entiende un anticuerpo que se disocia de PD-L1, con una constante de velocidad de  $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  o menos, preferiblemente  $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  o menos, como se determina por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, BIACORE™.

Las expresiones “porción de unión al antígeno” de un anticuerpo, “fragmento de unión al antígeno” de un anticuerpo, y similares, como se usa en la presente memoria, incluyen cualquier polipéptido o glicoproteína de origen natural, que se puede obtener enzimáticamente, sintético, u obtenido por ingeniería genética que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Las expresiones “fragmento de unión al antígeno” de un anticuerpo, o “fragmento de anticuerpo”, como se usa en la presente memoria, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse a PD-L1.

En aspectos específicos, el anticuerpo o fragmentos del anticuerpo de la invención pueden conjugarse con un resto tal como un ligando o un ligando terapéutico (“inmunoconjugado”), tal como un antibiótico, un segundo anticuerpo anti-PD-L1, o un anticuerpo con otro antígeno tal como un antígeno específico de tumores, un antígeno de células infectadas por virus, o un co-inhibidor de linfocitos T, o una inmunotoxina, o cualquier otro resto terapéutico útil para tratar una enfermedad o condición, incluyendo por ejemplo, cáncer, infección viral, crónica o enfermedad autoinmunitaria.

Un “anticuerpo aislado”, como se usa en la presente memoria, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente exento de otros anticuerpos (Abs) que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-L1 o un fragmento del mismo, está sustancialmente exento de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de PD-L1.

Un “anticuerpo bloqueador” o un “anticuerpo neutralizante”, como se usa en la presente memoria (o un “anticuerpo que neutraliza la actividad de PD-L1” o un “anticuerpo antagonista”), pretende referirse a un anticuerpo cuya unión a PD-L1 tiene como resultado la inhibición de al menos una actividad biológica de PD-L1. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede prevenir o bloquear la unión de PD-L1 a PD-1 o a B7-1.

Un “anticuerpo activador” o un “anticuerpo potenciador”, como se usa en la presente memoria (o un “anticuerpo agonista”), pretende referirse a un anticuerpo cuya unión a PD-L1 da como resultado un aumento o la estimulación de al menos una actividad biológica de PD-L1. Por ejemplo, un anticuerpo puede aumentar o potenciar la unión de PD-L1 a PD-1 o B7-1.

La expresión “resonancia de plasmón superficial”, como se usa en la presente memoria, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones biomoleculares en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz de biosensor, por ejemplo usando el sistema BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, N.J.).

El término “ $K_b$ ”, como se usa en la presente memoria, pretende referirse a la constante de equilibrio de disociación de una interacción particular de anticuerpo-antígeno.

El término "epítopo" se refiere a un determinante antigénico que interactúa con un sitio de unión al antígeno específica en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como un paratopo. Un único antígeno puede tener más de un epítopo. Por lo tanto, diferentes anticuerpos pueden unirse a diferentes áreas de un antígeno y pueden tener diferentes efectos biológicos. El término "epítopo" se refiere también a un sitio en un antígeno al que responden linfocitos B y/o T. También se refiere a una región de un antígeno que está unida por un anticuerpo. Los epítomos pueden definirse como estructurales o funcionales. Los epítomos funcionales son generalmente un subconjunto de los epítomos estructurales y tienen aquellos restos que contribuyen directamente a la afinidad de la interacción. Los epítomos también pueden ser conformacionales, es decir, estar compuestos de aminoácidos no lineales. Los epítomos pueden incluir determinantes que son agrupaciones de superficie químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, grupos fosforilo, o grupos sulfonilo, y, en ciertas situaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas.

La expresión "identidad sustancial" o "sustancialmente idéntica", cuando se refiere a un ácido nucleico o fragmento del mismo, indica que, cuando se alinea óptimamente con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiados con otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), existe una identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente 90 %, y más preferiblemente al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de las bases nucleotídicas, medida por cualquier algoritmo bien conocido de identidad de secuencia, tales como FASTA, BLAST o GAP, como se describe a continuación. Una molécula de ácido nucleico que tiene una identidad sustancial con una molécula de ácido nucleico de referencia puede, en ciertos casos, codificar un polipéptido que tiene la misma secuencia o una secuencia sustancialmente similar de aminoácidos que el polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de referencia.

Como se aplica a los polipéptidos, la expresión "similitud sustancial" o "sustancialmente similar" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean óptimamente, tal como mediante el programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto, comparten al menos 90 % de identidad de secuencia, incluso más preferiblemente al menos 95 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia. Preferiblemente, las posiciones de restos, que no son idénticos, difieren por sustituciones conservadoras de aminoácidos. Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es una en la que un resto de aminoácido está sustituido por otro resto de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución conservadora de aminoácidos no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en los que dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservadoras, el porcentaje o grado de similitud pueden ajustarse hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Los medios para hacer este ajuste son bien conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. Ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadenas laterales de hidroxilo alifático: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato, y 7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Los grupos de sustitución conservadora de aminoácidos preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y glutamina-asparagina. Como alternativa, una sustitución conservadora es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 divulgada en Gonnet et al., (1992) *Science* 256: 1443-45. Una sustitución "moderadamente conservadora" es cualquier cambio que tenga un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

La similitud de secuencia para polipéptidos se mide normalmente usando software de análisis de secuencia. El software de análisis de proteínas compara secuencias similares usando medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, deleciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones de aminoácidos conservadoras. Por ejemplo, el software GCG contiene programas tales como GAP y BESTFIT que se pueden usar con parámetros por defecto para determinar la homología de secuencia o la identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo silvestre y una muteína de la misma. Véase, por ejemplo, GCG Versión 6.1. Las secuencias polipeptídicas también se pueden comparar usando FASTA con parámetros por defecto o recomendados; un programa en GCG Versión 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineaciones e identidad de secuencia porcentual de las regiones de la mejor superposición entre las secuencias de consulta y de búsqueda (Pearson (2000) *supra*). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia de la invención con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente BLASTP o TBLASTN, que utiliza parámetros por defecto. Véase, por ejemplo, Altschul et al., (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 y (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3.389-3402.

Por la frase "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad que produce el efecto deseado para el que se administra. La cantidad exacta dependerá de la finalidad del tratamiento, y será determinable por un experto en la materia usando técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

Como se usa en la presente memoria, el término “sujeto” se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero, en necesidad de mejora, prevención y/o tratamiento de una enfermedad o trastorno como la infección viral crónica, cáncer o enfermedad autoinmunitaria.

5 Como se usa en la presente memoria, “fármaco contra el cáncer” significa cualquier agente útil para el tratamiento del cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a, citotoxinas y agentes tales como antimetabolitos, agentes alquilantes, antraciclina, antibióticos, agentes antimicóticos, procarbazona, hidroxurea, asparaginasa, corticosteroides, mitotano (O,P'-(DDD)), interferones y agentes radiactivos. Tal como se usa en la presente memoria, “un agente citotóxico o citotoxina” significa cualquier agente que es perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen Taxol® (paclitaxel),  
10 citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi-antracina-diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desdihidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos.

15 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión “fármaco antiviral” se refiere a cualquier medicamento o terapia que se usa para tratar, prevenir o mejorar una infección viral en un sujeto hospedador. La expresión “fármaco anti-viral” incluye, pero no se limita a zidovudina, lamivudina, abacavir, ribavirina, lopinavir, efavirenz, cobicistat, tenofovir, rilpivirina, analgésicos y corticosteroides. En el contexto de la presente invención, las infecciones virales incluyen infecciones a largo plazo o crónicas causadas por virus, incluyendo, pero sin limitarse a, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B (HBV), virus de la hepatitis C (HCV), virus del papiloma humano (HPV), virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), y el virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV).  
20

Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de la presente invención se unen específicamente a PD-L1 y modulan la interacción de PD-L1 con PD-1 o con B7-1. Los anticuerpos anti-PD-L1, descritos en la presente memoria, pueden unirse a PD-L1 con alta afinidad o con baja afinidad. Los anticuerpos de la presente invención están bloqueando los anticuerpos en los que los anticuerpos se unen a PD-L1 y bloquean la interacción de PD-L1 con PD-1 o con B7-1. Los anticuerpos de bloqueo de la invención bloquean la unión de PD-L1 a PD-1 o a B7-1 y/o estimulan o potencian la activación de linfocitos T. En algunas realizaciones, los anticuerpos de bloqueo son útiles para estimular o potenciar la respuesta inmunitaria y/o para el tratamiento de un sujeto que padece cáncer, o una infección viral crónica. Los anticuerpos cuando se administran a un sujeto en necesidad de los mismos pueden reducir la infección crónica por un virus como el VIH, LCMV o HBV en el sujeto. Se pueden usar para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto. Se pueden usar solos o como complemento de la terapia con otros restos terapéuticos o realizaciones conocidas en la técnica para el tratamiento del cáncer, o infección viral. En ciertos aspectos, los anticuerpos anti-PD-L1 que se unen a PD-L1 con una baja afinidad se utilizan como moléculas de unión al antígeno multiespecíficas en la que la primera especificidad de unión se une a PD-L1 con una baja afinidad y la segunda especificidad de unión se une a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en un epítipo diferente de PD-L1, un co-inhibidor de linfocitos T tal como PD-1, un antígeno específico de tumor y un antígeno específico de células infectadas.  
25  
30  
35

40 En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la presente divulgación son anticuerpos agonistas, en los que los anticuerpos se unen al PD-L1 y mejoran la interacción de PD-L1 y PD-1/B7-1. En algunos aspectos, los anticuerpos activadores potencian la unión de PD-L1 a PD-1 o a B7-1 y/o inhiben o suprimen la activación de linfocitos T. Los anticuerpos de activación de la presente invención pueden ser útiles para inhibir la respuesta inmunitaria en un sujeto y/o para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria.  
45

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-L1 son moléculas de unión al antígeno multiespecíficas, que comprenden una primera especificidad de unión a PD-L1 y una segunda especificidad de unión a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en un epítipo diferente de PD-L1, un co-inhibidor de linfocitos T tales como PD-1, un antígeno específico de tumor y un antígeno específico de células infectadas. En ciertos aspectos, la primera especificidad de unión se une a PD-L1 con baja afinidad, por ejemplo, con una  $K_D$  de  $10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M o más.  
50

Ciertos anticuerpos anti-PD-L1 de la presente divulgación son capaces de unirse a y neutralizar la actividad de PD-L1, como se determina por ensayos *in vitro* o ensayos *in vivo*. La capacidad de los anticuerpos para unirse y neutralizar la actividad de PD-L1 se puede medir usando cualquier método convencional conocido por los expertos en la materia, incluyendo ensayos de unión, o ensayos de actividad, como se describe en la presente memoria.  
55

Ensayos *in vitro* ilustrativos no limitantes para medir la actividad de unión se ilustran en el Ejemplo 3 de la presente memoria. En el Ejemplo 3, las afinidades de unión y las constantes cinéticas de los anticuerpos humanos anti-PD-L1 para PD-L1 humanos y PD-L1 de *Cynomolgus* se determinó por resonancia de plasmón superficial y las mediciones se realizaron en un instrumento Biacore T200. En los Ejemplos 4 y 5, se utilizaron ensayos de bloqueo para determinar la capacidad de los anticuerpos anti-PD-L1 para bloquear la capacidad de unión de PD-L1 de PD-1 o B7-1 *in vitro*. En el Ejemplo 6, se utilizaron ensayos de bloqueo para determinar la competencia cruzada entre diferentes anticuerpos anti-PD-L1. El Ejemplo 7 describe la unión de los anticuerpos a las células que sobreexpresan PD-L1. En el Ejemplo 8, se utilizó un ensayo de luciferasa para determinar la capacidad de los anticuerpos anti-PD-L1 para antagonizar la señalización de PD-1/ PD-L1 en linfocitos T.  
60  
65

Los anticuerpos de la presente invención son capaces de potenciar o estimular la activación de linfocitos T *in vitro* y en un sujeto con cáncer o en un sujeto infectado con un virus tal como el LCMV. En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención se usan en combinación con un segundo agente terapéutico, tal como un anticuerpo contra un antígeno específico de tumor o un co-inhibidor de linfocitos T, para potenciar la respuesta inmunitaria e inhibir el crecimiento del tumor en un sujeto. En ciertos aspectos de la divulgación, los anticuerpos agonistas descritos en la presente memoria son capaces de potenciar la unión de PD-L1 a PD-1 o B7-1 y pueden inhibir la activación de linfocitos T *in vitro* y/o en un sujeto con enfermedad autoinmunitaria.

Los anticuerpos específicos para PD-L1 pueden no contener marcadores o restos adicionales, o pueden contener un marcador o resto N-terminal o C-terminal. En una realización, el marcador o el resto es biotina. En un ensayo de unión, la ubicación de un marcador (si existe) puede determinar la orientación del péptido con respecto a la superficie sobre la que se une el péptido. Por ejemplo, si una superficie está recubierta con avidina, un péptido que contiene una biotina N-terminal se orientará de tal manera que la porción C-terminal del péptido será distal a la superficie. En una realización, el marcador puede ser un radionúclido, un colorante fluorescente o un marcador detectable por MRI. En ciertos aspectos, tales anticuerpos marcados pueden usarse en ensayos de diagnóstico, incluyendo ensayos de formación de imágenes.

### Fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos

A menos que se indique específicamente lo contrario, el término "anticuerpo", como se usa en la presente memoria, deberá entenderse que abarca moléculas de anticuerpos que comprenden dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina (es decir, "moléculas de anticuerpos completas"), así como los fragmentos de unión al antígeno de los mismos. Las expresiones "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo, como se usa en la presente memoria, incluyen cualquier polipéptido o glicoproteína de origen natural, que se puede obtener enzimáticamente, sintético, u obtenido por ingeniería genética que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Las expresiones "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo, o "fragmento de anticuerpo", como se usa en la presente memoria, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a PD-L1.

Un fragmento de anticuerpo puede incluir un fragmento Fab, un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento Fv, un fragmento dAb, un fragmento que contiene una CDR, o una CDR aislada. En ciertas realizaciones, la expresión "fragmento de unión al antígeno" se refiere a un polipéptido o fragmento del mismo de una molécula de unión al antígeno multiespecífica. En tales realizaciones, la expresión "fragmento de unión al antígeno" incluye, por ejemplo, un dominio extracelular de PD-1 que se une específicamente a PD-L1. Los fragmentos de unión al antígeno de un anticuerpo se pueden derivar, por ejemplo, de moléculas de anticuerpos completas utilizando cualquiera de las técnicas convencionales adecuadas, tales como técnicas de digestión proteolítica o de ingeniería genética recombinante que implican la manipulación y la expresión de ADN que codifica dominios variables y (opcionalmente) constantes de anticuerpos. Tal ADN se conoce y/o se puede obtener fácilmente a partir de, por ejemplo, fuentes comerciales, bibliotecas de ADN (incluyendo, por ejemplo, bibliotecas de fagos-anticuerpos), o se pueden sintetizar. El ADN puede ser secuenciado y manipulado químicamente o mediante el uso de técnicas de biología molecular, por ejemplo, para disponer uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear restos de cisteína, modificar, añadir o eliminar aminoácidos, etc.

Ejemplos no limitativos de fragmentos de unión al antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv); (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades mínimas de reconocimiento que consisten en los restos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, una región determinante de complementariedad (CDR) aislada, tal como un péptido CDR3), o un péptido FR3-CDR3-FR4 restringido. Otras moléculas diseñadas, tales como anticuerpos de dominio específico, anticuerpos de dominio único, anticuerpos de dominio delecionado, anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados con CDR, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, nanocuerpos (por ejemplo, nanocuerpos monovalentes, nanocuerpos bivalentes, etc.), inmuno-farmacéuticos modulares pequeños (SMIPs), y dominios de IgNAR variables de tiburón, también se incluyen dentro de la expresión "fragmento de unión al antígeno", como se usa en la presente memoria.

Un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo comprenderá normalmente al menos un dominio variable. El dominio variable puede ser de cualquier tamaño o composición de aminoácidos y comprenderá generalmente al menos una CDR, que se encuentra junto a o en el marco de una o más secuencias de marco. En los fragmentos de unión al antígeno que tienen un dominio de V<sub>H</sub> asociado con un dominio de V<sub>L</sub>, los dominios de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> pueden estar situados uno con relación al otro en cualquier disposición adecuada. Por ejemplo, la región variable puede ser dimérica y contener dímeros V<sub>H</sub> - V<sub>H</sub>, V<sub>H</sub> - V<sub>L</sub> o V<sub>L</sub> - V<sub>L</sub>. Como alternativa, el fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio de V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> monomérico.

En ciertas realizaciones, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable unido covalentemente a al menos un dominio constante. Las configuraciones ilustrativas no limitativas de dominios variables y constantes que se pueden encontrar dentro de un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de la presente invención incluyen: (i) V<sub>H</sub> -C<sub>H</sub>1; (ii) V<sub>H</sub> -C<sub>H</sub>2; (iii) V<sub>H</sub> -C<sub>H</sub>3; (iv) V<sub>H</sub> -C<sub>H</sub>1 -C<sub>H</sub>2; (v) V<sub>H</sub> -C<sub>H</sub>1-

CH2-CH3; (vi) V<sub>H</sub>-CH2-CH3; (vii) V<sub>H</sub>-CL; (viii) V<sub>L</sub>-CH1; (ix) V<sub>L</sub>-CH2; (x) V<sub>L</sub>-CH3; (xi) V<sub>L</sub>-CH1-CH2; (xii) V<sub>L</sub>-CH1-CH2-CH3; (xiii) V<sub>L</sub>-CH2-CH3; y (xiv) V<sub>L</sub>-CL. En cualquier configuración de los dominios variables y constantes, incluyendo cualquiera de las configuraciones ilustrativas mencionadas anteriormente, los dominios variables y constantes pueden estar o bien directamente unidos entre sí o pueden estar unidos por una región de bisagra o un enlazador completo o parcial. Una región de bisagra puede constar de al menos 2 (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 o más) aminoácidos, lo que da como resultado una unión flexible o semiflexible entre la variable adyacente y/o los dominios constantes en una molécula de polipéptido individual. Por otra parte, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de la presente invención puede comprender un homo-dímero o hetero-dímero (u otro multímero) de cualquiera de las configuraciones de dominio variable y constante mencionadas anteriormente en asociación no covalente entre sí y/o con uno o más dominios de V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> monoméricos (por ejemplo, mediante un puente o puentes disulfuro).

Al igual que sucede con las moléculas de anticuerpos completas, los fragmentos de unión al antígeno pueden ser monoespecíficos o multispecíficos (por ejemplo, biespecíficos). Un fragmento de unión al antígeno multispecífico de un anticuerpo comprenderá normalmente al menos dos dominios variables diferentes, en el que cada dominio variable es capaz de unirse específicamente a un antígeno separado o a un epítipo diferente en el mismo antígeno. Cualquier formato de anticuerpos multispecíficos, incluyendo los formatos ilustrativos biespecíficos de anticuerpos divulgados en la presente memoria, pueden ser adaptados para su uso en el contexto de un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de la presente invención utilizando técnicas rutinarias disponibles en la técnica.

### Preparación de anticuerpos humanos

Los métodos para la generación de anticuerpos humanos en ratones transgénicos se conocen en la técnica. Cualquiera de estos métodos conocidos se puede utilizar para producir hacer anticuerpos humanos que se unen específicamente a PD-L1.

Un inmunógeno que comprende cualquiera de los siguientes puede usarse para generar anticuerpos contra PD-L1. Los anticuerpos se pueden obtener a partir de ratones inmunizados con un inmunógeno primario, tal como PD-L1 de longitud completa [Ver el número de acceso GenBank NP\_054862.1 (SEQ ID NO: 351)] o con una forma recombinante de PD-L1 o fragmentos de PD-L1 humano modificado (SEQ ID NOs: 345, 347 o 348) o con fragmentos de PD-L1 de *Cynomolgus* modificado (SEQ ID NO: 346), seguido de inmunización con un inmunógeno secundario, o con un fragmento inmunogénicamente activo de PD-L1.

El inmunógeno puede ser un péptido desde el extremo N terminal o el extremo terminal C de PD-L1. El inmunógeno puede ser el dominio similar a IgV y/o IgC extracelular de PD-L1. El inmunógeno puede ser un fragmento de PD-L1 que va desde aproximadamente los restos de aminoácidos 19-239 de la SEQ ID NO: 351 (NP\_054862.1).

El inmunógeno puede ser un péptido PD-L1 recombinante expresado en *E. coli* o en cualquier otras células eucariotas o de mamíferos tales como células de ovario de hámster chino (CHO).

En ciertos aspectos de la divulgación, los anticuerpos que se unen específicamente a PD-L1 se pueden preparar usando fragmentos de las regiones mencionadas anteriormente, o péptidos que se extienden más allá de las regiones designadas por aproximadamente 5 a aproximadamente 20 restos de aminoácidos de cualquiera, o ambos, de los extremos N o C terminal de las regiones descritas en la presente memoria. En ciertos aspectos de la divulgación, cualquier combinación de las regiones anteriormente descritas o fragmentos de las mismas puede ser utilizada en la preparación de anticuerpos específicos de PD-L1.

Utilizando la tecnología de VELOCIMMUNE® (véase, por ejemplo, el documento US-6.596.541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) o cualquier otro método conocido para la generación de anticuerpos monoclonales, se aíslan inicialmente anticuerpos quiméricos de alta afinidad de PD-L1 que tienen una región variable humana y una región constante de ratón. La tecnología VELOCIMMUNE® implica la generación de un ratón transgénico que tiene un genoma que comprende regiones variables de cadena pesada y ligera humanas unidas operativamente a los loci de la región constante endógena del ratón de tal forma que el ratón produce un anticuerpo que comprende una región variable humana y una región constante de ratón en respuesta al estímulo antigénico. El ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo se aísla y se une operativamente al ADN que codifica las regiones constantes de cadena pesada y ligera humanas. El ADN se expresa a continuación en un linfocito capaz de expresar el anticuerpo completamente humano.

### Bioequivalentes

Los anticuerpos anti-PD-L1 y fragmentos de anticuerpo de la presente divulgación abarcan proteínas que tienen secuencias de aminoácidos que varían de las de los anticuerpos descritos, pero que retienen la capacidad de unirse a PD-L1. Tales variantes de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos comprenden una o más adiciones, deleciones, o sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia original, pero exhiben actividad biológica que es esencialmente equivalente a la de los anticuerpos descritos. Igualmente, las secuencias de ADN que codifican el anticuerpo de la presente divulgación abarcan secuencias que comprenden una o más adiciones, deleciones, o

sustituciones de nucleótidos en comparación con la secuencia divulgada, pero que codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que es esencialmente bioequivalente a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención.

5 Dos proteínas de unión al antígeno o anticuerpos, se consideran bioequivalentes si, por ejemplo, son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas cuya tasa y grado de absorción no muestran una diferencia significativa cuando se administra en la misma dosis molar en condiciones experimentales similares, ya sea en dosis únicas o dosis múltiples. Algunos anticuerpos se considerarán equivalentes o alternativas farmacéuticas si son equivalentes en la medida de su absorción, pero no en su velocidad de absorción y, sin embargo pueden considerarse bioequivalentes porque tales diferencias en la tasa de absorción son intencionales y se reflejan en el etiquetado y no son esenciales para la consecución de las concentraciones eficaces del medicamento en el cuerpo, por ejemplo, el uso crónico, y se considera médicamente insignificante para el producto farmacéutico particular.

10 Dos proteínas de unión al antígeno pueden ser bioequivalentes si no existen diferencias clínicamente significativas en su seguridad, pureza, o potencia.

15 Dos proteínas de unión al antígeno pueden ser bioequivalentes si un paciente se puede cambiar una o más veces entre el producto de referencia y el producto biológico sin un aumento esperado en el riesgo de efectos adversos, incluyendo un cambio clínicamente significativo en la inmunogenicidad, o disminución de la eficacia, en comparación con el tratamiento continuado sin tal cambio.

Dos proteínas de unión al antígeno pueden ser bioequivalentes si ambas actúan por un mecanismo o mecanismos de acción comunes para la condición o condiciones de uso, en la medida en que se conozcan tales mecanismos.

25 La bioequivalencia se puede demostrar mediante métodos *in vivo* y/o *in vitro*. Las medidas de bioequivalencia incluyen, por ejemplo, (a) un ensayo *in vivo* en humanos u otros mamíferos, en el cual la concentración del anticuerpo o de sus metabolitos se mide en la sangre, plasma, suero, u otro fluido biológico como una función del tiempo; (b) un ensayo *in vitro* que se ha correlacionado con y es razonablemente predictiva de los datos de biodisponibilidad *in vivo* en seres humanos; (c) un ensayo *in vivo* en seres humanos u otros mamíferos en el cual que el efecto farmacológico agudo apropiado del anticuerpo (o su diana) se mide como una función del tiempo; y (d) en un ensayo clínico bien controlado que establece la seguridad, eficacia, o la biodisponibilidad o bioequivalencia de un anticuerpo.

35 Las variantes bioequivalentes de los anticuerpos de la invención pueden construirse, por ejemplo, haciendo diversas sustituciones de restos o secuencias o eliminando restos o secuencias terminales o internas no necesarias para la actividad biológica. Por ejemplo, los restos de cisteína que no son esenciales para la actividad biológica pueden ser eliminados o reemplazados con otros aminoácidos para evitar la formación de puentes disulfuro intramoleculares innecesarios o incorrectos tras la renaturalización. En otros contextos, los anticuerpos bioequivalentes pueden incluir variantes de anticuerpos que comprenden cambios de aminoácidos, que modifican las características de glicosilación de los anticuerpos, por ejemplo, mutaciones que eliminan o la glicosilación.

#### Anticuerpos anti-PD-L1 que comprenden variantes Fc

45 De acuerdo con ciertos aspectos de la divulgación, se proporcionan anticuerpos anti-PD-L1 que comprende un dominio de Fc que comprende una o más mutaciones que potencian o disminuyen la unión del anticuerpo al receptor FcRn, por ejemplo, a pH ácido, en comparación con el pH neutro. Por ejemplo, la presente divulgación incluye anticuerpos anti-PD-L1 que comprenden una mutación en la región C<sub>H</sub>2 o C<sub>H</sub>3 del dominio de Fc, en el que la mutación o mutaciones aumentan la afinidad del dominio de Fc por FcRn en un ambiente ácido (por ejemplo, en un endosoma donde el pH varía de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,0). Tales mutaciones pueden dar lugar a un aumento de la semivida sérica del anticuerpo cuando se administra a un animal. Los ejemplos no limitantes de tales modificaciones de Fc incluyen, por ejemplo, una modificación en la posición 250 (por ejemplo, E o Q); 250 y 428 (por ejemplo, L o F); 252 (por ejemplo, L/Y/F/W o T), 254 (por ejemplo, S o T), y 256 (por ejemplo, S/R/Q/E/D o T); o una modificación en la posición 428 y/o 433 (por ejemplo, H/L/R/S/P/Q o K) y/o 434 (por ejemplo, A, W, H, F o Y [N434A, N434W, N434H, N434F o N434Y]); o una modificación en la posición 250 y/o 428; o una modificación en la posición 307 o 308 (por ejemplo, 308F, V308F), y 434. En un aspecto, la modificación comprende una modificación 428L (por ejemplo, M428L) y 434S (por ejemplo, N434S); una modificación 428L, 2591 (por ejemplo, V2591) y 308F (por ejemplo, V308F); una modificación 433K (por ejemplo, H433K) y una modificación 434 (por ejemplo, 434Y); una modificación 252, 254, y 256 (por ejemplo, 252Y, 254T y 256E); una modificación 250Q y 428L (por ejemplo, T250Q y M428L); y una modificación 307 y/o 308 (por ejemplo, 308F o 308P). En otro aspecto más, la modificación comprende una modificación 265A (por ejemplo, D265A) y/o una modificación 297A (por ejemplo, N297A).

65 Por ejemplo, la presente divulgación incluye anticuerpos anti-PD-L1 que comprenden un dominio de Fc que comprende uno o más pares o grupos de mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: 250Q y 248L (por ejemplo, T250Q y M248L); 252Y, 254T y 256E (por ejemplo, M252Y, S254T y T256E); 428L y 434S (por ejemplo, M428L y N434S); 2571 y 3111 (por ejemplo, P2571 y Q3111); 2571 y 434H (por ejemplo, P2571 y N434H); 376V y



434H (por ejemplo, D376V y N434H); 307A, 380A y 434A (por ejemplo, T307A, E380A, y N434A); y 433K y 434F (por ejemplo, H433K y N434F). En un aspecto, la presente divulgación incluye anticuerpos anti-PD-L1 que comprenden un dominio de Fc que comprende una mutación S108P en la región bisagra de IgG4 para promover la estabilización del dímero. Se contemplan todas las posibles combinaciones de las anteriores mutaciones en el dominio de Fc, y otras mutaciones dentro de los dominios variables del anticuerpo divulgadas en la presente memoria.

La presente divulgación también incluye anticuerpos anti-PD-L1 que comprenden una región constante de cadena pesada (C<sub>H</sub>) quimérica, en la que la región C<sub>H</sub> quimérica comprende segmentos derivados de las regiones C<sub>H</sub> de más de un isotipo de inmunoglobulina. Por ejemplo, los anticuerpos de la divulgación pueden comprender una región C<sub>H</sub> quimérica que comprende parte o la totalidad de un dominio de C<sub>H</sub>2 derivado de una molécula de IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana, combinada en parte o la totalidad de un dominio de C<sub>H</sub>3 derivado de una molécula de IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana. De acuerdo con ciertos aspectos, los anticuerpos de la divulgación comprenden una región C<sub>H</sub> quimérica que tiene una región de bisagra quimérica. Por ejemplo, una bisagra quimérica puede comprender una secuencia de aminoácidos de "bisagra superior" (restos de aminoácidos de las posiciones 216 a 227 de acuerdo con la numeración UE) derivada de una región bisagra de IgG1 humana, una IgG2 humana o una IgG4 humana, combinada con una secuencia de "bisagra inferior" (restos de aminoácidos de las posiciones 228 a 236 de acuerdo con la numeración UE) derivada de una región bisagra de IgG1 humana, una IgG2 humana o una IgG4 humana. De acuerdo con ciertos aspectos, la región de bisagra quimérica comprende los restos de aminoácidos derivados de una bisagra superior de IgG1 humana o IgG4 humana y los restos de aminoácidos derivados de una bisagra inferior de IgG2 humana. Un anticuerpo que comprende una región C<sub>H</sub> quimérica como se describe en la presente memoria puede, en ciertas circunstancias, presentar funciones efectoras Fc modificadas sin afectar negativamente a las propiedades terapéuticas o farmacocinéticas del anticuerpo. (Véase, por ejemplo, el documento USSN. 14/170.166, presentado el 31 de enero de 2014).

#### Características biológicas de los anticuerpos

En general, los anticuerpos de la presente invención funcionan mediante la unión a PD-L1. La presente invención proporciona anticuerpos anti-PD-L1 y fragmentos de unión al antígeno como se define en las reivindicaciones de los mismos que unen moléculas monoméricas o dimericas de PD-L1 solubles con alta afinidad. Por ejemplo, la presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los anticuerpos que unen PD-L1 monomérico (por ejemplo, a 25 °C o a 37 °C) con una K<sub>D</sub> de menos de aproximadamente 318 pM medido por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, usando el formato de ensayo tal como se define en el ejemplo 3 de la presente memoria. En ciertos aspectos, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos unen PD-L1 monomérico con una K<sub>D</sub> de menos de aproximadamente 300 pM, menos de aproximadamente 250 pM, menos de aproximadamente 150 pM, menos de aproximadamente 100 pM, o menos de aproximadamente 50 pM, medido por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, usando el formato de ensayo tal como se define en el Ejemplo 3 de la presente memoria, o un ensayo sustancialmente similar.

La presente invención también proporciona anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que unen PD-L1 dimerico (por ejemplo, a 25 °C o a 37 °C) con una K<sub>D</sub> de menos de aproximadamente 15 pM medido por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, usando el formato de ensayo tal como se define en el Ejemplo 3 de la presente memoria. En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos unen PD-L1 dimerico con una K<sub>D</sub> de menos de aproximadamente 12 pM, menos de aproximadamente 10 pM, menos de aproximadamente 8 pM, o menos de aproximadamente 5 pM, medido por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, usando el formato de ensayo tal como se define en el Ejemplo 3 de la presente memoria, o un ensayo sustancialmente similar.

La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno como se define en las reivindicaciones de los mismos, que unen PD-L1 de *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) (por ejemplo, a 25 °C o a 37 °C) con una K<sub>D</sub> de menos de aproximadamente 28 nM, medido por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, usando el formato de ensayo tal como se define en el Ejemplo 3 de la presente memoria. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, unen PD-L1 de *Cynomolgus* con una K<sub>D</sub> de menos de aproximadamente 25 nM, menos de aproximadamente 20 nM, menos de aproximadamente 15 nM, menos de aproximadamente 10 nM, o menos de aproximadamente 5 nM, medido por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, usando el formato de ensayo tal como se define en el Ejemplo 3 de la presente memoria, o un ensayo sustancialmente similar.

La presente invención también proporciona anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno como se define en las reivindicaciones de los mismos, que unen PD-L1 con una semivida de disociación (t<sub>1/2</sub>) de más de aproximadamente 1 minuto como se mide por resonancia de plasmón superficial a 25 °C o 37 °C, por ejemplo, usando un formato de ensayo tal como se define en el Ejemplo 3 de la presente memoria, o un ensayo sustancialmente similar. En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la presente invención unen PD-L1 con una t<sub>1/2</sub> de más de aproximadamente 5 minutos, más de aproximadamente 10 minutos, más de aproximadamente 30 minutos, más de aproximadamente 50 minutos, más de aproximadamente 60 minutos, más de aproximadamente 70 minutos, más de aproximadamente 80 minutos, más de aproximadamente 90 minutos, más de aproximadamente 100

minutos, más de aproximadamente 200 minutos, más de aproximadamente 300 minutos, más de aproximadamente 400 minutos, más de aproximadamente 500 minutos, más de aproximadamente 600 minutos, más de aproximadamente 700 minutos, o más de aproximadamente 800 minutos, medido por resonancia de plasmón superficial a 25 °C o 37 °C, por ejemplo, usando un formato de ensayo tal como se define en el Ejemplo 3 de la presente memoria (por ejemplo, formato de captura de mAb o formato de captura de antígeno), o un ensayo sustancialmente similar.

La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que bloquean la unión de PD-L1 a PD-1 con una  $CI_{50}$  de menos de aproximadamente 770 pM determinada usando un ensayo de tipo inmunoensayo basado en ELISA, por ejemplo, como se muestra en el Ejemplo 4, o un ensayo sustancialmente similar. La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que bloquean la unión de PD-L1 a B7-1 con una  $CI_{50}$  de menos de aproximadamente 10 nM como se determina usando un ensayo de tipo inmunoensayo basado en ELISA, por ejemplo, como se muestra en el Ejemplo 4, o un ensayo sustancialmente similar. La presente divulgación también incluye anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que se unen aPD-L1 y potencian la unión de PD-L1 a PD-1 o B7-1.

Los anticuerpos de la presente divulgación pueden unirse al dominio extracelular de PD-L1 o a un fragmento del dominio. Los anticuerpos la pueden unirse a más de un dominio (anticuerpos de reacción cruzada). Los anticuerpos pueden unirse a un epítipo localizado en el dominio extracelular que comprende restos de aminoácidos 19-239 de NP\_054862.1 (SEQ ID NO: 351). Los anticuerpos pueden unirse a un epítipo que comprende uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en restos de aminoácidos 1-221 de las SEQ ID NOs: 345-348, o 353.

Los anticuerpos pueden funcionar mediante el bloqueo o la inhibición de la actividad de unión de PD-1 o de unión a B7-1 asociada con PD-L1 mediante la unión a cualquier otra región o fragmento de la proteína de longitud completa, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 351. Los anticuerpos pueden atenuar o modular la interacción entre PD-L1 y PD-1/B7-1.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos de la invención pueden unirse a un epítipo en un dominio y también se pueden unir a un segundo epítipo en un dominio diferente de PD-L1. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos de la invención pueden unirse a dos epítopos diferentes en el mismo dominio. En un aspecto, la molécula de unión al antígeno multiespecífica comprende una primera especificidad de unión al antígeno en la que la primera especificidad de unión comprende el dominio extracelular o fragmento del mismo de PD-1; y una segunda especificidad de unión al antígeno a otro epítipo de PD-L1. En otro aspecto, la molécula de unión al antígeno multiespecífica comprende una primera especificidad de unión al antígeno en la que la primera especificidad de unión comprende el dominio extracelular o fragmento del mismo de B7-1; y una segunda especificidad de unión al antígeno a otro epítipo de PD-L1.

En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal completamente humano o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a PD-L1, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo exhibe una o más de las siguientes características: (i) comprende una HCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 186, 202, 218, 234, 250, 258, 266, 274, 282, 290, 298, 306, 314, 322, 330 y 338, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia; (ii) comprende una LCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 194, 210, 226, 242, 258, y 274, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia; (iii) comprende un dominio de HCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 280, 288, 296, 304, 312, 320, 328, 336 y 344, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia; y un dominio de LCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 200, 216, 232, 248, 264, y 280, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia; (iv) comprende un dominio de HCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 292, 300, 308, 316, 324, 332, y 340, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia; un dominio de HCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 294, 302, 310, 318, 326, 334, y 342, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia; un dominio de LCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 196, 212, 228, 244, 260, y 276, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia; y un dominio de LCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94,

110, 126, 142, 158, 174, 198, 214, 230, 246, 262, y 278, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia; (v) es una molécula de unión al antígeno multiespecífica que comprende una primera especificidad de unión a PD-L1 y una segunda especificidad de unión a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en PD-L1, un antígeno específico de tumor, un antígeno de células infectadas por virus, y un co-inhibidor de linfocitos T; (vi) se une a PD-L1 humano con una  $K_D$  de aproximadamente 4 pM a aproximadamente 645 nM; (vii) se une a PD-L1 de Cynomolgus con una  $K_D$  de aproximadamente 70 pM a aproximadamente 400 nM; (viii) bloquea o potencia la unión de PD-L1 a PD-1 con una  $CI_{50} \leq 770$  pM; (ix) bloquea o potencia la unión de PD-L1 a B7-1 con una  $CI_{50} \leq 10$  nM; (x) bloquea la regulación a la baja de linfocitos T inducida por PD-1 y/o rescata la señalización de los linfocitos T en un ensayo de indicador de luciferasa de linfocitos T/APC; (xi) estimula la proliferación de linfocitos T y la actividad en un ensayo de reacción mixta de linfocitos (MLR); (xii) induce la producción de IL-2 y/o IFN $\gamma$  en un ensayo de MLR; y (xiii) suprime el crecimiento tumoral y aumenta la supervivencia en pacientes con cáncer.

En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal totalmente humano o fragmento de unión al antígeno del mismo que bloquea la unión de PD-L1 a PD-1 o a B7-1, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo presenta una o más de las siguientes características: (i) comprende una HCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 82, 98, 146, 162, 290, 306, 314, y 330, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia; (ii) comprende una LCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 90, 106, 154, 170, y 274, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia; (iii) comprende un dominio de HCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 88, 104, 152, 168, 296, 312, 320, y 336, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia; y un dominio de LCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 96, 112, 160, 176, y 280, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia; (iv) comprende un dominio de HCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 84, 100, 148, 164, 292, 308, 316, y 332, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia; un dominio de HCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 86, 102, 150, 166, 294, 310, 318, y 334, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia; un dominio de LCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 92, 108, 156, 172, y 276, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia; y un dominio de LCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 94, 110, 158, 174, y 278, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia; (v) es una molécula de unión al antígeno multiespecífica que comprende una primera especificidad de unión a PD-L1 y una segunda especificidad de unión a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en un epítipo diferente de PD-L1, un antígeno específico de tumor, un antígeno de células infectadas por virus, y un co-inhibidor de los linfocitos T; (vi) se une a PD-L1 humano con una  $K_D \leq 10^{-10}$ M; (vii) se une a un PD-L1 de Cynomolgus con una  $K_D \leq 10^{-7}$ M; (viii) bloquea la unión de PD-L1 a PD-1 o a B7-1; (ix) bloquea la regulación a la baja de los linfocitos T inducida por PD-1 y/o rescata la señalización de los linfocitos T en un ensayo de indicador de luciferasa de linfocitos T/APC; (xi) estimula la proliferación de linfocitos T y la actividad en un ensayo de reacción mixta de linfocitos (MLR); (xii) induce la producción de IL-2 y/o IFN $\gamma$  en un ensayo de MLR; y (xiii) suprime el crecimiento tumoral y aumenta la supervivencia en pacientes con cáncer.

Los anticuerpos de la presente divulgación pueden poseer una o más de las características biológicas antes mencionadas, o cualquier combinación de las mismas. Otras características biológicas de los anticuerpos de la presente invención serán evidentes para una persona de experiencia ordinaria en la materia a partir de una revisión de la presente divulgación, incluyendo los ejemplos de trabajo de este documento.

#### Selectividad de especies y reactividad cruzada de especies

De acuerdo con ciertos aspectos de la divulgación, los anticuerpos anti-PD-L1 se unen a PD-L1 humano pero no a PD-L1 de otras especies. Los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención se unen a PD-L1 humano y a PD-L1 de una o más especies no humanas. Por ejemplo, los anticuerpos anti-PD-L1 de la divulgación pueden unirse a PD-L1 humano y pueden unirse o no unirse, depende del caso, a uno o más de PD-L1 de ratón, rata, cobaya, hámster, jerbo, cerdo, gato, perro, conejo, cabra, oveja, vaca, caballo, camello, Cynomolgus, tití, monos rhesus o chimpancé. En ciertos aspectos, los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden unirse a PD-L1 humano y de Cynomolgus con las mismas afinidades o con diferentes afinidades.

#### Mapeo de epítopos y tecnologías relacionadas

La presente divulgación incluye anticuerpos anti-PD-L1 que interactúan con uno o más aminoácidos que se encuentran dentro de uno o más dominios de la molécula de PD-L1, incluyendo, por ejemplo, el dominio extracelular

(similar a IgV), el dominio extracelular similar a IgC, un dominio transmembrana, y un dominio intracelular. El epítipo al que los anticuerpos se unen puede consistir en una única secuencia contigua de 3 o más (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más) aminoácidos localizados dentro de cualquiera de los dominios mencionados anteriormente de la molécula de PD-L1 (por ejemplo, un epítipo lineal en un dominio). Como alternativa, el epítipo puede consistir en una pluralidad de aminoácidos no contiguos (o secuencias de aminoácidos) situados dentro de uno o ambos de los dominios mencionados anteriormente de la molécula de PD-L1 (por ejemplo, un epítipo conformacional).

Se pueden usar varias técnicas conocidas por los expertos en la materia para determinar si un anticuerpo "interactúa con uno o más aminoácidos" dentro de un polipéptido o proteína. Ejemplos de técnicas incluyen, por ejemplo, ensayos de bloqueo cruzado de rutina, tales como los descritos en *Antibodies*, Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Otros métodos incluyen el análisis de detección de mutaciones de alanina, el análisis de transferencia por absorción de péptidos (Reineke (2004) *Methods Mol Biol* 248: 443-63), estudios cristalográficos de análisis de escisión de péptidos y análisis de RMN. Además, se pueden emplear métodos, tales como la escisión de epítipos, la extracción de epítipos y la modificación química de los antígenos (Tomer (2000) *Prot Sci* 9: 487-496). Otro método que se puede utilizar para identificar los aminoácidos dentro de un polipéptido con el que interactúa un anticuerpo es el intercambio de hidrógeno/deuterio detectado por espectrometría de masas. En términos generales, el método de intercambio de hidrógeno/deuterio implica el marcaje con deuterio de la proteína de interés, seguido por la unión del anticuerpo a la proteína marcada con deuterio. A continuación, el complejo de proteína/anticuerpo se transfiere al agua y los protones intercambiables dentro de los aminoácidos que están protegidos por el complejo de anticuerpo sufren de nuevo un intercambio de deuterio a hidrógeno a una velocidad más lenta que los protones intercambiables dentro de los aminoácidos que no forman parte de la interfaz. Como resultado, los aminoácidos que forman parte de la interfaz de la proteína/anticuerpo pueden retener deuterio y por lo tanto exhiben una masa relativamente mayor en comparación con los aminoácidos no incluidos en la interfaz. Después de la disociación del anticuerpo, la proteína diana se somete a la escisión por proteasas y análisis de espectrometría de masas, revelando de esta forma los restos marcados con deuterio que corresponden a los aminoácidos específicos con los que interactúa el anticuerpo. Véase, por ejemplo, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267: 252-259; Engen y Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

El término "epítipo" se refiere a un sitio en un antígeno al cual responden los linfocitos B y/o linfocitos T. Los epítipos de linfocitos B pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos normalmente se conservan con la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario normalmente se pierden tras el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo incluye normalmente al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 o 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.

Creación de perfiles asistido por modificación (MAP), también conocido como creación de perfiles de anticuerpos basados en la estructura del antígeno (ASAP) es un método que clasifica un gran número de anticuerpos monoclonales (mAb) dirigidos contra el mismo antígeno de acuerdo con las similitudes del perfil de unión de cada anticuerpo a las superficies del antígeno modificadas químicamente o enzimáticamente (véase el documento US 2004/0101920). Cada categoría puede reflejar un único epítipo claramente diferente de o superpuesto parcialmente con el epítipo representado por otra categoría. Esta tecnología permite la filtración rápida de anticuerpos genéticamente idénticos, de tal manera que dicha caracterización se pueda centrar en anticuerpos genéticamente distintos. Cuando se aplica a la detección de hibridoma, el MAP puede facilitar la identificación de clones de hibridoma raros que producen mAbs que tienen las características deseadas. El MAP puede ser usado para ordenar los anticuerpos de la invención en grupos de anticuerpos que unen diferentes epítipos.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-L1 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos se unen a un epítipo dentro de uno o más de cualquiera de las regiones ilustradas en PD-L1, ya sea en forma natural, como se ilustra en la SEQ ID NO: 351 o producidas recombinantemente, como se ilustra en las SEQ ID NOS: 345-348, o a un fragmento de la misma. En algunos aspectos, los anticuerpos se unen a una región extracelular que comprende uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los restos de aminoácidos 19-239 de PD-L1. En algunos aspectos, los anticuerpos se unen a una región que comprende uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los restos de aminoácidos 1-221 de PD-L1 de *Cynomolgus*, como se ilustra por la SEQ ID NO: 346.

En ciertos aspectos, los anticuerpos, como se muestra en la Tabla 1, interactúan con al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en restos de aminoácidos que van de aproximadamente la posición 19 a aproximadamente la posición 130 de la SEQ ID NO: 351; o restos de aminoácidos que van de aproximadamente la posición 130 a aproximadamente la posición 153 de la SEQ ID NO: 351; o restos de aminoácidos que van de aproximadamente la posición 153 a aproximadamente la posición 210 de la SEQ ID NO: 351; o a restos de aminoácidos que van de aproximadamente la posición 210 a aproximadamente la posición 239 de la SEQ ID NO: 351. Estas regiones se ilustran parcialmente en las SEQ ID NOS: 345-348.

La presente divulgación incluye anticuerpos anti-PD-L1 que se unen al mismo epítipo, o una porción del epítipo,

como cualquiera de los anticuerpos ilustrativos específicos descritos en la presente memoria en la Tabla 1, o un anticuerpo que tiene las secuencias de CDR de cualquiera de los anticuerpos ilustrativos descritos en la Tabla 1. Asimismo, la presente divulgación también incluye anticuerpos anti-PD-L1 que compiten por la unión a PD-L1 o a un fragmento de PD-L1 con cualquiera de los anticuerpos ilustrativos específicos descritos en la presente memoria en la Tabla 1, o un anticuerpo que tiene las secuencias de CDR de cualquiera de los anticuerpos ilustrativos descritos en la Tabla 1. Por ejemplo, la presente divulgación incluye anticuerpos anti-PD-L1 que compiten de forma cruzada por la unión a PD-L1 con uno o más anticuerpos como se define en el Ejemplo 6 de la presente memoria (por ejemplo, H2aM8309N, H1H9329P, H1H9336P, H2aM8314N, H2aM8316N, H2aM8718N, H1H9387P2, H1H9351P2, H1H9364P2, H1H9373P2 y H2aM8306N). La presente divulgación también incluye anticuerpos anti-PD-L1 que compiten de forma cruzada por la unión a PD-L1 con uno o más anticuerpos como se define en el Ejemplo 6 de la presente memoria (por ejemplo, H1H9396P2, H2aM8317N, H2aM8321N, H1H9323P, H1H9382P2, H1H9344P2, H1H9345P2 and H1H9354P2).

Se puede determinar fácilmente si un anticuerpo se une al mismo epítipo que, o compite por la unión con, un anticuerpo anti-PD-L1 de referencia usando métodos de rutina conocidos en la técnica. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo de prueba se une al mismo epítipo que el anticuerpo anti-PD-L1 de referencia de la invención, se deja que el anticuerpo de referencia se una a una proteína PD-L1 o péptido en condiciones de saturación. A continuación, se evalúa la capacidad de un anticuerpo de prueba para unirse a la molécula de PD-L1. Si el anticuerpo de prueba es capaz de unirse a PD-L1 después de la unión de saturación con el anticuerpo anti-PD-L1 de referencia, se puede concluir que el anticuerpo de ensayo se une a un epítipo diferente que el anticuerpo anti-PD-L1 de referencia. Por otro lado, si el anticuerpo de prueba no es capaz de unirse a la proteína PD-L1 tras la unión de saturación con el anticuerpo anti-PD-L1 de referencia, entonces el anticuerpo de prueba puede unirse al mismo epítipo que el epítipo unido por el anticuerpo anti-PD-L1 de referencia de la invención.

Para determinar si un anticuerpo compite por la unión con un anticuerpo anti-PD-L1 de referencia, la metodología de unión anteriormente descrita se lleva a cabo en dos orientaciones: En una primera orientación, se deja que el anticuerpo de referencia se una a una proteína PD-L1 en condiciones de saturación, seguido por la evaluación de la unión del anticuerpo de prueba a la molécula de PD-L1. En una segunda orientación, se deja que el anticuerpo de prueba se una a una molécula de PD-L1 en condiciones de saturación, seguido por la evaluación de la unión del anticuerpo de referencia a la molécula de PD-L1. Si, en ambas orientaciones, solo el primer anticuerpo (de saturación) es capaz de unirse a la molécula de PD-L1, entonces se concluye que el anticuerpo de prueba y el anticuerpo de referencia compiten por la unión a PD-L1. Como se apreciará por un experto en la materia, un anticuerpo que compite por la unión con un anticuerpo de referencia no necesariamente se une al epítipo idéntico como el anticuerpo de referencia, pero estéricamente puede bloquear la unión del anticuerpo de referencia mediante la unión a un epítipo de solapamiento o adyacente.

Dos anticuerpos se unen al mismo epítipo o epítipo superpuesto si cada uno inhibe competitivamente (bloquea) la unión del otro al antígeno. Es decir, 1, 5, 10, 20 o 100 veces en exceso de un anticuerpo inhibe la unión del otro en al menos un 50 %, pero preferiblemente 75 %, 90 % o incluso 99 % según se mide en un ensayo de unión competitiva (véase, por ejemplo, Junghans et al., Cancer Res. 1990 50:1495-1502). Como alternativa, dos anticuerpos tienen el mismo epítipo si esencialmente todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo, reducen o eliminan la unión del otro. Dos anticuerpos tienen epítopos superpuestos si algunas mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo, reducen o eliminan la unión del otro.

A continuación, puede llevarse a cabo la experimentación de rutina adicional (por ejemplo, mutación de péptidos y análisis de unión) para confirmar si la falta de unión observada del anticuerpo de prueba es, de hecho, debido a la unión al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia o si el bloqueo estérico (u otro fenómeno) es responsable de la falta de unión observada. Los experimentos de este tipo se pueden realizar utilizando ELISA, RIA, resonancia de plasmón superficial, citometría de flujo o cualquier otro ensayo cuantitativo o cualitativo de unión a anticuerpos disponibles en la técnica.

### **Inmunoconjugados**

La divulgación abarca un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 humano con un resto terapéutico ("inmunoconjugado"), tal como una citotoxina o un agente quimioterapéutico para tratar el cáncer. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "inmunoconjugado" se refiere a un anticuerpo que esta química o biológicamente unido a una citotoxina, un agente radioactivo, una citocina, un interferón, un resto diana o indicador, una enzima, una toxina, un péptido o proteína o un agente terapéutico. El anticuerpo puede estar unido a la citotoxina, agente radiactivo, citocina, interferón, resto diana o indicador, enzima, toxina, péptido o agente terapéutico en cualquier localización a lo largo de la molécula con tal de que sea capaz de unirse a su diana. Los ejemplos de inmunoconjugados incluyen conjugados de anticuerpo-fármaco y anticuerpo-proteínas de fusión de toxina. El agente puede ser un segundo anticuerpo diferente a PD-L1. El anticuerpo se puede conjugar con un agente específico de un linfocito tumoral o un linfocito infectado por virus. El tipo de resto terapéutico que se puede conjugar con el anticuerpo anti-PD-L1 tendrá en cuenta la condición a tratar y el efecto terapéutico deseado a alcanzar. Ejemplos de agentes adecuados para la formación de inmunoconjugados son conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, el documento WO 05/103081.

**Anticuerpos multiespecíficos**

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser monoespecíficos, biespecíficos, o multiespecíficos. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopos de un polipéptido diana o pueden contener dominios de unión al antígeno específicos para más de un polipéptido diana. Véase, por ejemplo, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244.

En un aspecto, la presente divulgación incluye moléculas de unión al antígeno multiespecíficas o fragmentos de unión al antígeno de las mismas en las que una especificidad de unión al antígeno de una inmunoglobulina es específica de un epítipo dentro del dominio extracelular de PD-L1 (por ejemplo, en la región similar a IgV), o un fragmento de la misma, y la otra especificidad de unión al antígeno de la inmunoglobulina es específica de la unión a un epítipo diferente en el dominio extracelular de PD-L1 (por ejemplo, en la región similar a IgC), o una segunda diana terapéutica, o se conjuga con un resto terapéutico. En ciertos aspectos, la primera especificidad de unión al antígeno puede comprender PD-1 o B7-1 o un fragmento del mismo. En un aspecto, la primera especificidad de unión al antígeno que se une a PD-L1 comprende el dominio extracelular de PD-1. En ciertos aspectos de la invención, una especificidad de unión al antígeno de una inmunoglobulina es específica de un epítipo dentro de los restos de aminoácidos 19-239 de PD-L1 (SEQ ID NO: 351) o un fragmento de la misma, y la otra especificidad de la inmunoglobulina es específica de un segundo antígeno diana. El segundo antígeno diana puede estar en la misma célula que PD-L1 o en un linfocito diferente. En un aspecto, la segunda célula diana está en una célula inmunitaria diferente a un linfocito T, tal como un linfocito B, célula presentadora de antígeno, monocitos, macrófagos o células dendríticas. En algunas realizaciones, el segundo antígeno diana puede estar presente en una célula tumoral o en un linfocito infectado por virus.

En otro aspecto, la divulgación proporciona moléculas de unión al antígeno multiespecíficas o fragmentos de unión al antígeno de las mismas que comprenden una primera especificidad de unión al antígeno que se une a PD-L1 y una segunda especificidad de unión al antígeno que se une específicamente a un antígeno diana en una célula tumoral. En diversos

aspectos, el antígeno específico de tumor es uno de los antígenos CA9, CA125, antígeno asociado a melanoma (MAGE), antígeno carcinoembrionario (CEA), vimentina, tumor-M2-PK, antígeno específico de la próstata (PSA), MART-1, o CA 19-9. Los ejemplos no limitantes de otros antígenos asociados a tumores específicos incluyen, por ejemplo, AFP, ALK, proteínas BAGE,  $\beta$ -catenina, bcr-abl, BRCA1, BORIS, anhidrasa carbónica IX, caspasa-8, CCR5, CD19, CD20, CD30, CD40, CDK4, CTLA4, ciclina B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EpCAM, EphA2, Fra-1, FOLR1, proteínas GAGE (por ejemplo, GAGE-1,-2), GD2, GD3, GloboH, glipicano-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-Raf, HLA/K-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, LMP2, proteínas MAGE (por ejemplo, MAGE-1, -2, -3, -4, -6 y -12), HLA-A2, MART-1, mesotelina, ML-IAP, Muc1, Muc2, MuC3, Muc4, Muc5, Muc16 (CA-125), MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA (FOLH1), proteínas RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, survivina, TAG-72, TGF- $\beta$ , TMPRSS2, Tn, TRP-1, TRP-2, tirosinasa, y uroplaquina-3. En otros aspectos, la segunda especificidad de unión al antígeno se une a un antígeno de tumor que está presente en las células tumorales específicas de, pero sin limitarse a, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, melanoma, cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de ovario, y cáncer de páncreas. Los anticuerpos de la divulgación, en este aspecto, pueden inhibir la actividad de PD-L1.

En otro aspecto, la divulgación proporciona moléculas de unión al antígeno multiespecíficas o fragmentos de unión al antígeno de las mismas en las que la segunda especificidad de unión al antígeno se une a un antígeno específico de un linfocito infectado por virus. En ciertos aspectos, la segunda especificidad de unión al antígeno se une a un antígeno específico de un linfocito infectado por un virus seleccionado del grupo que consiste en VIH, VHB, VHC, VPH, VCML y VIS.

En otro aspecto, la divulgación proporciona moléculas de unión al antígeno multiespecíficas o fragmentos de unión al antígeno de las mismas que comprenden una primera especificidad de unión al antígeno que se une a PD-L1 y una segunda especificidad de unión al antígeno que se une a un co-inhibidor de linfocitos T tales como PD-1, LAG-3, TIM3, B7-1, CTLA-4, BTLA, CD-28, 2B4, LY108, TIGIT, LAIR1, ICOS y CD160.

Cualquiera de las moléculas de unión al antígeno multiespecíficas, o variantes de las mismas, pueden construirse usando técnicas de biología molecular convencionales (por ejemplo, tecnología de ADN recombinante y expresión de proteínas) como es bien conocido por una persona de experiencia ordinaria en la materia.

En algunas realizaciones, los anticuerpos específicos de PD-L1 se generan en un formato biespecífico (un "biespecífico") en el cual las regiones variables que se unen a dominios distintos de PD-L1 están unidas entre sí para conferir especificidad de doble dominio dentro de una sola molécula de unión. Los biespecíficos diseñados adecuadamente pueden mejorar la eficacia global inhibitoria de PD-L1 al aumentar tanto la especificidad como la avidéz de la unión. Las regiones variables con especificidad para los dominios individuales, (por ejemplo, los segmentos del dominio N-terminal), o que pueden unirse a diferentes regiones dentro de un dominio, se combinan en un andamio estructural que permite que cada región se una simultáneamente a los epítopos separados, o a diferentes regiones dentro de un dominio. En un ejemplo de un biespecífico, las regiones variables de la cadena

5 pesada ( $V_H$ ) de un enlazador con especificidad para un dominio, se recombinan con las regiones variables de la cadena ligera ( $V_L$ ) de una serie de enlazadores con especificidad para que un segundo dominio identifique compañeros  $V_L$  no afines que se pueden combinar con una  $V_H$  original sin alterar la especificidad original para esa  $V_H$ . De esta manera, un solo segmento  $V_L$  (por ejemplo,  $V_{L1}$ ) se puede combinar con dos dominios  $V_H$  diferentes (por ejemplo,  $V_{H1}$  y  $V_{H2}$ ) para generar un biespecífico que comprende dos “brazos” de unión ( $V_{H1}$ - $V_{L1}$  y  $V_{H2}$ - $V_{L1}$ ). El uso de un segmento  $V_L$  solo reduce la complejidad del sistema y por lo tanto simplifica y aumenta la eficiencia en la clonación, expresión, y procesos de purificación utilizados para generar el biespecífico (Véase, por ejemplo, los documentos USSN 13/022759 y US2010/0331527).

10 Como alternativa, los anticuerpos que unen más de un dominio y una segunda diana, tales como, pero sin limitarse a, por ejemplo, un segundo anticuerpo anti-PD-L1 diferente, se pueden preparar en un formato biespecífico utilizando las técnicas descritas en la presente memoria, u otras técnicas conocidas por los expertos en la materia. Las regiones variables de anticuerpo que se unen a regiones distintas pueden unirse entre sí con las regiones variables que se unen a sitios relevantes en, por ejemplo, el dominio extracelular de PD-L1, para conferir  
15 especificidad de doble antígeno en una única molécula de unión. Los biespecíficos diseñados adecuadamente de esta naturaleza tienen doble función. Las regiones variables con especificidad para el dominio extracelular se combinan con una región variable con especificidad fuera del dominio extracelular y se emparejan en un andamio estructural que permite que cada región variable se una a los diferentes antígenos.

20 Un formato de anticuerpo biespecífico ilustrativo que se puede utilizar en el contexto de la presente invención implica el uso de un primer dominio de inmunoglobulina (Ig)  $C_{H3}$  y un segundo dominio Ig  $C_{H3}$ , en el que el primer y segundo dominios Ig  $C_{H3}$  difieren entre sí en al menos un aminoácido, y en el que al menos una diferencia de un aminoácido reduce la unión del anticuerpo biespecífico a la proteína A en comparación con un anticuerpo biespecífico que carece de la diferencia de un aminoácido. En un aspecto, el primer dominio Ig  $C_{H3}$  se une a la  
25 proteína A y el segundo dominio Ig  $C_{H3}$  contiene una mutación que reduce o suprime la unión de la proteína A tal como una modificación H95R (por numeración de exón IMGT; H435R por numeración de la UE). El segundo  $C_{H3}$  puede comprender además una modificación Y96F (por IMGT; Y436F por la UE). Otras modificaciones que se pueden encontrar dentro del segundo  $C_{H3}$  incluyen: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, y V82I (por IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M y V422I por la UE) en el caso de los anticuerpos IgG1; N44S, K52N, y V82I (IMGT; N384S, K392N, y V422I por la UE) en el caso de los anticuerpos IgG2; y Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, y V82I (por IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, y V422I por la UE) en el caso de los anticuerpos IgG4. Se contemplan las variaciones en el formato de anticuerpo biespecífico descrito anteriormente.

35 Otros formatos biespecíficos ilustrativos que se pueden utilizar en el contexto de la presente invención incluyen, sin limitación, por ejemplo, formatos biespecíficos basados en scFv o diacuerpo, fusiones de IgG-scFv, dominio variable doble (DVD)-Ig, cuadroma, botón en ojal (*knobs-into-holes*), cadena ligera común (por ejemplo, la cadena ligera común con botón en ojal, etc.), CrossMab, CrossFab, cuerpo (SEED), cremallera de leucina, DuoBody, IgG1/IgG2, Fab de doble efecto (DAF)-IgG, y formatos biespecíficos de Mab<sup>2</sup> (véase, por ejemplo, Klein et al., 2012, mAbs. 4: 6, 1-11, y las referencias citadas en el mismo, para una revisión de los formatos anteriores). Los anticuerpos  
40 biespecíficos también se pueden construir usando una conjugación de péptido/ácido nucleico, por ejemplo, en el que los aminoácidos no naturales con reactividad química ortogonal se utilizan para generar conjugados de anticuerpo-oligonucleótido específicos del sitio que seguidamente se autoensamblan en complejos multiméricos con composición, valencia y geometría definidas. (Véase, por ejemplo, Kazane et al., J. Am Chem. Soc. [*Epub*: 4 de diciembre de 2012]).

#### 45 **Administración terapéutica y formulaciones**

En una realización, la invención proporciona composiciones terapéuticas que comprenden los anticuerpos anti-PD-L1 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la presente invención. Las composiciones terapéuticas de acuerdo con la invención se administrarán con vehículos adecuados, excipientes, y otros agentes que se incorporan en formulaciones para proporcionar una mejor transferencia, administración, tolerancia, y similares. Una multitud de formulaciones apropiadas se pueden encontrar en el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos: Remington Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, ungüentos, jaleas, ceras, aceites, lípidos, lípidos (aniónicos o catiónicos) que contienen vesículas (tales como LIPOFECTIN™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite-en-agua y agua-en-aceite, emulsiones carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos, y mezclas semisólidas que contienen Carbowax. Ver también Powell et al., “Compendium of excipients for parenteral formulations” PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

60 La dosis de anticuerpo puede variar dependiendo de la edad y el tamaño del sujeto al que se va a administrar, la enfermedad diana, las afecciones, la vía de administración, y similares. Cuando se utiliza un anticuerpo de la presente invención para tratar una enfermedad o trastorno en un paciente adulto, o para la prevención de una enfermedad tal, es ventajoso administrar el anticuerpo de la presente invención normalmente a una dosis única de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 80, de aproximadamente 10 a aproximadamente 60, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. Dependiendo de la gravedad de la afección, se pueden ajustar la  
65

frecuencia y la duración del tratamiento. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención se puede administrar como una dosis inicial de al menos aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 800 mg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 5 a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 mg, a aproximadamente 100 mg, o hasta aproximadamente 50 mg.

La dosis inicial puede ir acompañada de la administración de una segunda o una pluralidad de dosis posteriores del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo en una cantidad que puede ser aproximadamente la misma o menor que la de la dosis inicial, en la que las dosis posteriores están separadas por al menos de 1 día a 3 días; al menos una semana, al menos 2 semanas; al menos 3 semanas; al menos 4 semanas; al menos 5 semanas; al menos 6 semanas; al menos 7 semanas; al menos 8 semanas; al menos 9 semanas; al menos 10 semanas; al menos 12 semanas; o al menos 14 semanas.

Se conocen varios sistemas de administración que se pueden usar para administrar la composición farmacéutica de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar los virus mutantes, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu et al., (1987) J. Biol Chem 262: 4429-4432) . Los métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a, vía intradérmica, transdérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. La composición se puede administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión o inyección en bolo, por 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. La composición farmacéutica puede también administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase, por ejemplo, Langer (1990) Science 249: 1527-1533).

El uso de nanopartículas para administrar los anticuerpos de la presente invención también se contempla en la presente memoria. Las nanopartículas conjugadas con anticuerpo se pueden usar tanto para aplicaciones terapéuticas como de diagnóstico. Las nanopartículas conjugadas con anticuerpo y los métodos de preparación y uso se describen en detalle por Arruebo, M., et al., 2009 ("Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications" en J. Nanomat Volumen 2009, Número de artículo 439389, 24 páginas, doi: 10.1155/2009/439389. Las nanopartículas pueden ser desarrolladas y conjugadas con anticuerpos contenidos en las composiciones farmacéuticas para dirigir los células tumorales o las células de tejido autoinmunitarias o células infectadas por virus. Las nanopartículas para la administración de fármacos también se han descrito en, por ejemplo, los documentos US 8.257.740 o US 8.246.995.

En ciertas situaciones, la composición farmacéutica se puede administrar en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede utilizar una bomba. En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos. En otra realización más, un sistema de liberación controlada puede ser colocado en la proximidad de la composición diana, por lo que requiere solo una fracción de la dosis sistémica.

Las preparaciones inyectables pueden incluir formas farmacéuticas para inyección intravenosa, subcutánea, intracutánea, intracraneal, intraperitoneal e intramuscular, infusiones de goteo, etc. Estas preparaciones inyectables se pueden preparar por métodos conocidos públicamente. Por ejemplo, las preparaciones inyectables se pueden preparar disolviendo, suspendiendo o emulsionando el anticuerpo o su sal, descrita anteriormente, en un medio acuoso estéril o un medio oleoso convencionalmente utilizado para inyecciones. Con respecto al medio acuoso para inyección, existe, por ejemplo, solución salina fisiológica, una solución isotónica que contiene glucosa y otros agentes auxiliares, etc., que pueden ser utilizados en combinación con un agente solubilizante adecuado tal como un alcohol (por ejemplo, etanol), un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), un tensioactivo no iónico [por ejemplo, polisorbato 80, aducto HCO-50 (polioxitileno (50 mol) de aceite de ricino hidrogenado)], etc. Como medio oleoso, se emplean, por ejemplo, aceite de sésamo, aceite de soja, etc., que puede ser utilizado en combinación con un agente solubilizante tal como benzoato de bencilo, alcohol bencílico, etc. La inyección preparada de esta manera se llena preferiblemente en una ampolla adecuada.

Una composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por vía subcutánea o por vía intravenosa con una aguja y una jeringa estándar. Además, con respecto a la administración subcutánea, se puede utilizar un dispositivo de administración de pluma para la administración de una composición farmacéutica de la presente invención. Tal dispositivo de administración de pluma puede ser reutilizable o desechable. Un dispositivo de administración de pluma reutilizable generalmente utiliza un cartucho reemplazable que contiene una composición farmacéutica. Una vez que toda la composición farmacéutica dentro del cartucho ha sido administrada y el cartucho está vacío, el cartucho vacío puede ser fácilmente desechado y sustituido por un nuevo cartucho que contiene la composición farmacéutica. El dispositivo de administración de pluma se puede volver a utilizar. En un dispositivo de administración de pluma desechable, no hay cartucho reemplazable, sino que el dispositivo de administración de pluma desechable viene precargado con la composición farmacéutica en un depósito dentro del dispositivo. Una vez que el depósito se vacía de la composición farmacéutica, todo el dispositivo se desecha.

Se pueden usar numerosos dispositivos de administración de tipo pluma y autoinyector reutilizables en la administración subcutánea de una composición farmacéutica de la presente invención. Los ejemplos incluyen, pero sin duda no se limitan a AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, Reino Unido), pluma DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Suiza), pluma HUMALOG MIX 75/25™, pluma HUMALOG™, pluma



HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II y III (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), pluma BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, y OPTICLIK™ (Sanofi- Aventis, Frankfurt, Alemania), por citar solo unos pocos. Ejemplos de dispositivos de administración de pluma desechables que se pueden utilizar en la administración subcutánea de una composición farmacéutica de la presente invención incluyen, pero ciertamente no se limitan a pluma SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk), y KWIKPEN™ (Eli Lilly), autoinyector SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Alemania), EPIPEN (Dey, LP) y la pluma HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, IL), por citar solo unos pocos.

Ventajosamente, las composiciones farmacéuticas para uso oral o parenteral descritas anteriormente se preparan en formas farmacéuticas en una dosis unitaria adecuada para adaptarse a una dosis de los principios activos. Tales formas farmacéuticas en una dosis unitaria incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampollas), supositorios, etc. La cantidad de anticuerpo contenida es generalmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 mg por dosificación en una dosis unitaria; especialmente en forma de inyección, se prefiere que el anticuerpo esté presente en aproximadamente 5 a aproximadamente 100 mg y en aproximadamente 10 a aproximadamente 250 mg para las otras formas de dosificación.

### Usos terapéuticos de los anticuerpos

Los anticuerpos de la presente divulgación son útiles para el tratamiento, la prevención, y/o mejora de la enfermedad o trastorno o afección como el cáncer, enfermedad autoinmunitaria o una infección viral y/o para mejorar al menos un síntoma asociado con dicha enfermedad, trastorno o afección. En algunas realizaciones de la invención, los anticuerpos descritos en la presente memoria son útiles para tratar sujetos que sufren cáncer primario o recurrente, incluyendo, por ejemplo, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de riñón, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de mama, de cabeza y cuello, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de cerebro, mieloma múltiple y melanoma. Los anticuerpos se pueden usar para tratar síntomas de las etapas tempranas o tardías del cáncer. En una realización, un anticuerpo o fragmento del mismo de la invención puede ser utilizado para tratar el cáncer metastásico. Los anticuerpos son útiles en la reducción o la inhibición o disminución del crecimiento tumoral de los tumores sólidos y neoplasias sanguíneas. En ciertas realizaciones, los anticuerpos se pueden usar para prevenir la recaída de un tumor. En ciertas realizaciones, el tratamiento con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención puede conducir a más de 50 % de regresión, más de 60 % de regresión, más de 70 % de regresión, más de 80 % de regresión o más de 90 % de regresión de un tumor en un sujeto. En ciertas realizaciones, los anticuerpos se pueden usar para aumentar la supervivencia de un sujeto que sufre cáncer.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención son útiles para tratar sujetos que sufren una infección viral crónica. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención son útiles en la reducción de los títulos virales en el hospedador y/o el rescate de los linfocitos T agotados. En una realización, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención puede ser administrado en una dosis terapéutica a un paciente con una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el virus del papiloma humano (VPH) o el virus de hepatitis B/C (HBV/HCV). En una realización relacionada, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención se puede usar para tratar una infección por el virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS) en un sujeto simio tal como Cynomolgus. En otra realización, un anticuerpo o fragmento del mismo de la invención puede ser utilizado para tratar la infección viral crónica por el virus de la coriomeningitis linfocítica (VCML).

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de bloqueo de la presente invención puede ser administrado en una cantidad terapéuticamente eficaz a un sujeto que sufre cáncer o una infección viral.

En ciertos aspectos de la divulgación, los anticuerpos son útiles para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, incluyendo pero sin limitarse a, alopecia areata, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad celíaca, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, enfermedad inflamatoria intestinal, miopatías inflamatorias, esclerosis múltiple, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis reumatoide, esclerodermia, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, vitíligo, pancreatitis autoinmunitaria, urticaria autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, enfermedad de Crohn, diabetes tipo I, fascitis eosinofílica, enterogastritis eosinofílica, síndrome de Goodpasture, miastenia grave, artritis psoriásica, fiebre reumática, colitis ulcerosa, vasculitis y granulomatosis de Wegener. En ciertos aspectos, puede utilizarse un anticuerpo activador de la invención para tratar un sujeto que sufre una enfermedad autoinmunitaria

Uno o más anticuerpos de la presente invención se pueden administrar para aliviar o prevenir o disminuir la gravedad de uno o más de los síntomas o condiciones de la enfermedad o trastorno.

También se contempla en la presente memoria usar uno o más anticuerpos de la presente invención profilácticamente en los pacientes en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno tal como cáncer e infección viral crónica.

En otro aspecto de la divulgación, los presentes anticuerpos se utilizan para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de pacientes que sufren cáncer, enfermedad autoinmunitaria o infección viral. Los presentes anticuerpos se pueden utilizar como complemento de la terapia con cualquier otro agente o cualquier otra terapia conocida por los expertos en la materia útil para tratar el cáncer, una enfermedad autoinmunitaria o una infección viral.

### Terapias de combinación

Las terapias de combinación pueden incluir un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención y cualquier agente terapéutico adicional que se pueda combinar ventajosamente con un anticuerpo de la invención, o con un fragmento biológicamente activo de un anticuerpo de la invención.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden combinar de forma sinérgica con uno o más fármacos contra el cáncer o terapia para tratar el cáncer, incluyendo, por ejemplo, carcinoma de células renales, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico, y melanoma. Se contempla en la presente memoria usar anticuerpos anti-PD-L1 de la invención en combinación con inmunoestimulantes y/o terapias inmunosupresoras para inhibir el crecimiento del tumor, y/o aumentar la supervivencia de pacientes con cáncer. Las terapias inmunoestimulantes incluyen terapias inmunoestimulantes directas para aumentar la actividad de las células inmunitarias, ya sea "soltando el freno" en las células inmunes suprimidas o "pisando el acelerador" para activar una respuesta inmunitaria. Los ejemplos incluyen dirigirse a otros receptores del punto de control, la vacunación y adyuvantes. Las realizaciones inmunosupresoras pueden aumentar la antigenicidad del tumor promoviendo la muerte celular inmunogénica, la inflamación o tener otros efectos indirectos que promueven una respuesta inmunitaria anti-tumoral. Los ejemplos incluyen la radiación, la quimioterapia, los agentes anti-angiogénicos y la cirugía.

En diversas realizaciones, uno o más anticuerpos de la presente invención se pueden usar en combinación con un segundo anticuerpo contra PD-L1, un anticuerpo contra PD-1 (por ejemplo, nivolumab), un inhibidor de LAG-3, un inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab), un inhibidor de TIM3, un inhibidor de BTLA, un inhibidor de TIGIT, un inhibidor de CD47, un antagonista de otro co-inhibidor o ligando de linfocitos T (por ejemplo, un anticuerpo contra CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 o VISTA), un inhibidor de la indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO), un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [por ejemplo, una "trampa de VEGF" tal como aflibercept u otra proteína de fusión inhibidora de VEGF como se expone en el documento US-7.087.411, o un anticuerpo anti-VEGF o fragmento de unión al antígeno del mismo (por ejemplo, bevacizumab, o ranibizumab) o un inhibidor de quinasa del receptor VEGF de molécula pequeña (por ejemplo, sunitinib, sorafenib, o pazopanib)], un inhibidor de Ang2 (por ejemplo, nesvacumab), un inhibidor del factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ), un inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, erlotinib, cetuximab), un agonista de un receptor co-estimulador (por ejemplo, un agonista de la proteína asociada a TNFR inducida por glucocorticoides), un anticuerpo contra un antígeno específico de tumor (por ejemplo, CA9, CA125, antígeno 3 asociado al melanoma (MAGE3), antígeno carcinoembrionario (CEA), vimentina, tumor-M2-PK, antígeno específico de la próstata (PSA), mucina-1, MART-1, y CA19-9), una vacuna (por ejemplo, Bacillus de Calmette-Guerin, una vacuna contra el cáncer), un adyuvante para aumentar la presentación de antígenos (por ejemplo, factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos), un anticuerpo biespecífico (por ejemplo, anticuerpo biespecífico CD3xCD20, anticuerpo biespecífico PSMAxCD3), una citotoxina, un agente quimioterapéutico (por ejemplo, dacarbazina, temozolomida, ciclofosfamida, docetaxel, doxorubicina, daunorrubicina, cisplatino, carboplatino, gemcitabina, metotrexato, mitoxantrona, oxaliplatino, paclitaxel y vincristina), ciclofosfamida, radioterapia, un inhibidor IL-6R (por ejemplo, sarilumab), un inhibidor de IL-4R (por ejemplo, dupilumab), un inhibidor de IL-10, una citocina tal como IL-2, IL-7, IL-21 e IL-15, un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) (por ejemplo, anti-CD19-DM4 ADC, y anti-DS6-DM4 ADC), un fármaco anti-inflamatorio (por ejemplo, corticosteroides, y fármacos anti inflamatorios no esteroideos), un suplemento dietético, tal como antioxidantes o cualquier cuidado paliativo para tratar el cáncer. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-L1 de la presente invención se pueden usar en combinación con vacunas contra el cáncer, incluidas las vacunas de células dendríticas, virus oncolíticos, vacunas de células tumorales, etc., para aumentar la respuesta anti-tumoral. Ejemplos de vacunas contra el cáncer que se pueden utilizar en combinación con anticuerpos anti-PD-L1 de la presente invención incluyen la vacuna MAGE3 para el melanoma y el cáncer de vejiga, vacuna MUC1 para el cáncer de mama, EGFRv3 (por ejemplo, rindopepimut) para el cáncer de cerebro (incluyendo glioblastoma multiforme) o ALVAC-CEA (para cánceres CEA+). En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-L1 de la presente invención se pueden usar en combinación con un suplemento dietético, tal como antioxidantes o cualquier cuidado paliativo para tratar el cáncer.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención se pueden administrar en combinación con radioterapia en métodos para generar respuestas antitumorales duraderas a largo plazo y/o aumentar la supervivencia de los pacientes con cáncer. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención se pueden administrar antes de, concomitantemente o después de la administración de la radioterapia a un paciente con cáncer. Por ejemplo, la radioterapia se puede administrar en una o más dosis a lesiones tumorales seguidas de la administración de una o más dosis de anticuerpos anti-PD-L1 de la invención. En algunas realizaciones, la radioterapia se puede administrar localmente a una lesión tumoral para aumentar la inmunogenicidad local del tumor de un paciente (radiación adyuvante) y/o para destruir las células tumorales (radiación ablativa) seguido de la

administración sistémica de un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención. Por ejemplo, la radiación intracraneal se puede administrar a un paciente con cáncer de cerebro (por ejemplo, glioblastoma multiforme), junto con la administración sistémica de un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención se pueden administrar en combinación con radioterapia y un agente quimioterapéutico (por ejemplo, temozolomida) o un antagonista del VEGF (por ejemplo, aflibercept).

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención se pueden administrar en combinación con uno o más fármacos anti-virales conocidos en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a, zidovudina, lamivudina, abacavir, ribavirina, lopinavir, efavirenz, cobicistat, tenofovir, rilpivirina y corticosteroides. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden ser administrados en combinación con un inhibidor de LAG3, un inhibidor de CTLA-4, un inhibidor de PD-1 o cualquier antagonista de otro co-inhibidor de linfocitos T para tratar la infección viral crónica.

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención se pueden usar en combinación con cualquier fármaco o terapia conocida en la técnica (por ejemplo, corticosteroides y otros inmunosupresores) para tratar una enfermedad o trastorno autoinmunitario que incluye, pero no se limita a, alopecia areata, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad celíaca, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, enfermedad inflamatoria intestinal, miopatías inflamatorias, esclerosis múltiple, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis reumatoide, esclerodermia, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, vitíligo, pancreatitis autoinmunitaria, urticaria autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, enfermedad de Crohn, diabetes tipo I, fascitis eosinofílica, enterogastritis eosinofílica, síndrome de Goodpasture, miastenia grave, artritis psoriásica, fiebre reumática, colitis ulcerosa, vasculitis y granulomatosis de Wegener.

El componente o componentes terapéuticamente activos adicionales se pueden administrar antes de, simultáneamente con, o después de la administración del anticuerpo anti-PD-L1 de la presente invención. Para los propósitos de la presente divulgación, dichos regímenes de administración se consideran la administración de un anticuerpo anti-PD-L1 “en combinación con” un segundo componente terapéuticamente activo.

El componente o componentes terapéuticamente activos adicionales se pueden administrar a un sujeto antes de la administración de un anticuerpo anti-PD-L1 de la presente invención. Por ejemplo, se puede considerar la administración de un primer componente “antes de” un segundo componente si el primer componente se administra 1 semana antes, 72 horas antes, 60 horas antes, 48 horas antes, 36 horas antes, 24 horas antes, 12 horas antes, 6 horas antes, 5 horas antes, 4 horas antes, 3 horas antes, 2 horas antes, 1 hora antes, 30 minutos antes, 15 minutos antes, 10 minutos antes, 5 minutos antes, o menos de 1 minuto antes de la administración del segundo componente. En otras realizaciones, el componente o componentes terapéuticamente activos adicionales se pueden administrar a un sujeto después de la administración de un anticuerpo anti-PD-L1 de la presente invención. Por ejemplo, se puede considerar la administración de un primer “después de” un segundo componente si el primer componente se administra 1 minuto después, 5 minutos después, 10 minutos después, 15 minutos después, 30 minutos después, 1 hora después, 2 horas después, 3 horas después, 4 horas después, 5 horas después, 6 horas después, 12 horas después, 24 horas después, 36 horas después, 48 horas después, 60 horas después, 72 horas después de la administración del segundo componente. En otras realizaciones, el componente o componentes terapéuticamente activos adicionales se pueden administrar a un sujeto concurrente con la administración de un anticuerpo anti-PD-L1 de la presente invención. La administración “concurrente”, para los propósitos de la presente invención, incluye, por ejemplo, la administración de un anticuerpo anti-PD-L1 y un componente terapéuticamente activo adicional a un sujeto en una sola forma farmacéutica (por ejemplo, co-formulado), o en formas farmacéuticas separadas administradas al sujeto con intervalos de aproximadamente 30 minutos o menos la una de la otra. Si se administra en formas farmacéuticas separadas, cada forma farmacéutica puede administrarse por la misma vía (por ejemplo, tanto el anticuerpo anti-PD-L1 y el componente terapéuticamente activo adicional pueden ser administrados por vía intravenosa, subcutánea, etc.); como alternativa, cada forma farmacéutica se puede administrar mediante una vía diferente (por ejemplo, el anticuerpo anti-PD-L1 se puede administrar por vía intravenosa, y el componente terapéuticamente activo adicional puede ser administrado por vía subcutánea). En cualquier caso, la administración de las componentes en una única dosis, en formas farmacéuticas separadas por la misma vía, o en formas farmacéuticas separadas por diferentes vías son todas consideradas “administración concurrente”, para los propósitos de la presente divulgación. Para los propósitos de la presente divulgación, la administración de un anticuerpo anti-PD-L1 “antes de”, “concurrente con,” o “después” (tal como estas expresiones se han definido anteriormente en la presente memoria) de la administración de un componente terapéuticamente activo adicional, se considera la administración de un anticuerpo anti-PD-L1 “en combinación con” un componente terapéuticamente activo adicional).

La presente invención incluye composiciones farmacéuticas en las cuales un anticuerpo anti-PD-L1 de la presente invención se co-formula con uno o más del componente o componentes terapéuticamente activos adicionales como se describe en otra parte de la presente memoria usando una variedad de combinaciones de dosificación.

En realizaciones ilustrativas en las cuales se administra un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención en combinación con un antagonista del VEGF (por ejemplo, una trampa del VEGF tal como aflibercept), incluyendo la administración de co- formulaciones que comprenden un anticuerpo anti-PD-L1 y un antagonista del VEGF, los componentes

individuales se pueden administrar a un sujeto y/o co-formular usando una variedad de combinaciones de dosificación. Por ejemplo, el anticuerpo anti-PD-L1 se puede administrar a un sujeto y/o estar contenido en una co-formulación en una cantidad seleccionada del grupo que consiste en 0,01 mg, 0,02 mg, 0,03 mg, 0,04 mg, 0,05 mg, 0,1 mg, 0,2 mg, 0,3 mg, 0,4 mg, 0,5 mg, 0,6 mg, 0,7 mg, 0,8 mg, 0,9 mg, 1,0 mg, 1,5 mg, 2,0 mg, 2,5 mg, 3,0 mg, 3,5 mg, 4,0 mg, 4,5 mg, 5,0 mg, 6,0 mg, 7,0 mg, 8,0 mg, 9,0 mg, y 10,0 mg; y el antagonista del VEGF (por ejemplo, una trampa del VEGF tal como aflibercept) se puede administrar al sujeto y/o contener en una co-formulación en una cantidad seleccionada del grupo que consiste en 0,1 mg, 0,2 mg, 0,3 mg, 0,4 mg, 0,5 mg, 0,6 mg, 0,7 mg, 0,8 mg, 0,9 mg, 1,0 mg, 1,1 mg, 1,2 mg, 1,3 mg, 1,4 mg, 1,5 mg, 1,6 mg, 1,7 mg, 1,8 mg, 1,9 mg, 2,0 mg, 2,1 mg, 2,2 mg, 2,3 mg, 2,4 mg, 2,5 mg, 2,6 mg, 2,7 mg, 2,8 mg, 2,9 mg y 3,0 mg. Las combinaciones/co-formulaciones se pueden administrar a un sujeto de acuerdo con cualquiera de los regímenes de administración descritos en otra parte de la presente memoria, incluyendo, por ejemplo, dos veces a la semana, una vez cada semana, una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas, una vez cada mes, una vez cada 2 meses, una vez cada 3 meses, una vez cada 4 meses, una vez cada 5 meses, una vez cada 6 meses, etc.

## 15 Regímenes posológicos

De acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención, se pueden administrar múltiples dosis de un anticuerpo anti-PDL1 (o una composición farmacéutica que comprende una combinación de un anticuerpo anti-PD-L1 y cualquiera de los agentes terapéuticamente activos adicionales que se mencionan en la presente memoria) a un sujeto durante un transcurso de tiempo definido. Los métodos pueden comprender la administración secuencial a un sujeto de múltiples dosis de un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención. Como se usa en la presente memoria, "administración secuencial" significa que cada dosis de anticuerpo anti-PD-L1 se administra al sujeto en un punto diferente en el tiempo, por ejemplo, en diferentes días separados por un intervalo predeterminado (por ejemplo, horas, días, semanas o meses). También se proporcionan métodos que comprenden administrar secuencialmente al paciente una dosis inicial única de un anticuerpo anti-PD-L1, seguido de una o más dosis secundarias del anticuerpo anti-PD-L1, y, opcionalmente, seguido de una o más dosis terciarias del anticuerpo anti-PD-L1. El anticuerpo anti-PD-L1 se puede administrar a una dosis de entre 0,1 mg/kg y aproximadamente 0 mg/kg.

Las expresiones "dosis inicial", "dosis secundarias" y "dosis terciarias," se refieren a la secuencia temporal de la administración del anticuerpo anti-PD-L1 de la invención. Por lo tanto, la "dosis inicial" es la dosis que se administra al comienzo del régimen del tratamiento (también conocida como la "dosis de referencia"); las dosis "secundarias" son las dosis que se administran después de la dosis inicial; y las "dosis" terciarias son las dosis que se administran después de las dosis secundarias. Todas las dosis iniciales, secundarias y terciarias pueden contener la misma cantidad de anticuerpos anti-PD-L1, pero en general pueden diferir entre sí en términos de la frecuencia de administración. En ciertas realizaciones, sin embargo, la cantidad de anticuerpo anti-PD-L1 contenido en las dosis iniciales, secundarias y/o terciarias varía de unos a otros (por ejemplo, se ajusta hacia arriba o hacia abajo según el caso) durante el curso del tratamiento. En ciertas realizaciones, dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, o 5) dosis se administran al principio del régimen de tratamiento como "dosis de carga", seguido de dosis posteriores que se administran con una menor frecuencia (por ejemplo, "dosis de mantenimiento").

En ciertas realizaciones ilustrativas de la presente invención, cada dosis secundaria y/o terciaria se administra 1 a 26 (por ejemplo, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½, o más) semanas después de la dosis inmediatamente anterior. La frase "la dosis inmediatamente anterior" como se usa en la presente memoria, significa, en una secuencia de múltiples administraciones, la dosis de anticuerpo anti-PD-L1 que se administra a un paciente antes de la administración de la siguiente dosis en la secuencia sin intervención de otras dosis.

Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención pueden comprender administrar a un paciente cualquier número de dosis secundaria y/o terciaria de un anticuerpo anti-PD-L1. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, solo se administra una única dosis secundaria al paciente. En otras realizaciones, dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o más) dosis secundarias se administran al paciente. Del mismo modo, en ciertas realizaciones, solo una única dosis terciaria se administra al paciente. En otras realizaciones, se administran al paciente dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o más) dosis terciarias.

En realizaciones que implican múltiples dosis secundarias, cada dosis secundaria puede administrarse en la misma frecuencia que las otras dosis secundarias. Por ejemplo, cada dosis secundaria se puede administrar al paciente de 1 a 2 semanas o 1 a 2 meses después de la dosis inmediatamente anterior. Del mismo modo, en las realizaciones que implican múltiples dosis terciarias, cada dosis terciaria se puede administrar con la misma frecuencia que las otras dosis terciarias. Por ejemplo, cada dosis terciaria se puede administrar al paciente de 2 a 12 semanas después de la dosis inmediatamente anterior. En ciertas realizaciones de la invención, la frecuencia con la que las dosis secundarias y/o terciarias se administran a un paciente puede variar en el curso del régimen de tratamiento. La frecuencia de administración también se puede ajustar durante el curso del tratamiento por un médico dependiendo de las necesidades individuales del paciente después del examen clínico.

La presente invención incluye pautas de administración en las cuales se administran a un paciente de 2 a 6 dosis de

carga con una primera frecuencia (por ejemplo, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez al mes, una vez cada dos meses, etc.), seguido de la administración de dos o más dosis de mantenimiento para el paciente con una frecuencia menor. Por ejemplo, de acuerdo con este aspecto de la invención, si las dosis de carga se administran con una frecuencia de, por ejemplo, una vez al mes (por ejemplo, dos, tres, cuatro, o más dosis de carga administrada una vez al mes), entonces la dosis de mantenimiento se puede administrar al paciente una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas, una vez cada siete semanas, una vez cada ocho semanas, una vez cada diez semanas, una vez cada doce semanas, etc.).

### Usos diagnósticos de los anticuerpos

Los anticuerpos anti-PD-L1 de la presente invención se pueden usar para detectar y/o medir el PD-L1 en una muestra, por ejemplo, para fines de diagnóstico. Se contempla el uso de uno o más anticuerpos de la presente invención en ensayos para detectar una enfermedad o trastorno como el cáncer, enfermedad autoinmunitaria o infección viral crónica. Los ensayos de diagnóstico ilustrativos para PD-L1 pueden comprender, por ejemplo, poner en contacto una muestra, obtenida de un paciente, con un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención, en el que el anticuerpo anti-PD-L1 está marcado con un marcador detectable o molécula indicadora o se utiliza como un ligando de captura para aislar selectivamente a PD-L1 a partir de muestras de pacientes. Como alternativa, un anticuerpo anti-PD-L1 no marcado se puede utilizar en aplicaciones de diagnóstico en combinación con un anticuerpo secundario que está marcado de manera detectable. El marcado detectable o molécula indicadora puede ser un radioisótopo, tal como  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ , o  $^{125}\text{I}$ ; un resto fluorescente o quimioluminiscente, tal como fluoresceína isotiocianato o rodamina; o una enzima tal como fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, peroxidasa de rábano picante, o luciferasa. Los ensayos ilustrativos específicos que se pueden utilizar para detectar o medir PD-L1 en una muestra incluyen ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

Las muestras que se pueden utilizar en ensayos de diagnóstico de PD-L1 incluyen cualquier muestra de tejido o fluido que se puede obtener de un paciente, que contiene cantidades detectables de proteína PD-L1, o fragmentos de la misma, en condiciones normales o patológicas. En general, los niveles de PD-L1 en una muestra particular obtenida de un paciente sano (por ejemplo, un paciente no aquejado de cáncer o una enfermedad autoinmunitaria) se medirán para establecer inicialmente un nivel basal, o estándar, de PD-L1. Este nivel basal de PD-L1 se puede comparar a continuación con los niveles de PD-L1 medidos en muestras obtenidas de individuos sospechosos de tener una condición relacionada con el cáncer, o síntomas asociados con tal condición.

Los anticuerpos específicos de PD-L1 pueden no contener marcadores o restos adicionales, o pueden contener un marcador o resto N-terminal o C-terminal. El marcador o fracción puede ser biotina. En un ensayo de unión, la ubicación de una etiqueta (si existe) puede determinar la orientación del péptido con respecto a la superficie sobre la que se une el péptido. Por ejemplo, si una superficie está recubierta con avidina, un péptido que contiene una biotina N-terminal se orientará de tal manera que la porción C-terminal del péptido será distal a la superficie.

Aspectos de la divulgación se refieren al uso de los anticuerpos divulgados como marcadores para predecir el pronóstico de cáncer o de un trastorno autoinmunitario en los pacientes. Los anticuerpos de la presente invención se pueden usar en ensayos de diagnóstico para evaluar el pronóstico del cáncer en un paciente y para predecir la supervivencia.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se exponen con el propósito de proporcionar a los expertos ordinarios en la materia una divulgación y descripción completas de cómo producir y usar los métodos y composiciones de la invención, y no están destinados a limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. Se han hecho esfuerzos para garantizar la exactitud con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero algunos errores y desviaciones experimentales deberían ser explicados. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, peso molecular es peso molecular promedio, la temperatura es en grados centígrados, la temperatura ambiente es de aproximadamente 25 °C, y la presión es la atmosférica o una presión cercana a la misma.

#### Ejemplo 1: Generación de anticuerpos humanos a PD-L1

Los anticuerpos humanos contra PD-L1 se generaron usando un fragmento de PD-L1 que se extiende desde aproximadamente los aminoácidos 19-239 de SEQ ID NO: 351 (N.º Acceso a Genbank NP\_054862.1). El inmunógeno se administró directamente, con un adyuvante para estimular la respuesta inmunitaria, a un ratón de VELOCIMMUNE® que comprende ADN que codifica las regiones variables de cadena pesada y ligera kappa de inmunoglobulina humana. La respuesta inmunitaria de anticuerpos se controló mediante un inmunoensayo específico de PD-L1. Una vez lograda una respuesta inmunitaria deseada se recogieron los esplenocitos y se fusionan con células de mieloma de ratón para preservar su viabilidad y formar líneas celulares de hibridoma. Las líneas celulares de hibridoma se analizaron y seleccionaron para identificar las líneas celulares que producen anticuerpos específicos contra PD-L1. Usando esta técnica, y el inmunógeno descrito anteriormente, se obtuvieron

varios anticuerpos quiméricos anti-PD-L1 (es decir, anticuerpos que tienen dominios variables humanos y dominios constantes de ratón); ejemplos de anticuerpos generados de esta manera se designaron como H2M8306N, H2M8307N, H2M8309N, H2M8310N, H2M8312N, H2M8314N, H2M8316N, H2M8317N, H2M8321N, H2M8323N, H2M8718N, H2M8718N2 y H2M8719N.

Los anticuerpos anti-PD-L1 también se aislaron directamente de los linfocitos B positivos para antígeno sin fusión de células de mieloma, como se describe en el documento U.S. 2007/0280945A1. Usando este método, se obtuvieron varios anticuerpos anti-PD-L1 completamente humanos (es decir, anticuerpos que tienen dominios variables humanos y dominios constantes humanos); ejemplos de anticuerpos generados de esta manera se designaron como H1H9323P, H1H9327P, H1H9329P, H1H9336P, H1H9344P2, H1H9345P2, H1H9351P2, H1H9354P2, H1H9364P2, H1H9373P2, H1H9382P2, H1H9387P2 y H1H9396P2.

Las propiedades biológicas de los anticuerpos ilustrativos generados de acuerdo con los métodos de este Ejemplo se describen en detalle en los Ejemplos expuestos a continuación.

**Ejemplo 2: Secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la región variable de las cadenas pesada y ligera**

La Tabla 1 muestra los identificadores de secuencia de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera y las CDR de los anticuerpos anti-PD-L1 seleccionados de la invención. Los correspondientes identificadores de la secuencia de ácido nucleico se definen en la Tabla 2.

**Tabla 1: Identificadores de secuencia de aminoácidos**

Designación del anticuerpo	SEQ ID NOS:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H2M8306N	2	4	6	8	10	12	14	16
H2M8307N	18	20	22	24	26	28	30	32
H2M8309N	34	36	38	40	42	44	46	48
H2M8310N	50	52	54	56	58	60	62	64
H2M8312N	66	68	70	72	74	76	78	80
H2M8314N	82	84	86	88	90	92	94	96
H2M8316N	98	100	102	104	106	108	110	112
H2M8317N	114	116	118	120	122	124	126	128
H2M8321N	130	132	134	136	138	140	142	144
H2M8323N	146	148	150	152	154	156	158	160
H2M8718N	162	164	166	168	170	172	174	176
H2M8718N2	178	180	182	184	170	172	174	176
H2M8719N	186	188	190	192	194	196	198	200
H1H9323P	202	204	206	208	210	212	214	216
H1H9327P	218	220	222	224	226	228	230	232
H1H9329P	234	236	238	240	242	244	246	248
H1H9336P	250	252	254	256	258	260	262	264
H1H9344P2	266	268	270	272	274	276	278	280
H1H9345P2	282	284	286	288	274	276	278	280
H1H9351P2	290	292	294	296	274	276	278	280
H1H9354P2	298	300	302	304	274	276	278	280
H1H9364P2	306	308	310	312	274	276	278	280
H1H9373P2	314	316	318	320	274	276	278	280
H1H9382P2	322	324	326	328	274	276	278	280
H1H9387P2	330	332	334	336	274	276	278	280
H1H9396P2	338	340	342	344	274	276	278	280

**Tabla 2:** Identificadores de secuencia de ácido nucleico

Designación del anticuerpo	SEQ ID NOs:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H2M8306N	1	3	5	7	9	11	13	15
H2M8307N	17	19	21	23	25	27	29	31
H2M8309N	33	35	37	39	41	43	45	47
H2M8310N	49	51	53	55	57	59	61	63
H2M8312N	65	67	69	71	73	75	77	79
H2M8314N	81	83	85	87	89	91	93	95
H2M8316N	97	99	101	103	105	107	109	111
H2M8317N	113	115	117	119	121	123	125	127
H2M8321N	129	131	133	135	137	139	141	143
H2M8323N	145	147	149	151	153	155	157	159
H2M8718N	161	163	165	167	169	171	173	175
H2M8718N2	177	179	181	183	169	171	173	175
H2M8719N	185	187	189	191	193	195	197	199
H1H9323P	201	203	205	207	209	211	213	215
H1H9327P	217	219	221	223	225	227	229	231
H1H9329P	233	235	237	239	241	243	245	247
H1H9336P	249	251	253	255	257	259	261	263
H1H9344P2	265	267	269	271	273	275	277	279
H1H9345P2	281	283	285	287	273	275	277	279
H1H9351P2	289	291	293	295	273	275	277	279
H1H9354P2	297	299	301	303	273	275	277	279
H1H9364P2	305	307	309	311	273	275	277	279
H1H9373P2	313	315	317	319	273	275	277	279
H1H9382P2	321	323	325	327	273	275	277	279
H1H9387P2	329	331	333	335	273	275	277	279
H1H9396P2	337	339	341	343	273	275	277	279

En la presente memoria, normalmente los anticuerpos se denominan de acuerdo con la siguiente nomenclatura: prefijo Fc (por ejemplo, "H1H", "H2M", "H2aM", etc.), seguido de un identificador numérico (por ejemplo, "8306", "9323", etc., como se muestra en la Tabla 1), seguido de un sufijo "P", "N", "P2", o "N2". Por lo tanto, de acuerdo con esta nomenclatura, un anticuerpo puede ser referido en la presente memoria como, por ejemplo, "H2M8306N", "H1H9344P2", etc. Los prefijos H1H, H2M y H2aM en las designaciones de anticuerpos utilizadas en la presente memoria indican el isotipo de la región Fc en particular del anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo "H1H" tiene un Fc de IgG1 humana, un anticuerpo "H1M" tiene un Fc de IgG1 de ratón, y un anticuerpo "H2M" o "H2aM" tiene un Fc de IgG2 de ratón, (todas las regiones variables son totalmente humanas como se indica mediante la primera 'H' en la designación del anticuerpo). Como se apreciará por una persona con experiencia ordinaria en la materia, un anticuerpo que tiene un isotipo Fc particular, se puede convertir en un anticuerpo con un isotipo Fc diferente (por ejemplo, un anticuerpo con un Fc de IgG1 de ratón se puede convertir en un anticuerpo con un Fc de IgG4 humano, etc.), pero en cualquier caso, los dominios variables (incluyendo las CDR) que están indicados por los identificadores numéricos que se muestran en la Tabla 1, seguirán siendo los mismos, y se espera que las propiedades de unión al antígeno sean idénticas o sustancialmente similares independientemente de la naturaleza del dominio Fc.

**Ejemplo 3: Unión del anticuerpo a PD-L1 como se determina por resonancia de plasmón superficial**

Las constantes de la tasa de asociación y disociación de unión ( $k_a$  y  $k_d$ , respectivamente), las constantes de equilibrio de disociación y las semividas de disociación ( $K_D$  y  $t_{1/2}$ , respectivamente) de la unión del antígeno a los anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 purificados se determinaron utilizando un ensayo de biosensor de resonancia de plasmón superficial en tiempo real en un instrumento Biacore 4000. La superficie del sensor Biacore se derivatizó con anticuerpo policlonal anti-ratón de conejo (GE, N.º BR- 1008-38) o con anticuerpo monoclonal anti-Fc humano de ratón (GE, N.º BR-1008-39) para capturar aproximadamente 200- 300 RU de anticuerpos monoclonales anti-PD-L1, expresados ya sea con Fc de ratón o con Fc humano, respectivamente. Los reactivos PD-L1 ensayados para la

unión a los anticuerpos anti-PD-L1 incluyen PD-L1 (aminoácidos 19-239 de número de acceso NP\_054862.1) humano recombinante expresado con una etiqueta myc-myc-hexahistidina C-terminal (hPD-L1-MMH; SEQ ID: 345), PD-L1 de mono Cynomolgus recombinante expresado con una etiqueta myc-myc-hexahistidina C-terminal (MfPD-L1-MMH; SEQ ID: 346), PD-L1 humano recombinante (aminoácidos 19 - 239 de número de acceso NP\_054862.1) expresado con una etiqueta Fc IgG1 humana C-terminal (hPD-L1-hFc; SEQ ID: 347) o con una etiqueta Fc IgG2a de ratón C-terminal (hPD-L-mFc; SEQ ID: 348), y PD-L1 de mono Cynomolgus recombinante expresado con una etiqueta Fc IgG2a de ratón C-terminal (MfPD-L1-mFc; SEQ ID: 353). Las diferentes concentraciones de reactivos PD-L1 se inyectaron sobre la superficie capturada del anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 a un caudal de 30µl/min. La unión de los reactivos de PD-L1 a los anticuerpos monoclonales capturados se controló durante 3 a 4 minutos mientras que la disociación de los reactivos PD-L1 unidos al anticuerpo se controló durante 3 a 4 minutos en un tampón de análisis HBST (HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,05 % v/v de tensioactivo surfactante Tween-20). Los experimentos se realizaron a 25 °C o 37 °C de temperatura. Las constantes cinéticas de la tasa de asociación ( $k_a$ ) y disociación ( $k_d$ ) se determinaron mediante el procesamiento y ajuste de los datos a un modelo de unión 1:1 usando software de ajuste de curva Scrubber 2.0c. Las constantes del equilibrio de disociación de unión ( $K_D$ ) y la semivida de disociación ( $t_{1/2}$ ) se calcularon a continuación a partir de las constantes de velocidad cinética como:  $K_D$  (M) =  $k_d / k_a$  y  $t_{1/2}$  (min) =  $[\ln 2 / (60 * k_d)]$ . Los parámetros cinéticos de unión para diferentes anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 que se unen a diferentes reactivos PD-L1 a 25 °C y 37 °C se tabulan en las Tablas 3-8.

**Tabla 3:** Parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 que se unen a hPD-L1-MMH a 25 °C

Unión del monómero hPD-L1-MMH a 25 °C				
Anticuerpo	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (min)
H2aM8306N	1,44E+05	1,00E-02	6,96E-08	1,2
H2aM8307N	3,27E+04	1,47E-04	4,50E-09	79
H2aM8309N	6,42E+05	1,04E-02	1,63E-08	1,1
H2aM8310N	8,86E+04	3,10E-04	3,50E-09	37
H2aM8312N	7,59E+04	7,22E-04	9,51E-09	16
H2aM8314N	9,25E+05	5,17E-05	5,58E-11	224
H2aM8316N	9,57E+05	1,12E-03	1,17E-09	10
H2aM8317N	9,40E+04	3,95E-02	4,21E-07	0,3
H2aM8321N	1,03E+05	3,59E-03	3,49E-08	3,2
H2aM8323N	9,37E+05	2,23E-04	2,38E-10	52
H2aM8718N	9,27E+05	8,01E-05	8,63E-11	144
H2aM8719N	8,64E+04	2,26E-03	2,62E-08	5,1
H1H9323P	5,51E+04	1,88E-02	3,41E-07	0,6
H1H9327P	4,19E+05	2,59E-04	6,19E-10	45
H1H9329P	1,77E+06	1,34E-01	7,58E-08	0,1
H1H9336P	7,92E+05	3,90E-04	4,92E-10	30
H1H9345P2	9,02E+04	1,49E-02	1,65E-07	0,8
H1H9351P2	4,56E+05	8,96E-04	1,96E-09	13
H1H9354P2	4,76E+04	3,83E-04	8,04E-09	30
H1H9364P2	9,32E+05	2,99E-04	3,21E-10	39
H1H9373P2	2,65E+06	2,91E-04	1,10E-10	40
H1H9382P2	7,90E+04	4,79E-03	6,06E-08	2,4
H1H9387P2	2,64E+06	5,82E-02	2,21E-08	0,2
H1H9396P2	1,72E+05	2,18E-03	1,27E-08	5,3

**Tabla 4:** Parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 que se unen a hPD-L1-MMH a 37 °C

Unión del monómero hPD-L1-MMH a 37 °C				
Anticuerpo	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (min)
H2aM8306N	1,80E+05	3,10E-02	1,72E-07	0,4
H2aM8307N	5,35E+04	8,79E-04	1,64E-08	13



<b>Unión del monómero hPD-L1-MMH a 37 °C</b>				
<b>Anticuerpo</b>	<b><math>k_a</math> (1/Ms)</b>	<b><math>k_d</math> (1/s)</b>	<b><math>K_D</math> (M)</b>	<b><math>t_{1/2}</math> (min)</b>
H2aM8309N	1,06E+06	3,14E-02	2,97E-08	0,4
H2aM8310N	1,32E+05	1,28E-03	9,70E-09	9,0
H2aM8312N	8,89E+04	4,03E-03	4,53E-08	2,9
H2aM8314N	1,07E+06	1,50E-04	1,40E-10	77
H2aM8316N	1,01E+06	5,30E-03	5,24E-09	2,2
H2aM8317N	9,03E+04	5,85E-02	6,47E-07	0,2
H2aM8321N	1,01E+05	9,29E-03	9,16E-08	1,2
H2aM8323N	1,38E+06	6,84E-04	4,97E-10	17
H2aM8718N	1,08E+06	1,55E-04	1,44E-10	74
H2aM8719N	1,50E+05	5,76E-03	3,84E-08	2,0
H1H9323P	1,21E+05	4,25E-02	3,52E-07	0,3
H1H9327P	5,21E+05	4,29E-04	8,24E-10	27
H1H9329P	2,82E+06	3,29E-01	1,17E-07	0,04
H1H9336P	1,07E+06	7,88E-04	7,33E-10	15
H1H9345P2	1,72E+05	3,40E-02	1,97E-07	0,3
H1H9351P2	6,82E+05	1,68E-03	2,47E-09	6,9
H1H9354P2	7,39E+04	1,14E-03	1,54E-08	10
H1H9364P2	1,35E+06	5,63E-04	4,17E-10	21
H1H9373P2	3,09E+06	5,58E-04	1,80E-10	21
H1H9382P2	9,97E+04	1,07E-02	1,07E-07	1,1
H1H9387P2	3,49E+06	1,37E-01	3,91E-08	0,08
H1H9396P2	3,44E+05	1,13E-02	3,30E-08	1,0

**Tabla 5:** Parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 que se unen al dímero PD-L1 humano a 25 °C

<b>Unión del dímero PD-L1 humano a 25 °C</b>				
<b>Anticuerpo</b>	<b><math>k_a</math> (1/Ms)</b>	<b><math>k_d</math> (1/s)</b>	<b><math>K_D</math> (M)</b>	<b><math>t_{1/2}</math> (min)</b>
H2aM8306N	7,39E+05	3,09E-04	4,18E-10	37
H2aM8307N	1,89E+04	2,89E-05	1,54E-09	399
H2aM8309N	3,36E+06	1,44E-04	4,29E-11	80
H2aM8310N	3,13E+05	5,71E-05	1,83E-10	202
H2aM8312N	2,47E+05	1,02E-04	4,13E-10	113
H2aM8314N	3,16E+06	1,35E-05	4,26E-12	859
H2aM8316N	3,08E+06	1,44E-04	4,68E-11	80
H2aM8317N	3,59E+05	4,50E-04	1,25E-09	26
H2aM8321N	8,13E+05	2,87E-04	3,53E-10	40
H2aM8323N	2,91E+06	2,05E-05	7,04E-12	565
H2aM8718N	3,20E+06	1,62E-05	5,06E-12	713
H2aM8719N	3,42E+05	2,62E-04	7,67E-10	44
H1H9323P	2,24E+05	1,69E-04	7,54E-10	68
H1H9327P	4,66E+05	7,87E-05	1,69E-10	147
H1H9329P	2,97E+06	7,68E-04	2,59E-10	15
H1H9336P	1,38E+06	1,09E-04	7,86E-11	106
H1H9345P2	5,00E+05	2,37E-04	4,74E-10	49
H1H9351P2	9,16E+05	1,53E-04	1,67E-10	76

Unión del dímero PD-L1 humano a 25 °C				
Anticuerpo	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (min)
H1H9354P2	1,68E+05	1,16E-04	6,89E-10	100
H1H9364P2	2,42E+06	1,06E-04	4,37E-11	109
H1H9373P2	4,08E+06	1,06E-04	2,60E-11	109
H1H9382P2	2,23E+05	1,48E-04	6,63E-10	78
H1H9387P2	5,07E+06	2,17E-04	4,27E-11	53
H1H9396P2	7,76E+05	1,90E-04	2,45E-10	61

**Tabla 6:** Parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 que se unen al dímero PD-L1 humano a 37 °C.

Unión del dímero PD-L1 humano a 37 °C				
Anticuerpo	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (min)
H2aM8306N	9,97E+05	4,16E-04	4,17E-10	28
H2aM8307N	4,41E+04	2,21E-04	5,00E-09	52
H2aM8309N	4,41E+06	1,66E-04	3,76E-11	70
H2aM8310N	4,81E+05	1,24E-04	2,58E-10	93
H2aM8312N	3,57E+05	2,61E-04	7,32E-10	44
H2aM8314N	3,89E+06	2,30E-05	5,91E-12	503
H2aM8316N	4,06E+06	2,37E-04	5,85E-11	49
H2aM8317N	4,81E+05	6,57E-04	1,36E-09	18
H2aM8321N	9,46E+05	2,69E-04	2,85E-10	43
H2aM8323N	4,32E+06	1,21E-04	2,80E-11	96
H2aM8718N	3,72E+06	1,98E-05	5,32E-12	584
H2aM8719N	4,37E+05	2,91E-04	6,66E-10	40
H1H9323P	5,19E+05	2,03E-04	3,91E-10	57
H1H9327P	6,83E+05	1,36E-04	2,00E-10	85
H1H9329P	3,87E+06	2,67E-03	6,89E-10	4,3
H1H9336P	2,75E+06	8,31E-05	3,02E-11	139
H1H9345P2	6,82E+05	2,03E-04	2,97E-10	57
H1H9351P2	1,25E+06	1,46E-04	1,17E-10	79
H1H9354P2	4,56E+05	1,45E-04	3,17E-10	80
H1H9364P2	3,34E+06	6,96E-05	2,08E-11	166
H1H9373P2	5,12E+06	8,97E-05	1,75E-11	129
H1H9382P2	4,92E+05	1,37E-04	2,78E-10	84
H1H9387P2	6,12E+06	3,92E-04	6,39E-11	29
H1H9396P2	1,09E+06	2,58E-04	2,37E-10	45

5 **Tabla 7:** Parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 que se unen a MfPD-L1-MMH a 25 °C

Unión del monómero MfPD-L1-MMH a 25 °C				
Anticuerpo	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (min)
H2aM8306N	1,65E+05	7,88E-03	4,77E-08	1,5
H2aM8307N	2,61E+04	1,07E-03	4,09E-08	11
H2aM8309N	8,70E+05	1,30E-02	1,49E-08	0,9
H2aM8310N	1,03E+05	3,06E-04	2,97E-09	38
H2aM8312N	7,09E+04	5,97E-04	8,42E-09	19

<b>Unión del monómero MfPD-L1-MMH a 25 °C</b>				
<b>Anticuerpo</b>	<b><math>k_a</math> (1/Ms)</b>	<b><math>k_d</math> (1/s)</b>	<b><math>K_D</math> (M)</b>	<b><math>t_{1/2}</math> (min)</b>
H2aM8314N	9,66E+05	7,00E-05	7,24E-11	165
H2aM8316N	9,71E+05	1,64E-03	1,69E-09	7,0
H2aM8317N	1,06E+05	2,38E-02	2,26E-07	0,5
H2aM8321N	1,34E+05	4,02E-03	2,99E-08	2,9
H2aM8323N	5,47E+05	8,68E-03	1,59E-08	1,3
H2aM8718N	9,04E+05	6,64E-05	7,35E-11	174
H2aM8719N	8,17E+04	2,68E-03	3,28E-08	4,3
H1H9323P	8,22E+04	2,40E-02	2,92E-07	0,5
H1H9327P	3,59E+05	3,33E-04	9,28E-10	35
H1H9329P	1,76E+06	1,35E-01	7,69E-08	0,09
H1H9336P	6,79E+05	5,94E-04	8,76E-10	19
H1H9345P2	1,10E+05	8,50E-03	7,73E-08	1,4
H1H9351P2	3,49E+05	1,11E-03	3,19E-09	10
H1H9354P2	4,60E+04	3,05E-04	6,64E-09	38
H1H9364P2	7,57E+05	3,12E-04	4,12E-10	37
H1H9373P2	2,21E+06	2,82E-04	1,27E-10	41
H1H9382P2	8,22E+04	1,29E-02	1,57E-07	0,9
H1H9387P2	2,37E+06	6,04E-02	2,55E-08	0,2
H1H9396P2	2,06E+05	2,52E-03	1,22E-08	4,6

**Tabla 8:** Parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 que se unen a MfPD-L1-MMH a 37 °C

<b>Unión del monómero MfPD-L1-MMH a 37 °C</b>				
<b>Anticuerpo</b>	<b><math>k_a</math> (1/Ms)</b>	<b><math>k_d</math> (1/s)</b>	<b><math>K_D</math> (M)</b>	<b><math>t_{1/2}</math> (min)</b>
H2aM8306N	2,74E+05	3,68E-02	1,34E-07	0,3
H2aM8307N	1,87E+05	1,43E-03	7,63E-09	8,1
H2aM8309N	1,07E+06	2,81E-02	2,63E-08	0,4
H2aM8310N	4,71E+05	1,07E-03	2,27E-09	11
H2aM8312N	1,01E+05	3,32E-03	3,27E-08	3,5
H2aM8314N	1,07E+06	1,52E-04	1,42E-10	76
H2aM8316N	1,02E+06	5,38E-03	5,27E-09	2,1
H2aM8317N	2,66E+05	4,76E-02	1,79E-07	0,2
H2aM8321N	1,59E+05	8,16E-03	5,11E-08	1,4
H2aM8323N	9,56E+05	2,82E-02	2,95E-08	0,4
H2aM8718N	1,10E+06	1,46E-04	1,33E-10	79
H2aM8719N	1,35E+05	6,99E-03	5,19E-08	1,7
H1H9323P	1,25E+05	4,99E-02	3,98E-07	0,2
H1H9327P	4,77E+05	5,34E-04	1,12E-09	22
H1H9329P	2,66E+06	3,64E-01	1,37E-07	0,03
H1H9336P	9,09E+05	1,25E-03	1,38E-09	9,2
H1H9345P2	1,64E+05	1,97E-02	1,21E-07	0,6
H1H9351P2	5,60E+05	2,01E-03	3,59E-09	5,8
H1H9354P2	8,59E+04	8,44E-04	9,82E-09	14
H1H9364P2	1,12E+06	6,33E-04	5,66E-10	18
H1H9373P2	2,81E+06	5,69E-04	2,03E-10	20

Unión del monómero MfPD-L1-MMH a 37 °C				
Anticuerpo	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (min)
H1H9382P2	1,30E+05	2,45E-02	1,89E-07	0,5
H1H9387P2	3,20E+06	1,57E-01	4,89E-08	0,07
H1H9396P2	3,94E+05	1,20E-02	3,05E-08	1,0

**Tabla 9:** Parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 que se unen a PD-L1-mFc de mono a 25 °C

Unión de MfPD-L1-mFc a 25 °C				
Anticuerpo	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (min)
H1H8314N	2,58E+06	6,77E-05	2,63E-11	171
H1H8316N	2,71E+06	5,23E-05	1,93E-11	221
H1H8323N	2,67E+06	6,16E-05	2,31E-11	188
H1H9351P2	7,81E+05	7,19E-05	9,22E-11	161
H1H9364P2	1,32E+06	7,75E-05	5,87E-11	149
H1H9373P2	2,85E+06	4,96E-05	1,74E-11	233
H1H9387P2	3,55E+06	1,61E-04	4,52E-11	72
H1H9351P2	8,64E+05	7,80E-05	9,03E-11	148
H1H9364P2	1,25E+06	5,80E-05	4,62E-11	199
H1H9373P2	3,27E+06	6,55E-05	2,00E-11	176
H1H9387P2	2,90E+06	2,12E-04	7,30E-11	55
H1H9323P	2,80E+05	1,45E-04	5,19E-10	79
H1H9327P	3,48E+05	1,02E-04	2,94E-10	113
H1H9329P	1,74E+06	6,72E-04	3,86E-10	17
H1H9336P	9,90E+05	6,16E-05	6,22E-11	188
H1H9344P2	3,50E+05	1,38E-04	3,93E-10	84
H1H9345P2	2,96E+05	1,51E-04	5,12E-10	76
H1H9354P2	2,05E+05	9,14E-05	4,47E-10	126
H1H9382P2	2,13E+05	1,33E-04	6,26E-10	87
H1H9396P2	8,37E+05	1,88E-04	2,25E-10	61

5 **Tabla 10:** Parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 que se unen a PD-L1-mFc de mono a 37 °C

Unión de MfPD-L1-mFc a 37 °C				
Anticuerpo	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (min)
H1H8314N	2,89E+06	9,60E-05	3,33E-11	120
H1H8316N	2,96E+06	6,16E-05	2,08E-11	187
H1H8323N	2,99E+06	1,35E-04	4,51E-11	86
H1H9351P2	1,06E+06	9,46E-05	8,91E-11	122
H1H9364P2	2,36E+06	1,11E-04	4,71E-11	104
H1H9373P2	3,15E+06	8,59E-05	2,73E-11	134
H1H9387P2	3,41E+06	4,74E-04	1,39E-10	24
H1H9351P2	1,61E+06	1,04E-04	6,47E-11	111
H1H9364P2	2,41E+06	6,76E-05	2,80E-11	171
H1H9373P2	3,86E+06	1,23E-04	3,19E-11	94
H1H9387P2	2,90E+06	4,65E-04	1,61E-10	25
H1H9323P	3,84E+05	2,44E-04	6,36E-10	47

Unión de MfPD-L1-mFc a 37 °C				
Anticuerpo	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (min)
H1H9327P	7,64E+05	2,94E-04	3,85E-10	39
H1H9329P	2,18E+06	1,54E-03	7,08E-10	8
H1H9336P	1,86E+06	4,60E-05	2,47E-11	251
H1H9344P2	9,05E+05	2,17E-04	2,40E-10	53
H1H9345P2	8,61E+05	2,92E-04	3,39E-10	40
H1H9354P2	2,72E+05	2,03E-04	7,46E-10	57
H1H9382P2	2,84E+05	2,35E-04	8,25E-10	49
H1H9396P2	1,57E+06	5,02E-04	3,19E-10	23

Como se muestra en la Tabla 3, a 25 °C, los 25 anticuerpos anti-PD-L1 de la invención unidos a hPD-L1-MMH tienen valores  $K_D$  que van de 55,8 pM a 421 nM. Como se muestra en la Tabla 4, a 37 °C, los 25 anticuerpos anti-PD-L1 de la invención unidos a al dímero hPD-L1-MMH tienen valores  $K_D$  que van de 140 pM a 647 nm. Como se muestra en la Tabla 5, a 25 °C, los 25 anticuerpos anti-PD-L1 de la invención unidos al dímero hPD-L1 tienen valores  $K_D$  que van de 4,26 pM a 1,54 nM. Como se muestra en la Tabla 6, a 37 °C, los 25 anticuerpos anti-PD-L1 de la invención unidos al dímero hPD-L1 tienen valores  $K_D$  que van de 5,32 pM a 5,0nM. Como se muestra en la Tabla 7, a 25 °C, todos los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención unidos a MfPD-L1-MMH tienen valores  $K_D$  que van de 72,4 pM a 292 nM. Como se muestra en la Tabla 8, a 37 °C, los 25 anticuerpos anti-PD-L1 de la invención unidos a MfPD-L1-MMH tienen valores  $K_D$  que van de 133 pM a 398nM. Como se muestra en la Tabla 9, a 25 °C, los 20 anticuerpos anti-PD-L1 de la invención ensayados unidos a MfPD-L1-mFc tienen valores  $K_D$  que van de 17,4 pM a 626 pM. Como se muestra en la Tabla 10, a 37 °C, los 20 anticuerpos anti-PD-L1 de la invención ensayados unidos a MfPD-L1-mFc tienen valores  $K_D$  que van de 20,8 pM a 825 pM.

#### Ejemplo 4: Bloqueo de unión de PD-L1 a PD-1 determinado por ELISA

La capacidad de los anticuerpos anti-PD-L1 monoclonales para bloquear el PD-L1 humano de la unión a sus parejas de unión, el PD-1 humano y los receptores B7-1 humanos, se midió utilizando dos formatos ELISA sándwich de competencia.

Una proteína PD-1 humana dimérica compuesta de una porción del dominio extracelular (aminoácidos 25-170 con número de acceso NP\_005009.2 con un cambio C93S) que se expresa con una etiqueta hFc C-terminal (hPD-1-hFc; SEQ ID: 350) y una proteína B7-1 humana dimérica compuesta de una porción del dominio extracelular expresada con la etiqueta hFc C-terminal y las etiquetas de hexahistidina (hB7-1-hFc- 6His; R & D Systems, N.º 140-B1) se recubrieron por separado a razón de 2 µg/ml en una placa de microtitulación de 96 pocillo en un tampón de PBS durante la noche a 4 °C. Los sitios de unión no específicos se bloquearon posteriormente utilizando una solución de BSA al 0,5 % en PBS (v/v). Una cantidad constante de 0,5 nM o 8,0 nM de una proteína hPD-L1 dimérica compuesta de una porción del dominio extracelular PD-L1 humano que se expresa con una etiqueta mFc C-terminal (hPD-L1-mFc; SEQ ID: 348) se valoró separadamente con concentraciones de anticuerpos anti-PD-1 y anticuerpos de control de isotipo que varían de 0 a 210 nM en dilución en serie. Estos complejos de anticuerpo-proteína se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente (RT). Los complejos con hPD-L1-mFc 8 nM constante se transfirieron posteriormente a placas de microtitulación recubiertas con hPD-1-hFc, y complejos con 8 nM constantes hPD-L1 -mFc fueron transferidos a placas recubiertas con hB7-1-hFc-6His. Se dejó que los complejos se uniesen a las placas recubiertas durante 1 hora a RT. Después de 1 hora de incubación, los pocillos se lavaron y se detectó hPD-L1-mFc unido a la placa con un anticuerpo policlonal anti-mFc conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch, N.º 115-035-164). Las muestras se desarrollaron con una solución de TMB (BD Biosciences, N.º 51-2606KC y N.º 51-2607KC) para producir una reacción colorimétrica y se neutralizó con ácido sulfúrico 1M antes de medir la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Víctor X5. El análisis de datos utiliza un modelo de dosis-respuesta sigmoidal dentro del software Prism™. El valor de  $CI_{50}$  calculado, definido como la concentración de anticuerpo necesaria para bloquear el 50 % de la unión de hPD-L1-mFc a hPD-1-hFc o hB7-1-hFc-6His, se utilizó como indicador de la potencia de bloqueo. Los valores máximos de bloqueo representan la capacidad de los anticuerpos para bloquear la unión de hPD-L1-mFc con respecto al basal. La absorbancia medida en la cantidad constante de hPD-L1 en la curva de dosis se define como 0 % de bloqueo y la absorbancia sin hPD-L1 añadido se define como 100 % de bloqueo. Los valores de absorbancia de los pocillo que contienen la concentración más alta para cada anticuerpo se utilizaron para determinar el porcentaje de bloqueo a la máxima concentración ensayada del anticuerpo. Los anticuerpos con un máximo porcentaje de bloqueo por debajo de 25 % se caracterizaron como no- bloqueadores, y sus valores  $CI_{50}$  no se muestran en la Tabla 11. Los anticuerpos con un porcentaje máximo de bloqueo por debajo de -25 % se caracterizaron como no-bloqueadores/potenciadores.

**Tabla 11:** Bloqueo ELISA de la unión de hPD-L1-mFc a hPD-1-hFc y hB7-1-hFc-6His por anticuerpos anti-PD-L1

	Concentración de anticuerpo máxima (nM) probada con recubrimiento hPD-1-hFc	Bloqueo 0,5 nM de unión de hPD-L1-mFc a hPD-1-hFc, CI <sub>50</sub> (M)	Bloqueo 0,5 nM de unión de hPD-L1-mFc a hPD-1-hFc, % bloqueo máximo	Concentración más alta de anticuerpo (nM) ensayada con recubrimiento hB7-1-hFc-6His	Bloqueo 8 nM de unión de hPD-L1-mFc a hB7-1-hFc-6His, CI <sub>50</sub> (M)	Bloqueo 8 nM de unión de hPD-L1-mFc a hB7-1-hFc-6His, CI <sub>50</sub> (M), % bloqueo máximo
H2aM8306N	50	<2,5E-10 (*)	99	150	<4,0E-09 (*)	93
H2aM8307N	50	IC	29	150	NBI/potenciador	-44
H2aM8309N	50	<2,5E-10 (*)	98	150	<4,0E-09 (*)	98
H2aM8310N	50	3,9E-10	76	150	<4,0E-09 (*)	98
H2aM8312N	50	NBI	23	150	<4,0E-09 (*)	98
H2aM8314N	50	<2,5E-10 (*)	93	150	<4,0E-09 (*)	97
H2aM8316N	50	<2,5E-10 (*)	96	150	<4,0E-09 (*)	98
H2aM8317N	50	NBI	-11	150	NBI/potenciador	-166
H2aM8321N	50	NBI	10	150	NBI/potenciador	-124
H2aM8323N	50	<2,5E-10 (*)	100	150	<4,0E-09 (*)	99
H2aM8718N	50	<2,5E-10 (*)	97	150	1,0E-08	57
H2aM8719N	50	7,7E-10	95	150	NBI/potenciador	-50
H1H9323P	50	<2,5E-10 (*)	43	210	NBI/potenciador	-25
H1H9327P	50	NBI/potenciador	-28	210	IC	41
H1H9329P	50	<2,5E-10 (*)	100	210	4,9E-09	100
H1H9336P	50	<2,5E-10 (*)	100	210	4,4E-09	99
H1H9344P2	50	NBI	15	210	NBI/potenciador	-51
H1H9345P2	50	<2,5E-10 (*)	26	210	NBI/potenciador	-34
H1H9351P2	50	<2,5E-10 (*)	100	210	4,4E-09	100
H1H9354P2	50	5,3E-10	34	210	NBI	-13
H1H9364P2	50	<2,5E-10 (*)	100	210	4,1E-09	101
H1H9373P2	50	<2,5E-10 (*)	100	210	4,6E-09	101
H1H9382P2	50	<2,5E-10 (*)	39	210	NBI/potenciador	-30
H1H9387P2	50	<2,5E-10 (*)	100	210	<4,0E-09 (*)	100
H1H9396P2	50	<2,5E-10 (*)	59	210	NBI	8
Control de isotipo humano IgG1	50	NBI	-11	210	NBI	-3
Control de isotipo de ratón IgG2a	50	NBI	5	210	NBI	-3

(\*) – por debajo del límite inferior teórico del ensayo; el límite inferior teórico del ensayo es 2,5E-10M para el recubrimiento hPD-1-hFc y 4,0E-09 M para el recubrimiento hB7-1-hFc-6His; NBI - no bloqueador; IC - concluyente

5 Como se muestra en la Tabla 11, 19 de los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención bloquearon la unión 0,5 nM de hPD-L1-mFc a hPD-1-hFc con valores de CI<sub>50</sub> que varían de menos de 250 pM a 770 pM, variando el máximo porcentaje de bloqueo del 26 % al 100 %. Cuatro de los 25 anticuerpos anti-PD-L1 ensayados fueron caracterizados como no bloqueadores de la unión de hPD-L1-mFc a hPD-1-hFc, mientras que un anticuerpo ensayado (H1H9327P) se caracterizó como un no-bloqueador/potenciador de la unión de hPD-L1-mFc a hPD-1-hFc. Un anticuerpo (H2aM8307N) demostró un bloqueo débil de la unión de hPD-L1-mFc a hPD-1-hFc con un máximo porcentaje de bloqueo de 29 %; sin embargo, el valor de CI<sub>50</sub> no se pudo determinar para esta muestra.

10 Por otra parte, 14 de los 25 anticuerpos anti-PD-L1 de la invención bloquearon la unión 8 nM de hPD-L1-MFC a hB7-1-hFc-6His con valores de CI<sub>50</sub> de <4 nM a 10 nm con un porcentaje de bloqueo máximo que varía de 57 % a 101 %.

5 Dos de los 25 anticuerpos anti-PD-L1 ensayados fueron caracterizados como no-bloqueadores de la unión de hPD-L1-mFc a hB7-1-hFc-6His, mientras que 8 anticuerpos ensayados fueron caracterizados como no-bloqueadores/potenciadores de la unión de hPD-L1-mFc a hB7-1-hFc-6His. Un anticuerpo (H1H9327P) demostró un bloqueo débil de la unión de hPD-L1-mFc a hB7-1-hFc-6His con un máximo porcentaje de bloqueo del 41 %; sin embargo, el valor de  $Cl_{50}$  no se pudo determinar para esta muestra.

**Ejemplo 5: Bloqueo de la unión de PD-L1 a PD-1 como se determina por el ensayo de biosensor y por resonancia de plasmón superficial**

10 La inhibición de la unión de PD-L1 humano a PD-1 humano por diferentes anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 fue estudiada usando el ensayo de interferometría de bio-capa en tiempo real sobre un instrumento de biosensor Octet Red96 (Fortebio Inc.) o usando un ensayo de biosensor de resonancia de plasmón superficial en tiempo real en un instrumento Biacore 3000.

15 Se realizaron estudios de inhibición de anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 expresados con Fc de ratón en un instrumento Octet Red96. En primer lugar, 100 nM de un PD-L1 humano recombinante expresado con una etiqueta Fc IgG2a de ratón C-terminal (hPD-L1-mFc; SEQ ID: 348) se incubó con 500 nM de cada anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 durante al menos 1 hora antes de llevar a cabo el ensayo de inhibición. Aproximadamente de 0,8 nm a 1,2 nm de PD-1 humano recombinante expresado con una etiqueta Fc IgG1 humana C-terminal (hPD-1-hFc; SEQ ID: 350) fue capturado utilizando biosensores de captura de Fc IgG anti-humano. Los biosensores Octet capturados con hPD-1-hFc se sumergieron posteriormente en pocillos que contenían la mezcla de hPD-L1-mFc y diferentes anticuerpos monoclonales anti-PD-L1. Todo el experimento se realizó a 25 °C en tampón Octet HBST (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,05 % v/v de tensioactivo P20, 0,1 mg/ml de BSA) con una placa de agitación a una velocidad de 1000 rpm. Los biosensores se lavaron en tampón Octet HBST entre cada etapa del experimento.

25 La respuesta de unión en tiempo real fue controlada durante el curso del experimento y se registró la respuesta de unión al final de cada etapa. La unión de hPD-L1-mFc al hPD-1-hFc capturado se comparó en presencia y ausencia de diferentes anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 y se utilizó para determinar el comportamiento de bloqueo de los anticuerpos ensayados como se muestra en la Tabla 12.

30 **Tabla 12:** Inhibición de la unión de PD-1 humano a PD-L1 humano por diferentes anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 expresados con Fc de ratón llevado a cabo en el instrumento Octet Red96.

Anticuerpo monoclonal anti-PD-L1	Cantidad de hPD-1-hFc capturado (nm)	Unión de la mezcla de 100 nM de hPD-L1-mFc y 500 nM de anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 (nm)	% Bloqueo
Sin anticuerpo	1,05	0,31	0
H2aM8306N	0,98	0,02	94
H2aM8307N	1,01	0,46	-48
H2aM8309N	0,89	0,02	94
H2aM8310N	0,95	0,13	58
H2aM8312N	1,06	0,52	-68
H2aM8314N	0,99	0,02	94
H2aM8316N	1,06	0,01	97
H2aM8317N	0,92	0,58	-87
H2aM8321N	1,04	0,60	-94
H2aM8323N	1,00	0,02	94
H2aM8718N	1,08	0,01	97
H2aM8719N	0,93	0,11	65
Anticuerpo control de isotipo	1,10	0,35	-13

35 Como se muestra en la Tabla 12, 8 de los 12 anticuerpos anti-PD-L1 ensayados en el instrumento Octet Red96 demostraron el bloqueo de la unión de hPD-L1-mFc a hPD-1-hFc en un porcentaje que va de 58 % a 97 %. Cuatro anticuerpos anti-PD-L1 ensayados demostraron la capacidad de potenciar la unión de hPD-L1-mFc a hPD-1-hFc.

A continuación, se llevaron a cabo estudios de inhibición de anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 expresados con Fc humano en el instrumento Biacore 3000. En primer lugar, se incubaron 100 nM de PD-L1 humano recombinante expresado con una etiqueta de Fc IgG1 humana C-terminal (hPD-L1-hFc; SEQ ID: 350) con 500 nM de cada

anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 durante al menos 1 hora antes de llevar a cabo el ensayo de inhibición. Una superficie de sensor CM5 Biacore se derivatizó primero con anticuerpo policlonal específico anti-IgG2a de ratón (Southern Biotech, N.º 1080-1001) utilizando la química estándar EDC-NHS. Aproximadamente se capturaron 230 RU de PD-1 humano recombinante expresado con una etiqueta Fc IgG2a de ratón C-terminal (hPD-1-mFc; SEQ ID: 348), seguido por una inyección de 100 nM de hPD-L1-hFc en presencia y ausencia de diferentes anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 a un caudal de 25 µl/min durante 2 minutos. Todo el experimento se realizó a 25 °C en tampón de análisis HBST (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,05 % v/v de tensioactivo P20). Las respuestas de unión en tiempo real se controlaron durante todo el curso del experimento y la respuesta de unión al final de cada etapa. La unión de hPD-L1-hFc al hPD-1-mFc capturado se comparó en presencia y ausencia de diferentes anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 y se utilizó para determinar el comportamiento de bloqueo de los anticuerpos ensayados como se muestra en la Tabla 13.

**Tabla 13:** Inhibición de la unión de PD-1 humano a PD-L1 humano por medio de diferentes anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 expresados con Fc humano realizado en un instrumento Biacore 3000.

Anticuerpo monoclonal anti-PD-L1	Cantidad de hPD-1-mFc capturado (RU)	Unión de la mezcla de 100 nM de hPD-L1-hFc y 500 nM de anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 (nm)	% Bloqueo
Sin anticuerpo	222	56	0
H1H9323P	224	262	-368
H1H9327P	226	172	-207
H1H9329P	227	2	97
H1H9336P	227	9	84
H1H9345P2	229	292	-422
H1H9351P2	227	6	90
H1H9354P2	229	296	-428
H1H9364P2	228	8	86
H1H9373P2	227	6	89
H1H9382P2	228	307	-448
H1H9387P2	228	5	91
H1H9396P2	228	164	-193
Anticuerpo control de isotipo	228	56	0

Como se muestra en la Tabla 13, 6 de los 12 anticuerpos anti-PD-L1 de la invención ensayados en el instrumento Biacore 3000, demostraron el bloqueo de la unión de hPD-L1-hFc a hPD-1-mFc en un porcentaje que va de 84 % a 97 %. Seis anticuerpos anti-PD-L1 ensayados demostraron la capacidad de potenciar la unión del hPD-L1-hFc a hPD-1-mFc.

#### Ejemplo 6: Competencia cruzada Octet entre los anticuerpos anti-PD-L1

La competencia de unión entre anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 se determinó utilizando un ensayo en tiempo real, de interferometría bio-capa libre de etiqueta en un biosensor Octet Red384 (Pall ForteBio Corp.). Todo el experimento se realizó a 25 °C en el amortiguador de Octet HBST (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,05 % v/v de tensioactivo P20, 0,1 mg/ml de BSA) con la placa de agitación a una velocidad de 1000 rpm. Para evaluar si 2 anticuerpos eran capaces de competir entre sí por la unión a sus respectivos epítopos en el PD-L1 humano recombinante expresado con una etiqueta myc-myc-hexahistidina C-terminal (hPD-L1-MMH; SEQ ID: 345), se capturaron primero ~ 0,3 nM de hPD-L1-MMH en las puntas del biosensor Octet recubiertas con el anticuerpo anti-Penta-His (ForteBio Inc, N.º 18-5079) sumergiendo las puntas durante 5 minutos en el pocillo que contenía una solución de 20 µg/ml de hPD-L1-MMH. Las puntas del biosensor con el antígeno capturado después se saturaron con el primer anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 (denominado en lo sucesivo como mAb- 1) sumergiendo en pocillos que contenían una solución de 50 µg/ml solución de mAb-1 durante 1a 5 minutos. Las puntas del biosensor se sumergieron posteriormente en los pocillos que contenían 50 µg/ml de solución de un segundo anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 (denominado en lo sucesivo como mAb-2). Las puntas del biosensor se lavaron en tampón Octeto HBST entre cada etapa del experimento. Se controló la respuesta de unión en tiempo real durante el curso del experimento y se registró la respuesta de unión al final de cada etapa como se muestra en la Figura 1. La respuesta de la unión de mAb-2 a hPD-L1-MMH antes de formar complejo con mAb-1 se comparó y se determinó el comportamiento competitivo/no competitivo de diferentes anticuerpos monoclonales anti- PD-L1 .



En las condiciones experimentales usadas en este ejemplo, (a) H2aM8309N, H1H9329P, H1H9336P, H2aM8314N, H2aM8316N, H2aM8718N, H1H9387P2, H1H9351P2, H1H9364P2, H1H9373P2, y H2aM8306N compitieron de forma cruzada entre sí; (b) H2aM8310N, H2aM8321N y H2aM8312N compitieron de forma cruzada entre sí; (c) H1H9396P2, H2aM8317N, H2aM8321N, H1H9323P, H1H9382P2, H1H9344P2, H1H9345P2, y H1H9354P2 compitieron de forma cruzada entre sí; y (d) H1H9327P y H2aM8307N compitieron de forma cruzada entre sí. En un caso, se observó la competencia en una orientación, pero no en la orientación opuesta: es decir, cuando se aplicó por primera vez H2aM8307N en competencia con H2aM8309N, H1H9329P, H1H9336P, H2aM8314N, H2aM8316N, H2aM8718N, H1H9387P2, H1H9351P2, H1H9364P2, H1H9373P2, y H2aM8306N; sin embargo, en la orientación opuesta, H2aM8309N, H1H9329P, H1H9336P, H2aM8314N, H2aM8316N, H2aM8718N, H1H9387P2, H1H9351P2, H1H9364P2, H1H9373P2, y H2aM8306N cuando se aplicaban primero no competían con H2aM8307N.

**Ejemplo 7: Unión del anticuerpo a células que sobreexpresan PD-L1**

La unión de los anticuerpos anti-PD-L1 a una línea celular de riñón embrionario humano (HEK293; ATCC, N.º CRL-1573) transfectadas de forma estable con PD-L1 de longitud completa (aminoácidos de 1 a 290 de número de acceso NP\_054862.1) (HEK293/hPD-L1) se determinó mediante FACS.

Para el ensayo, las células adherentes se separaron usando tampón de disociación exento de enzima y se bloquearon con un medio completo. Las células se centrifugaron y se resuspendieron a una concentración de 2,8 x 10<sup>6</sup> células/ml en PBS frío que contenía 2 % de FBS. Las células HEK293 parentales y HEK293/hPD-L1 se incubaron a continuación durante 15 a 30 minutos en hielo con 100 nM de cada anticuerpo anti-PD-L1 o un anticuerpo de control de isotipo. Los anticuerpos no unidos se eliminaron por lavado con D-PBS que contenía 2 % de FBS, y las células se incubaron posteriormente con un fragmento Fcγ secundario conjugado con ficoeritrina que reconoce específicamente cualquier Fc humano Jackson ImmunoResearch, N.º 109-116-170) o Fc de ratón (Jackson ImmunoResearch, N.º 1 15-115-164) durante 15 a 30 minutos en hielo. Se lavaron las células con D-PBS que contenía 2 % de FBS para eliminar los reactivos de detección secundarios sin unir y las medidas de fluorescencia fueron adquiridas usando un citómetro de flujo HyperCyte (IntelliCyt, Inc.). Los datos fueron analizados utilizando el software HyperCyte.

**Tabla 14:** Unión por FACS de anticuerpos anti-PD-L1 a células HEK293/hPD-L1 y células HEK293 parentales

Anticuerpo	FACS en células parentales HEK293 [MFI]	FACS en células HEK293/hPD-L1 [MFI]	Relación entre células HEK293/hPD-L1 y células HEK293 parentales
H1H9323P	1909	154992	81
H1H9327P	2120	317592	150
H1H9329P	1504	282088	188
H1H9336P	2263	379009	168
H1H9344P2	1691	200976	119
H1H9345P2	1885	228406	121
H1H9351P2	1685	289523	172
H1H9354P2	2204	275839	125
H1H9364P2	2066	323663	157
H1H9373P2	2151	333236	155
H1H9382P2	1473	205563	140
H1H9387P2	1232	323793	263
H1H9396P2	2340	227961	97
H2aM8306N	1286	316485	246
H2aM8307N	1382	73976	54
H2aM8309N	1160	192678	166
H2aM8310N	1357	14918	11
H2aM8312N	1380	158331	115
H2aM8314N	2053	194832	95
H2aM8316N	1601	172104	108
H2aM8317N	1270	67600	53
H2aM8321N	1322	112495	85

Anticuerpo	FACS en células parentales HEK293 [MFI]	FACS en células HEK293/hPD-L1 [MFI]	Relación entre células HEK293/hPD-L1 y células HEK293 parentales
H2aM8323N	2250	163497	73
H2aM8718N	2225	194341	87
H2aM8719N	1272	133399	105
Control de isotipo de IgG de ratón	1273	1115	0,9
Control de isotipo de IgG1 humana	1179	1099	0,9
Control de isotipo de IgG4 humana	1991	1839	0,9

Como se muestra en la Tabla 14, los 25 anticuerpos anti-PD-L1 de la invención mostraron una fuerte unión a las células HEK293/hPD-L1 en comparación con la unión en la línea de HEK293 parental.

#### 5 Ejemplo 8: Bloqueo de la regulación a la baja de linfocitos T inducida por PD-L1 en un ensayo indicador de luciferasa de linfocitos T/APC

La activación de linfocitos T se consigue mediante la estimulación de los receptores de linfocitos T (TCR) que reconocen péptidos específicos presentados por proteínas del complejo de histocompatibilidad mayor de clase I o II en células presentadoras de antígeno (APC). Los TcR activados a su vez inician una cascada de acontecimientos de señalización que pueden ser registrados por los genes indicadores impulsados por factores de transcripción tales como el activador de la proteína 1 (AP-1), el factor nuclear de linfocitos T activados (NFAT) o potenciador de la cadena ligera kappa del factor nuclear de linfocitos B activados (NFkb). La respuesta de linfocitos T se modula a través de la participación de los co-receptores expresados ya sea de forma constitutiva o inducible en los linfocitos T. Uno de estos receptores está programado como proteína de muerte celular 1 (PD-1), un regulador negativo de la actividad de linfocitos T. El PD-1 interactúa con su ligando, PD-L1, que se expresa en las células diana, incluyendo APC o células cancerosas, y esta interacción da como resultado la emisión de señales inhibitorias mediante el reclutamiento de fosfatasa para la señal de TcR, lo que da como resultado la supresión de la señalización positiva.

Se desarrolló un bioensayo para medir la señalización de linfocitos T inducida por la interacción entre las APC y los linfocitos T mediante la utilización de un cultivo mixto derivado de dos líneas de células de mamífero: las células Jurkat (una línea de linfocitos T inmortalizados) y células Raji (una línea de linfocitos B) (Figura 1). Para el primer componente del bioensayo, se transdujeron primero las células E6-1 clon Jurkat (ATCC, N.º TIB-152) con el Cignal Lenti AP-1 Luc Reporter (Qiagen - Sabiosciences, N.º CLS-011L) según las instrucciones del fabricante. El lentivirus codifica el gen de luciferasa de luciérnaga bajo el control de un promotor mínimo CMV, repeticiones en tándem del elemento de respuesta transcripcional inducible por TPA (TRE) y un gen de resistencia a puromicina. La línea celular Jurkat diseñada se transdujo posteriormente con una quimera PD-1 que comprendía el dominio extracelular de PD-1 humano (aminoácidos de 1 a 170 de PD1 humano; número de acceso NP\_005009.2) y los dominios transmembrana y citoplasmático de CD300a humano (aminoácidos de 181 a 299 de CD300a humano; número de acceso NP\_009192.2). La línea celular estable resultante (Jurkat/AP1-Luc/ hPD1-hCD300a) se seleccionó y se mantuvo en RPMI/10 % FBS/ penicilina/estreptomomicina/glutamina suplementada con 500 µg/ml de G418 + 1 µg/ml de puromicina.

Para el segundo componente del bioensayo, las células Raji (ATCC, N.º CCL-86) fueron transducidas con el gen PD-L1 humano (aminoácidos 1-290 de número de acceso NP\_054862.1), que se habían clonado en un sistema de vector lentiviral (pLEX) (Thermo Scientific Biosystems, N.º OHS4735). Las células Raji positivas para PD-L1 (Raji/hPD-L1) se aislaron por FACS utilizando un anticuerpo anti-PD-L1 y se mantuvieron en Iscove/10 % SFB/penicilina/ estreptomomicina/glutamina suplementado con 1 µg/ml de puromicina.

Para simular la interacción APC/linfocitos T, se utilizó un anticuerpo biespecífico compuesto de un brazo Fab que se une a CD3 en los linfocitos T y otro brazo Fab que se une a CD20 en las células Raji (anticuerpo biespecífico CD3xCD20; por ejemplo, como se describe en el documento US20140088295). La presencia de la molécula biespecífica en el ensayo da como resultado la activación del linfocito T y la APC al formar un puente entre las subunidades CD3 en los linfocitos T y CD20 expresado de forma endógena en las células Raji. La ligación de CD3 con anticuerpos anti-CD3 se ha demostrado que conduce a la activación de los linfocitos T. En este bioensayo, los anticuerpos que bloquean la interacción PD1/PD-L1 rescatan la actividad de los linfocitos T mediante la desactivación de la señalización inhibitoria lo que aumenta la activación de AP1-Luc.

En el bioensayo basado en la luciferasa, se usó RPMI 1640 suplementado con 10 % de FBS y penicilina/estreptomomicina/glutamina como medio de ensayo para preparar suspensiones de células y las diluciones de anticuerpo para llevar a cabo el cribado de anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 (mAbs). En el día de la detección, se determinaron los valores de CE<sub>50</sub> de los mAbs anti-PD-L1, en presencia de una concentración fija de

anticuerpo biespecífico CD3xCD20 (30 pM), así como la CE<sub>50</sub> del anticuerpo biespecífico solo. En el siguiente orden, se añadieron las células y reactivos a placas blancas de fondo plano de 96 pocillos. Para las determinaciones de la CE<sub>50</sub> del mAb anti-PD-L1, primero se preparó una concentración fija de anticuerpo biespecífico CD3xCD20 (final 30 pM) y se añadió a los pocillos de las placas de microtitulación. A continuación se añadieron diluciones en serie de doce puntos de mAb anti-PD-L1 y controles (concentraciones finales que van de 1,7 pM a 100 nM; pocillos con medio de ensayo solo). Para la determinación de la CE<sub>50</sub> del anticuerpo biespecífico (solo), se añadió a los pocillos de las placas de microtitulación el anticuerpo biespecífico, a concentraciones finales que van de 0,17 pM a 10 nM (pocillos con medio de ensayo solo), se añadió a los pozos de la placa de microtitulación. Posteriormente, se preparó una suspensión de células Raji/hPD-L1 de 2,5 x 10<sup>6</sup>/ml y se añadieron 20 µl por pocillo (número final de células/5 x 10<sup>4</sup> células por pocillo). Las placas se dejaron a temperatura ambiente (15- minutos), mientras se preparó una suspensión de 2,5 x 10<sup>6</sup>/ml de Jurkat/API-Luc/hPDI (ecto)-hCD300a (TM-cyto). Se añadieron por pocillo 20 µl de la suspensión Jurkat (número final de células/5 x 10<sup>4</sup> células por pocillo). Las placas que contienen el co-cultivo se incubaron durante 5 a 6 horas a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub>. A continuación, se detectó la actividad de luciferasa después de la adición de reactivo ONE-Glo™ (Promega, N.º E6051) y las unidades de luz relativas (RLU) se midieron en un luminómetro Victor. Todas las muestras se ensayaron en duplicado.

Los valores de RLU para cada anticuerpo seleccionado se normalizaron mediante el establecimiento de la condición de ensayo con concentración fija (30 pM) del anticuerpo biespecífico CD3/CD20, pero sin anticuerpo anti-PD-L1 al 100 %. Esta condición corresponde a la máxima respuesta AP1-Luc provocada por la molécula biespecífica en presencia de la señal inhibitora de PD-1/PD-L1. Después de la adición del anticuerpo anti-PD-L1, la señal inhibitora es suprimida, y aquí se muestra el aumento de la estimulación como E<sub>max</sub>, el porcentaje de aumento en la señal en presencia de la dosis del anticuerpo más alta probada (100 nM). Para comparar la potencia de los anticuerpos anti-PD-L1 ensayados, la concentración del anticuerpo a la que el valor de RLU normalizado alcanzó 125 % de activación se determinó a partir de una ecuación logística de cuatro parámetros a través de una curva de respuesta de 12 puntos usando GraphPad Prism. Los resultados se resumen en la Tabla 15.

**Tabla 15:** Anticuerpo anti-PD-L1 que bloquea la inhibición dependiente de PD-1/PD-L1 de la señalización de API-Luc

Anticuerpo	Ensayo antagonista Concentración [M] del anticuerpo al 125 % de activación	Ensayo antagonista Media Emax [%] @ 100 nM
H2aM8306N	3,78E-09	166,8
H2aM8307N	N/A	87,7
H2aM8309N	3,09E-10	180,9
H2aM8310N	N/A	112,8
H2aM8312N	N/A	75,6
H2aM8314N	1,44E-11	234,9
H2aM8316N	1,47E-10	177,4
H2aM8317N	N/A	109,2
H2aM8321N	N/A	116,8
H2aM8323N	2,20E-10	173,3
H2aM8718N	1,51E-10	182,0
H1H9323P	N/A	101,1
H1H9327P	N/A	77,1
H1H9329P	N/A	124,5
H1H9336P	9,81E-11	162,6
H1H9344P2	N/A	98,3
H1H9345P2	N/A	89,2
H1H9351P2	3,44E-10	154,4
H1H9354P2	N/A	89,9
H1H9364P2	7,93E-11	164,5
H1H9373P2	1,34E-10	150,2
H1H9382P2	N/A	86,5
H1H9387P2	1,86E-11	141,2
H1H9396P2	N/A	102,6

Anticuerpo	Ensayo antagonista Concentración [M] del anticuerpo al 125 % de activación	Ensayo antagonista Media Emax [%] @ 100 nM
H1H8314N	6,57E-11	147,9
H1H9364P2	1,62E-10	158,1
H1H9373P2	7,07E-11	152,5
Control de isotipo de mIgG2a	N/A	80,2
Control de isotipo de hIgG1	N/A	96,8
Control de isotipo de hIgG4	N/A	87,6
N/A= no es aplicable porque en las concentraciones probadas estos anticuerpos no activaron el 125 %		

Como se muestra en la Tabla 15, 14 de los 27 anticuerpos anti-PD-L1 de la invención ensayados bloquearon la inhibición de PD-1/PD-L1 con valores de E<sub>max</sub> que van de 234,9 a 138,1. Trece de los 27 anticuerpos anti-PD-L1 de la invención no demostraron bloqueo sustancial de la interacción PD1/PD-L1 cuando se probó en este ensayo. Los controles del isotipo no interfieren con la interacción PD1/PD-L1.

#### Ejemplo 9: eficacia in vivo de los anticuerpos anti-PD-L1

Para determinar el efecto de un número selecto de anticuerpos anti-PD-L1 de la invención en un modelo *in vivo* relevante, se llevó a cabo un estudio de crecimiento tumoral en MC38.ova, que implica la inyección subcutánea de células tumorales e iniciada en diferentes días, en ratones que eran homocigotos para la expresión del dominio extracelular de PD-L1 humano en lugar del dominio extracelular de PD-L1 de ratón (ratones PD-L1 HumIn) con una constitución de la cepa 75 % C57/Bl6/25% 129. Las células MC38.Ova (adenocarcinoma de colon de ratón) fueron diseñadas para expresar ovoalbúmina de pollo con el fin de aumentar la inmunogenicidad del tumor, y para permitir el control de las respuestas inmunitarias de linfocitos T a los péptidos de ovoalbúmina antigénicos bien definidos. En una segunda etapa, las células MC38.Ova se transdujeron con un vector lentiviral que expresa hPD-L1 bajo el promotor SFFV. Las células MC38.Ova positivas para hPD-L1 (MC38.Ova/hPD-L1) se aislaron por FACS utilizando el anticuerpo específico de hPD-L1. Se observó que las células expresaban un nivel bajo de PD-L1 de ratón endógeno.

Para un primer estudio (estudio N.º 1), los ratones se dividieron de forma uniforme de acuerdo con el peso corporal en 5 grupos de tratamiento o control (n = 5 a 8 ratones por grupo). El día 0, los ratones fueron anestesiados por inhalación de isoflurano y luego inyectados por vía subcutánea en el flanco derecho con 1 x 10<sup>6</sup> células MC38.ova/hPD-L1 en suspensión de 100 µl de DMEM. Los grupos de tratamiento fueron inyectados por vía intraperitoneal con 500 µg de cualquiera de uno de los tres anticuerpos anti-PD-L1 de la invención, o uno de los dos anticuerpos de control de isotipo con especificidad irrelevante en los días 3, 7, 10, 14 y 17 del experimento, mientras que un grupo de ratones quedó sin tratamiento.

En un segundo estudio (estudio N.º 2), los ratones humanizados con PD-L1 fueron asignados al azar a 7 grupos de tratamiento (n = 5 a 6 ratones). En el día 0, se implantó a los ratones por vía subcutánea 1 x 10<sup>6</sup> células de MC38.Ova/hPD-L1. Se administró a los ratones por vía intraperitoneal REGN a-PD-L1 ab (H1H8314N o H1H9364P2 o H1H9373P2) o abs de control de isotipo hIgG4 mut o hIgG1 en dosis de 10 mg/kg o 5 mg/kg. Grupos de ratones recibieron anticuerpo en los días 3, 7, 10, 14 y 17.

Los volúmenes de los tumores se controlaron midiendo el calibre dos veces por semana durante la duración del experimento (21 días). El protocolo de administración y tratamiento experimental para los grupos de ratones se muestran en la Tabla 16.

**Tabla 16:** Protocolo de administración y tratamiento experimental para grupos de ratones

Estudio N.º	Muestras probadas	Cantidad de dosis en cada punto temporal de administración	Intervalos de administración
1	Control de isotipo 1	500 µg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H1H8314N	500 µg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H1H9364P2	500 µg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H1H9373P2	500 µg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	Control de isotipo 2	500 µg	Días 3, 7, 10, 14, 17
2	Control de isotipo 1	10 mg/kg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H1H8314N	10 mg/kg	Días 3, 7, 10, 14, 17

Estudio N.º	Muestras probadas	Cantidad de dosis en cada punto temporal de administración	Intervalos de administración
	H1H8314N	5 mg/kg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H1H9364P2	10 mg/kg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H1H9364P2	5 mg/kg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H1H9373P2	10 mg/kg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H1H9373P2	5 mg/kg	Días 3, 7, 10, 14, 17

5 En los estudios, los volúmenes promedios de tumor se controlaron midiendo el calibre dos veces por semana durante la duración del experimento (17 días) y el porcentaje de supervivencia se registró al final del experimento. Además, también se evaluó el número de ratones libres de tumor al final del estudio. Los resultados, expresados como el volumen medio del tumor (mm<sup>3</sup>) (± DE), el porcentaje de supervivencia y el número de ratones libres de tumor se muestran en las Tablas 17 y 18.

**Tabla 17:** Media del volumen del tumor, porcentaje de supervivencia y número de ratones libres de tumor en cada grupo de tratamiento del estudio N.º 1

Anticuerpo	Volumen del tumor, mm <sup>3</sup> media (±DE)		Supervivencia, %		Ratones libres de tumor
	Días 10	Día 17	Día 10	Día 17	Día 17
Control de isotipo 1	65(±27)	148(±109)	100%	100%	0/5 (0%)
Control de isotipo 2	54(±44)	80(±63)	100%	100%	0/5 (0%)
H1H8314N	6(±10)	2(±5)	100%	100%	4/5 (80%)
H1H9364P2	16(±17)	0(±0)	100%	100%	5/5 (100%)
H1H9373P2	13(±14)	0(±0)	100%	100%	5/5 (100%)

10 Como se muestra en la Tabla 17 para el estudio N.º 1, los tres anticuerpos anti-PD-L1 de la invención fueron eficaces en mejorar la regresión del tumor en la dosis de 500 µg/ratón, donde todos los ratones de los grupos de tratamiento que recibieron dos de los anticuerpos, H1H9364P2 y H1H9373P2, estaban libres de tumores en el día 17. En el grupo de tratamiento que recibió uno de los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención, H1H8314N, 4 de cada 5 ratones estaban libres de tumor en el día 17, mientras que 0 de 5 animales estaban libres de tumores en los grupos de control de isotipo. El test posterior ANOVA unidireccional con comparación múltiple de Dunnett reveló una diferencia significativa en los volúmenes tumorales entre los tratamientos con anticuerpos anti-PD-L1 de la invención y el anticuerpo de control de isotipo con un valor de p<0,05.

20 **Tabla 18:** Media del volumen del tumor, porcentaje de supervivencia y número de ratones libres de tumor de cada grupo de tratamiento del estudio N.º 2

Anticuerpo	Volumen del tumor, mm <sup>3</sup> media (DE)				Supervivencia, %				Ratones libres de tumor	Ratones libres de tumor
	Día 10	Día 10	Día 21	Día 21	Día 10	Día 10	Día 21	Día 21	Día 21	Día 21
	10 MPK	5 MPK	10 MPK	5 MPK	10 MPK	5 MPK	10 MPK	5 MPK	10 MPK	5 MPK
Control de isotipo 1	55 (37)	N/A	534 (356)	N/A	100%	N/A	100%	N/A	0/6 (0%)	N/A
H1H8314N	14 (15)	17 (4)	19 (922)	108 (101)	100%	100%	100%	100%	3/6 (50%)	2/5 (40%)
H1H9364P2	18 (10)	23 (10)	34 (81)	231 (238)	100%	100%	100%	100%	5/6 (83%)	1/5 (20%)
H1H9373P2	10 (8)	25 (929)	7 (16)	37 (59)	100%	100%	100%	100%	5/6 (83%)	3/5 (60%)

Como se muestra en la Tabla 18, en el estudio N.º 2, la administración de los anticuerpos anti-PD-L1 seleccionados dio como resultado la inhibición del crecimiento tumoral promoviendo la regresión del tumor. Los tres anticuerpos anti-PD-L1 fueron eficaces en la dosis de 10 mg/kg y 5 mg/kg y promovieron la regresión del tumor en los ratones tratados de una manera dependiente de la dosis a lo largo del curso del experimento, mientras que 0 de 5 animales estaban libres de tumor en el grupo de control. La prueba posterior ANOVA unidireccional con comparación múltiple de Tukey reveló una diferencia significativa en los volúmenes tumorales entre los tratamientos con los anticuerpos anti-PD-L1 y anticuerpos de control de isotipo con valor  $p < 0,05$  o inferior.

**Ejemplo 10: Efectos antitumorales de una combinación de un anticuerpo anti-PD-L1 y un antagonista VEGF en un modelo de tratamiento de tumor temprano de ratón**

Se desarrolló un modelo de tratamiento de tumor temprano para probar la eficacia de una combinación de un anticuerpo anti-PD-L1 y un antagonista del VEGF. En este modelo, la terapia de combinación se administra poco después de la implantación del tumor. El experimento también utiliza un anticuerpo anti-PD-L1 solo y en combinación con el antagonista del VEGF. El anticuerpo anti-PD-L1 utilizado en este experimento fue un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 con secuencias  $V_H/V_L$  del anticuerpo "YW243.55S70", de acuerdo con el documento US20100203056A1 (Genentech, Inc.), siendo el IgG2a de ratón y mostrando reacción cruzada con el PD-L1 de ratón. El antagonista del VEGF utilizado en este experimento fue aflibercept (una molécula quimérica a base de receptor del VEGF, también conocido como "trampa de VEGF" o "VEGFR1R2-Fc $\Delta$ C1(a)", del que se proporciona una descripción completa en la presente memoria). El anticuerpo anti-PD-1 utilizado en este experimento era un anti-PD-1 de ratón clon "RPML-14" con IgG2b de rata (Bio X Cell, West Lebanon, NH).

Para este modelo experimental, se implantaron por vía subcutánea  $1,0 \times 10^6$  células tumorales Colon-26 en ratones BALB/c en el día 0. Comenzando en el día 3, antes del establecimiento de los tumores medibles, los ratones fueron tratados con una de las mono-terapias o terapias de combinación, o una combinación de control, como se expone en la Tabla 19.

**Tabla 19:** Dosificación experimental y grupos de tratamiento

Grupo de tratamiento	Primer agente	Segundo agente
Combinación de control	Control de isotipo de IgG2a (250 $\mu$ g, IP)	Control de hFc (250 $\mu$ g, SC)
Trampa de VEGF solo	Control de isotipo de IgG2a (250 $\mu$ g, IP)	Aflibercept (10 mg/kg, SC)
anti-PD-1 solo	mAb anti-PD-1 RPML-14 (250 $\mu$ g, IP)	Control de hFc (250 $\mu$ g, SC)
anti-PD-L1 solo	mAb anti-PD-L1 (250 $\mu$ g, IP)	Control de hFc (250 $\mu$ g, SC)
Trampa de VEGF + anti-PD-1	mAb anti-PD-1 RPML-14 (250 $\mu$ g, IP)	Aflibercept (10 mg/kg, SC)
Trampa de VEGF + anti-PD-L1	mAb anti-PD-L1 (250 $\mu$ g, IP)	Aflibercept (10 mg/kg, SC)

Los diversos tratamientos se administraron en cinco puntos temporales diferentes durante un período de dos semanas (es decir, inyecciones en el día 3, día 6, día 10, día 13 y día 19).

Los animales de cada grupo de tratamiento se evaluaron en términos de la incidencia de tumor, volumen del tumor, tiempo medio de supervivencia y número de animales libres de tumor en el día 50. La magnitud del crecimiento del tumor se resume en la Figura 2 (curvas de crecimiento del tumor) y la Figura 3 (volumen del tumor en el día 28). Los resultados también se resumen en la Tabla 20.

**Tabla 20:** Ratones libres de tumores después del tratamiento

Grupo de tratamiento	N.º de animales libres de tumor el día 50
Combinación de control	0/10
Trampa de VEGF solo	3/10
anti-PD-1 solo	4/10
anti-PD-L1 solo	5/10
Trampa de VEGF + anti-PD-1	7/10
Trampa de VEGF + anti-PD-L1	9/10

El crecimiento del tumor se redujo sustancialmente en los animales tratados con la combinación de Trampa de VEGF + anticuerpo anti-PD-L1 en comparación con los regímenes de tratamiento que implican cualquiera de los agentes terapéuticos por sí solos (ver las Figuras 2 y 3). Además, la supervivencia se incrementó sustancialmente en el grupo de Trampa de VEGF + anticuerpo anti-PD-L1, con una supervivencia del 90 % de los animales hasta al menos 50 días después de la implantación del tumor. Por el contrario, para los grupos de monoterapia de anti-PD-L1 y Trampa de VEGF, la supervivencia en el día 50 fue solo del 50 % y 30 % respectivamente (véase la Figura 3 y la Tabla 20).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

5 <120> Anticuerpos humanos contra PD-L1

<130> A0029WO01

10 <140> A asignar

<141> Presentado con la presente

<150> 61/930,582

<151> 23-01-204

15 <150> 62/089,549

<151>09-12-2014

<160> 353

20 <170> FastSEQ for Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 363

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

30 <400> 1

```

gagggtgcagc  tgggtggagtc  tgggggaggc  ttgggtccagc  ctgggggggtc  cctgagactc  60
tcctgtgcag  cctctggatt  cacctttagt  aggttttgga  tgagctgggt  ccgccaggct  120
ccaggaagg  ggctggagtg  ggtggccaac  ataaaccaag  atggaactga  gaaatactat  180
gtggactctg  tgaagggccg  attcaccatc  tccagagaca  acgccaagaa  ctactgtat  240
ctgcaaata  acagcctgag  agccggggac  acggctgtgt  attactgtgc  gaatacgtat  300
tacgattttt  ggagtgggtca  ctttgactac  tggggccagg  gaaccctggt  caccgtctcc  360
tca

```

35 <210> 2

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Sintética

<400> 2

# ES 2 711 450 T3

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	Arg	Phe
			20					25					30		
Trp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Asn	Ile	Asn	Gln	Asp	Gly	Thr	Glu	Lys	Tyr	Tyr	Val	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	Gly	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Phe	Trp	Ser	Gly	His	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120								

5 <210> 3  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 3  
 ggattcacct ttagtaggtt ttgg 24

15 <210> 4  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 4

25 Gly Phe Thr Phe Ser Arg Phe Trp  
 1 5

30 <210> 5  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

35 <400> 5  
 ataaaccaag atggaactga gaaa 24

40 <210> 6  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética



# ES 2 711 450 T3

<400> 6

Ile Asn Gln Asp Gly Thr Glu Lys  
1 5

5 <210> 7  
<211> 42  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Sintética

<400> 7  
gcgaatacgt attacgatt ttggagtggc cacttgact ac 42

15 <210> 8  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Sintética

25 <400> 8  
Ala Asn Thr Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly His Phe Asp Tyr  
1 5 10

30 <210> 9  
<211> 321  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Sintética

35 <400> 9  
gacatccaga tgaccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgtc gggccagtca gagtattagt aattgggttg cctgggatca gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaagctcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240  
gatgattttg caacttatta ctgccaacag tatcatagtt attcgtacac ttttgccag 300  
gggaccaagc tggagatcaa a 321

40 <210> 10  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Sintética

<400> 10

ES 2 711 450 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Trp  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu 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  
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Tyr Ser Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

5 <210> 11  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 11  
 cagagtatta gtaattg 18

15 <210> 12  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 12

Gln Ser Ile Ser Asn Trp  
 1 5

25 <210> 13  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

35 <400> 13  
 aaggcgtct 9

40 <210> 14  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

45 <400> 14

# ES 2 711 450 T3

Lys Ala Ser  
1

5  
<210> 15  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10  
<220>  
<223> Sintética

<400> 15  
caacagtatc atagttatc gtacact 27

15  
<210> 16  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20  
<220>  
<223> Sintética

<400> 16

Gln Gln Tyr His Ser Tyr Ser Tyr Thr  
1 5

25  
<210> 17  
<211> 363  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30  
<220>  
<223> Sintética

35  
<400> 17

caggagcacc	tgggtggagtc	tgggggaggc	gtgggtccagc	ctgggagggtc	cctgagactc	60
tcctgtgaag	cgtctggatt	caccttcagt	aactttggca	tgcactgggt	ccgccaggct	120
ccaggcaagg	ggctggagtg	ggtggcagct	ttatggctctg	atggaagtaa	taaatactat	180
gcagactccg	tgaagggtcg	agtcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	cacactgtat	240
ctgcaaataa	acagcctgag	agccgaggac	acggctgtct	attactgtgc	gagagggaga	300
ggagcccccg	gtattccgat	ttttgggtac	tggggccagg	gaaccctggt	caccgtctcc	360
tca						363

40  
<210> 18  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45  
<220>  
<223> Sintética

<400> 18

ES 2 711 450 T3

Gln Glu His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe  
 20 25 30  
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Ala Leu Trp Ser Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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 Gly Arg Gly Ala Pro Gly Ile Pro Ile Phe Gly Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

5 <210> 19  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 19  
 ggattcacct tcagtaactt tggc 24

15 <210> 20  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 20

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Gly  
 1 5

25 <210> 21  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

35 <400> 21  
 ttatggtctg atggaagtaa taaa 24

40 <210> 22  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

45 <400> 22

# ES 2 711 450 T3

Leu Trp Ser Asp Gly Ser Asn Lys  
1 5

5  
<210> 23  
<211> 42  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10  
<220>  
<223> Sintética

<400> 23  
gcgagaggga gaggagcccc cggattccg attttgggt ac 42

15  
<210> 24  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20  
<220>  
<223> Sintética

<400> 24

Ala Arg Gly Arg Gly Ala Pro Gly Ile Pro Ile Phe Gly Tyr  
1 5 10

25  
<210> 25  
<211> 321  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30  
<220>  
<223> Sintética

35  
<400> 25

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttgaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgct gatctatact gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
agattcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctacagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtctacaa cataatagtt accctctcac attcggcgga 300
gggaccaagg tggcgatcaa a 321
    
```

40  
<210> 26  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45  
<220>  
<223> Sintética

<400> 26

ES 2 711 450 T3

Asp	Ile	Gln	Met	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	Gln	Gly	Ile	Arg	Asn	Asp
			20					25					30		
Leu	Gly	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Arg	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Thr	Ala	Ser	Ser	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	Leu	Gln	His	Asn	Ser	Tyr	Pro	Leu
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Ala	Ile	Lys					
			100					105							

5 <210> 27  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 27  
 cagggcatta gaaatgat 18

15 <210> 28  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 28

25 Gln Gly Ile Arg Asn Asp  
 1 5

30 <210> 29  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

35 <400> 29  
 actgcatcc 9

40 <210> 30  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

45 <400> 30

Thr Ala Ser  
 1

# ES 2 711 450 T3

<210> 31  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 31  
 ctacaacata atagttaccc tctcaca            27  
 <210> 32  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Sintética  
 20  
 <400> 32  
   Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Leu Thr  
   1    5  
 <210> 33  
 <211> 390  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Sintética  
 30  
 <400> 33  
   gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggggtc ccttagactc 60  
   tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgagctgggt cgcaggct 120  
   ccaggaagg ggctggagtg ggttggcctg attaaaagga aaactgatgg tgggacaaca 180  
   gactacgctg caccctgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaatagc 240  
   ctgcatctgc aatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaca 300  
   gatgatattg tagttgtacc agctgttatg aggggaatact acttcggtat ggacgtctgg 360  
   ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca    390  
 35  
 <210> 34  
 <211> 130  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 34  
 45

ES 2 711 450 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala  
 20 25 30  
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly Arg Ile Lys Arg Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala  
 50 55 60  
 Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65 70 75 80  
 Leu His Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Thr Thr Asp Asp Ile Val Val Val Pro Ala Val Met Arg Glu  
 100 105 110  
 Tyr Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
 115 120 125  
 Ser Ser  
 130

5 <210> 35  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 35  
 ggattcactt tcagtaacgc ctgg 24

15 <210> 36  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 36

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala Trp  
 1 5

25 <210> 37  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

35 <400> 37  
 attaaaagga aaactgatgg tgggacaaca 30

40 <210> 38  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética



# ES 2 711 450 T3

<400> 38

Ile Lys Arg Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr  
1 5 10

5 <210> 39  
<211> 63  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Sintética

<400> 39

15 accacagatg atattgtagt tgtaccagct gttatgaggg aatactactt cggtatggac 60  
gtc 63

20 <210> 40  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Sintética

25 <400> 40

Thr Thr Asp Asp Ile Val Val Val Pro Ala Val Met Arg Glu Tyr Tyr  
1 5 10 15  
Phe Gly Met Asp Val  
20

30 <210> 41  
<211> 321  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Sintética

<400> 41

40 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgcc ggacaagtca gggcattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240  
gaagatdddg caacttatta ctgtctacag cataataatt acccgtacac ttttggccag 300  
gggaccaagc tggagatcaa a 321

45 <210> 42  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Sintética

50 <400> 42

ES 2 711 450 T3

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10						15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Thr	Ser	Gln	Gly	Ile	Arg	Asn	Asp
			20					25					30		
Leu	Gly	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Arg	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	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	Leu	Gln	His	Asn	Asn	Tyr	Pro	Tyr
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
			100					105							

5 <210> 43  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 43  
 cagggcatta gaaatgat 18

15 <210> 44  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 44

Gln Gly Ile Arg Asn Asp  
 1 5

25 <210> 45  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

<400> 45  
 gctgcatcc 9

35 <210> 46  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Sintética

45 <400> 46

Ala Ala Ser  
 1

ES 2 711 450 T3

<210> 47  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 47  
 ctacagcata ataattacc gtacact 27  
 10  
 <210> 48  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Sintética  
 20  
 <400> 48  
 Leu Gln His Asn Asn Tyr Pro Tyr Thr  
 1 5  
 <210> 49  
 <211> 363  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Sintética  
 30  
 <400> 49  
 caggtgcaat tgggtgcagtc tggggcggag gtgaagaagc ctggggcctc agtgcaggtc 60  
 tcctgcaagg cttctggata ctccctcacc ggctactata tacactgggt gcgacaggcc 120  
 cctggacaag gacttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtggcac caaaaagtat 180  
 gcacacaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcga cacagcctac 240  
 atgattttga gcagtctgat atccgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatgag 300  
 gactggaact ttgggagctg gttcgactcc tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360  
 tca 363  
 35  
 <210> 50  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 50  
 45

# ES 2 711 450 T3

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

5 <210> 51  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 51  
 ggatactcct tcaccggcta ctat 24

15 <210> 52  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 52

Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Tyr  
 1 5

25 <210> 53  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

35 <400> 53  
 atcaacccta acagtggcac caaa 24

40 <210> 54  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

45 <400> 54

# ES 2 711 450 T3

Ile Asn Pro Asn Ser Gly Thr Lys  
1 5

5  
<210> 55  
<211> 42  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10  
<220>  
<223> Sintética

<400> 55  
gcgagagatg aggactggaa cttggggagc tggttcgact cc 42

15  
<210> 56  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20  
<220>  
<223> Sintética

<400> 56

Ala Arg Asp Glu Asp Trp Asn Phe Gly Ser Trp Phe Asp Ser  
1 5 10

25  
<210> 57  
<211> 336  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30  
<220>  
<223> Sintética

35  
<400> 57

gatattgtga	tgaccagac	tccactctcc	tcacctgtca	cccttggaca	gccggcctcc	60
atctcctgca	ggtctagtca	aaccctcgta	cacggtgatg	gaaacacgta	cttgagttgg	120
attcagcaga	ggccaggcca	gcctccgaga	ctcctcattt	ataaggtttc	taatcagttc	180
tctgggggtcc	cagacagatt	cagtggcagt	ggggcagggg	cagatttcac	actgaaaatc	240
agcaggggtgg	aagctgagga	tgtcgggctt	tatttctgca	tgcaagctac	acattttccg	300
atcaccttcg	gccaaggac	acgactggag	attaaa			336

40  
<210> 58  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45  
<220>  
<223> Sintética

<400> 58

ES 2 711 450 T3

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

5 <210> 59  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 59  
 caaacctcg tacacggtga tggaaacacg tac 33

15 <210> 60  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 60

Gln Thr Leu Val His Gly Asp Gly Asn Thr Tyr  
 1 5 10

25 <210> 61  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

35 <400> 61  
 aaggttct 9

40 <210> 62  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

45 <400> 62

Lys Val Ser  
 1

ES 2 711 450 T3

<210> 63  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 63  
 10 atgcaagcta cacatttcc gatcacc 27  
 <210> 64  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Sintética  
 20 <400> 64  
 Met Gln Ala Thr His Phe Pro Ile Thr  
 1 5  
 <210> 65  
 25 <211> 363  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> Sintética  
 <400> 65  
 caggtaacacc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60  
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tacattgggt gcgacaggcc 120  
 cctggacacg ggcttgagtg gatgggatgg ctcaacccta atactggtac cacaaagtat 180  
 atacagaact ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccagcag cacagcctac 240  
 atggagctga ccaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatgag 300  
 gactggaatt atgggagctg gttcgacacc tggggccagc gaaccctggt cacagtctcc 360  
 tca 363  
 35  
 <210> 66  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 66  
 45

ES 2 711 450 T3

Gln	Val	His	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	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	His	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Trp	Leu	Asn	Pro	Asn	Thr	Gly	Thr	Thr	Lys	Tyr	Ile	Gln	Asn	Phe
	50					55					60				
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Thr	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Asp	Glu	Asp	Trp	Asn	Tyr	Gly	Ser	Trp	Phe	Asp	Thr	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120								

5 <210> 67  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 67  
 ggatacacct tcaccggcta ctat 24

15 <210> 68  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 68

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr  
 1 5

25 <210> 69  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

35 <400> 69  
 ctcaacccta atactggtac caca 24

40 <210> 70  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

45 <400> 70



# ES 2 711 450 T3

Leu Asn Pro Asn Thr Gly Thr Thr  
1 5

5  
<210> 71  
<211> 42  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10  
<220>  
<223> Sintética

<400> 71  
gcgagagatg aggactggaa ttatgggagc tggttcgaca cc 42

15  
<210> 72  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20  
<220>  
<223> Sintética

<400> 72

Ala Arg Asp Glu Asp Trp Asn Tyr Gly Ser Trp Phe Asp Thr  
1 5 10

25  
<210> 73  
<211> 336  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30  
<220>  
<223> Sintética

35  
<400> 73

```

gatattgtaa tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtcc aagcctcgta cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120
cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctcttaattt ataagatttc taaccgattc 180
tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcagggg cagatttcac gctgaaaatc 240
agcaggggtgg aagctgagga tgtcgggggt tattactgca tgcaagctac acattttccg 300
atcaccttcg gccaaggac acgactggag attaga 336
    
```

40  
<210> 74  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45  
<220>  
<223> Sintética

<400> 74

ES 2 711 450 T3

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

5 <210> 75  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 75  
 ccaagcctcg tacacagtga tggaaacacc tac 33

15 <210> 76  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 76

Pro	Ser	Leu	Val	His	Ser	Asp	Gly	Asn	Thr	Tyr
1				5					10	

25 <210> 77  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

35 <400> 77  
 aagatttct 9

40 <210> 78  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

45 <400> 78

Lys Ile Ser  
 1

ES 2 711 450 T3

<210> 79  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 79  
 10 atgcaagcta cacatttcc gatcacc 27  
 <210> 80  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Sintética  
 20 <400> 80  
 Met Gln Ala Thr His Phe Pro Ile Thr  
 1 5  
 <210> 81  
 <211> 360  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Sintética  
 30 <400> 81  
 gaggtgcagc tgggtggaatc tgggggaggt gtggtgcggc ctgggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacttttgat gattatggca tgacctgggt ccgccaagct 120  
 ccagggaggg gcctggaatg ggtctctggt attcattggc atggtaaacg cacaggttat 180  
 gcagactctg tgaagggccg attcaccata tccagagaca acgccaagaa atccctgtat 240  
 ctgcaaatga acagtctgaa aggcgaggac acggccttgt atcatttgtt gaggggggga 300  
 atgagtacag gggactgggt cgacccctgg ggccagggaa ccttgggtcat cgtctcctca 360  
 35  
 <210> 82  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 82  
 45

ES 2 711 450 T3

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

5 <210> 83  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 83  
 ggattcactt ttgatgatta tggc 24

15 <210> 84  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 84

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Gly  
 1 5

25 <210> 85  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

35 <400> 85  
 attcattggc atggtaaacg caca 24

40 <210> 86  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

45 <400> 86



# ES 2 711 450 T3

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

5 <210> 91  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 91  
 cagagcatta acagttat 18

15 <210> 92  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 92

Gln Ser Ile Asn Ser Tyr  
 1 5

25 <210> 93  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

<400> 93  
 gttgcatcc 9

35 <210> 94  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Sintética

45 <400> 94

# ES 2 711 450 T3

Val Ala Ser  
1

5  
<210> 95  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10  
<220>  
<223> Sintética

<400> 95  
caacagagtt acagtacccc tccgatcacc 30

15  
<210> 96  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20  
<220>  
<223> Sintética

<400> 96

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr  
1 5 10

25  
<210> 97  
<211> 360  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30  
<220>  
<223> Sintética

35  
<400> 97

```
gagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggt gtggtacggc cggggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatggca tgacctgggt cgcgaagtt 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctctggt attcattgga gtggtagaag cacaggttat 180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccttgt attactgtgc gaggggggga 300
```

```
atgagtacgg gggactgggt cgaccctgg ggccagggaa ccttggtcac cgtctcctca 360
```

40  
<210> 98  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45  
<220>  
<223> Sintética

<400> 98

ES 2 711 450 T3

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Arg	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr
			20					25					30		
Gly	Met	Thr	Trp	Val	Arg	Gln	Val	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Gly	Ile	His	Trp	Ser	Gly	Arg	Ser	Thr	Gly	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	Leu	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Arg	Gly	Gly	Met	Ser	Thr	Gly	Asp	Trp	Phe	Asp	Pro	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115					120								

5 <210> 99  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 99  
 ggattcacct ttgatgatta tggc 24

15 <210> 100  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 100

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Gly  
 1 5

25 <210> 101  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

35 <400> 101  
 attcattgga gtgtagaag caca 24

40 <210> 102  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

45 <400> 102



# ES 2 711 450 T3

Ile His Trp Ser Gly Arg Ser Thr  
1 5

5  
<210> 103  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10  
<220>  
<223> Sintética

<400> 103  
gcgagggggg gaatgagtac gggggactgg ttcgacccc 39

15  
<210> 104  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20  
<220>  
<223> Sintética

<400> 104

Ala Arg Gly Gly Met Ser Thr Gly Asp Trp Phe Asp Pro  
1 5 10

25  
<210> 105  
<211> 324  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30  
<220>  
<223> Sintética

35  
<400> 105

gacatccaga	tgacccagtc	tccatcctcc	ctgtctgcat	ctgtaggaga	cagagtcacc	60
atcacttgcc	gggcaagtca	gagcattagc	agctatttaa	attggtatca	gcagaaacca	120
gggaaagccc	ctaagctcct	gatctatgtt	gcatccagtt	tgcaaagtgg	ggtcccatca	180
aggttcagtg	gcagtggatc	tgggacagat	ttcactctca	ccatcagcag	tctgcaacct	240
gaagatthtg	caacttacta	ctgtcaacag	agttacagta	cccctccgat	caccttcggc	300
caagggacac	gactggagat	taaa				324

40  
<210> 106  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45  
<220>  
<223> Sintética

<400> 106

ES 2 711 450 T3

Asp	Ile	Gln	Met	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	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Val	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	Pro	Pro
				85					90					95	
Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys				
			100					105							

5 <210> 107  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 107  
 cagagcatta gcagctat 18

15 <210> 108  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 108

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 1 5

25 <210> 109  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

<400> 109  
 gttgcatcc 9

35 <210> 110  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Sintética

45 <400> 110

Val Ala Ser  
 1

# ES 2 711 450 T3

```

5
  <210> 111
  <211> 30
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial

  <220>
  <223> Sintética

  <400> 111
10  caacagagtt acagtacccc tccgatcacc      30

  <210> 112
  <211> 10
  <212> PRT
  <213> Secuencia artificial

  <220>
  <223> Sintética

  <400> 112
20
      Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
      1           5           10

  <210> 113
  <211> 345
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial

  <220>
  <223> Sintética

  <400> 113
30
      gaggtgcagt tgggtggagtc tggaggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctaagactc 60
      tcctgtgcag cctctggggt caccgtcggg agtaactaca tgaactgggt ccgtcaggct 120
      ccaggggaagg gactggagtg ggtctcagtt atttatagtg gtggtagtac atactacgca 180
      gattccgtga agggccgatt caccatctcc agactcactt ccaagaacac actgtatctt 240
      caaatgagca gcctgagacc tgaggacacg gccgtgtatt attgtgcgag agggattagg 300
      ggtctggacg tctggggcca agggaccacg gtcaccgtct cttca                    345

  <210> 114
  <211> 115
  <212> PRT
  <213> Secuencia artificial

  <220>
  <223> Sintética

  <400> 114
45

```

# ES 2 711 450 T3

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

5 <210> 115  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 115  
 ggggtcaccg tcggtagtaa ctac 24

15 <210> 116  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 116

Gly Phe Thr Val Gly Ser Asn Tyr  
 1 5

25 <210> 117  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

<400> 117  
 atttatagtg gtgtagtac a 21

40 <210> 118  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

45 <400> 118

# ES 2 711 450 T3

Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr  
 1 5

5 <210> 119  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 119

gcgagagga ttaggggtct ggacgtc 27

15 <210> 120  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 120

Ala Arg Gly Ile Arg Gly Leu Asp Val  
 1 5

25 <210> 121  
 <211> 324  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 121

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gaccattaac atctatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
 gggagagccc ctaggctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagatthtg caacttacta ctgtcaccag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300  
 caagggacac gactggagat taaa 324

40 <210> 122  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 122

# ES 2 711 450 T3

Asp	Ile	Gln	Met	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	Gln	Thr	Ile	Asn	Ile	Tyr
			20					25					30		
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Arg	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	Pro	Pro
				85					90					95	
Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys				
			100					105							

5 <210> 123  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 123  
 cagaccatta acatctat 18

15 <210> 124  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 124

25 Gln Thr Ile Asn Ile Tyr  
 1 5

30 <210> 125  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

35 <400> 125  
 gctgcatcc 9

40 <210> 126  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

45 <400> 126

Ala Ala Ser  
 1

# ES 2 711 450 T3

<210> 127  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 127  
 caccagagtt acagtacccc tccgatcacc 30  
 10  
 <210> 128  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Sintética  
 20  
 <400> 128  
 His Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr  
 1 5 10  
 25  
 <210> 129  
 <211> 345  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 129  
 gaggaacggt tgggtggagtc tggaggagac ttgggtccagc ctgggggggct cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggcat caccgtcggg actaattata tgaactgggt ccgccaggct 120  
 ccaggggaagg gactggagtg ggtctcagtt atttctagcg gtggtataac aactacgca 180  
 gactccgtga agggccgatt cattatgtcc agacaaactt ccaaaaacac gctgtatctt 240  
 cagatgaata gcttggaac tgaggacacg gccgtatatt attgtgagag ggggatcaga 300  
 ggtttggacg tctggggcca agggaccatg gtcaccgtct cctca 345  
 35  
 <210> 130  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 130  
 45

ES 2 711 450 T3

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

5 <210> 131  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 131  
 ggcatcaccg tcgtactaa ttat 24

15 <210> 132  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 132

25 Gly Ile Thr Val Gly Thr Asn Tyr  
 1 5

30 <210> 133  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

35 <400> 133  
 atttctagcg gtggaatac a 21

40 <210> 134  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética



# ES 2 711 450 T3

<400> 134

Ile Ser Ser Gly Gly Asn Thr

1

5

5 <210> 135  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 135  
 gcgaggggga tcagaggttt ggacgtc 27

15 <210> 136  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

25 <400> 136

Ala Arg Gly Ile Arg Gly Leu Asp Val  
 1 5

30 <210> 137  
 <211> 324  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Sintética

<400> 137

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcatgagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggagagccc ctaagctcct gatctttgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatthttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300
caagggacac gactggagat taaa 324
  
```

40 <210> 138  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Sintética

<400> 138

# ES 2 711 450 T3

Asp	Ile	Gln	Met	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	Gln	Ser	Met	Ser	Ser	Tyr
			20					25				30			
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Arg	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Phe	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
				50				55					60		
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	Pro	Pro
				85					90					95	
Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys				
			100						105						

5 <210> 139  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 139  
 cagagcatga gcagctat 18

15 <210> 140  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 140

Gln Ser Met Ser Ser Tyr  
 1 5

25 <210> 141  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

<400> 141  
 gctgcatcc 9

35 <210> 142  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Sintética

45 <400> 142

# ES 2 711 450 T3

Ala Ala Ser  
1

5  
<210> 143  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10  
<220>  
<223> Sintética

<400> 143  
caacagaggt acagtacccc tccgatcacc 30

15  
<210> 144  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20  
<220>  
<223> Sintética

<400> 144

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr  
1 5 10

25  
<210> 145  
<211> 354  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30  
<220>  
<223> Sintética

35  
<400> 145

```

caggtccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagatgc ctgggtcctc ggtgagggtc 60
tcctgcaagg cttctggagg catcttcagc agtttacta tcagttgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgaatg gatgggagag atcatccctg tctttggtag agtaaaactac 180
gcacagaagt tccaggacag agtcatatth accgcgagc aatctacgac tacagcctac 240
atggagctga gcagcctgaa atctggggac acggccgtat atttctgtgc gcgaaattgg 300
ggattaggct ctttttatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc ttca 354

```

40  
<210> 146  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45  
<220>  
<223> Sintética

<400> 146

ES 2 711 450 T3

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

Ala Arg Asn Trp Gly Leu Gly Ser Phe Tyr Ile Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Met Val Thr Val Ser Ser  
 115

5  
 <210> 147  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10  
 <220>  
 <223> Sintética

<400> 147  
 ggaggcatct tcagcagtc tact 24

15  
 <210> 148  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20  
 <220>  
 <223> Sintética

<400> 148

Gly Gly Ile Phe Ser Ser Ser Thr  
 1 5

25  
 <210> 149  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30  
 <220>  
 <223> Sintética

<400> 149  
 atcatccctg tctttggtac agta 24

35  
 <210> 150  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40  
 <220>  
 <223> Sintética

# ES 2 711 450 T3

<400> 150

Ile Ile Pro Val Phe Gly Thr Val  
1 5

5 <210> 151  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Sintética

<400> 151  
gcgcgaaatt ggggattagg ctcttttat atc 33

15 <210> 152  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Sintética

25 <400> 152

Ala Arg Asn Trp Gly Leu Gly Ser Phe Tyr Ile  
1 5 10

30 <210> 153  
<211> 324  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Sintética

<400> 153

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagttttaac ttcaactact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccagact cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatcca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcaa caggctggag 240
cctgaagatt ttggagtgtt ttattgtcag cagtatgaaa gcgcacctg gacgttcggc 300
caagggacca aggtggaat caaa 324
    
```

40 <210> 154  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Sintética

<400> 154

ES 2 711 450 T3

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

5 <210> 155  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 155  
 cagagtttta acttcaacta c 21

15 <210> 156  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 156

Gln Ser Phe Asn Phe Asn Tyr  
 1 5

25 <210> 157  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

<400> 157  
 ggtgcatcc 9

35 <210> 158  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Sintética

45 <400> 158

Gly Ala Ser  
 1

ES 2 711 450 T3

<210> 159  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 159  
 10 cagcagtatg aaagcgcacc ttggacg 27  
 <210> 160  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Sintética  
 20 <400> 160  
 Gln Gln Tyr Glu Ser Ala Pro Trp Thr  
 1 5  
 <210> 161  
 25 <211> 345  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> Sintética  
 <400> 161  
 gaggtgcagc ttgtagagtc tgggggagac ttggtacatc ctggcaggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggttt cccctttgat gagtatgcca tgcactgggt ccggcaagtt 120  
 ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga gtaataataa cataggctat 180  
 gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaaaaa ctccctgtat 240  
 ctacaaatga acagtctgag acctgaggac acggcctttt attactgtgc aaaatctgga 300  
 atctttgact cctggggcca ggaaccctg gtcaccgtct cctca 345  
 35  
 <210> 162  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 162  
 45

ES 2 711 450 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val His Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Asp Glu Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Gly Ile Ser Trp Ser Asn Asn Asn Ile Gly 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 Pro Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Ser Gly Ile Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

5 <210> 163  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 163  
 ggtttccct t gatgagta tgcc 24

15 <210> 164  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 164

Gly Phe Pro Phe Asp Glu Tyr Ala  
 1 5

25 <210> 165  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

35 <400> 165  
 attagttgga gtaataataa cata 24

40 <210> 166  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

45 <400> 166



# ES 2 711 450 T3

Ile Ser Trp Ser Asn Asn Asn Ile  
 1 5

5 <210> 167  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 167

gcaaaatctg gaatcttga ctcc 24

15 <210> 168  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 168

Ala Lys Ser Gly Ile Phe Asp Ser  
 1 5

25 <210> 169  
 <211> 315  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 169

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaagctcc tgatctatgc tgcattcagc ttgcaaagtg gggcccacc acggttcagt 180
ggcgggtggat ctgggacaga tttcactctc accatcagca gtctgagacc tgaagatttt 240
gcaacttact actgtcaaca gagttactgt acccctccga tcaccttcgg ccaagggaca 300
cgactggaga ttaaa 315
  
```

35 <210> 170  
 <211> 105  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 170

ES 2 711 450 T3

Asp Ile Gln Met 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 Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala  
 35 40 45  
 Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Phe  
 65 70 75 80  
 Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Cys Thr Pro Pro Ile Thr Phe  
 85 90 95  
 Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
 100 105

5 <210> 171  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 171  
 cagagcatta gcagctat 18

15 <210> 172  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 172

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 1 5

25 <210> 173  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

35 <400> 173  
 gctgcatcc 9

40 <210> 174  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

45 <400> 174

Ala Ala Ser  
 1

# ES 2 711 450 T3

<210> 175  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 175  
 10 caacagagtt actgtacccc tccgatcacc 30  
 <210> 176  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Sintética  
 20 <400> 176  
 Gln Gln Ser Tyr Cys Thr Pro Pro Ile Thr  
 1 5 10  
 <210> 177  
 <211> 354  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Sintética  
 30  
 <400> 177  
 gaggtgcagc tgggtggagtc cgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttatggca tgcactgggt cgcgccaggct 120  
 ccaggcaagg gactggagtg ggtgacactt atatcatatg agggaaggaa taaatactat 180  
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatt tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaataga acagcctgag agctgaggac acggctgtat attactgtgc gaaagatagg 300  
 accctttacg gtatggacgt ctggggccaa ggaaccacgg tcaccgtctc ctca 354  
 35  
 <210> 178  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 178  
 45

ES 2 711 450 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Thr Leu Ile Ser Tyr Glu Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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 Lys Asp Arg Thr Leu Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

5 <210> 179  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 179  
 ggattcacct tcagtagtta tggc 24

15 <210> 180  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 180

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly  
 1 5

25 <210> 181  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

35 <400> 181  
 atatcatatg aggaaggaa taaa 24

40 <210> 182  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

45 <400> 182

# ES 2 711 450 T3

Ile Ser Tyr Glu Gly Arg Asn Lys  
1 5

5  
<210> 183  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10  
<220>  
<223> Sintética

<400> 183  
gcgaaagata ggacccttta cggatggac gtc 33

15  
<210> 184  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20  
<220>  
<223> Sintética

<400> 184

Ala Lys Asp Arg Thr Leu Tyr Gly Met Asp Val

25 1 5 10

<210> 185  
<211> 363  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30  
<220>  
<223> Sintética

35  
<400> 185

```

caggtcacct tgagggagtc tggctctgcg ctggtgaaaa ccacacagac cctcacactg 60
acctgcacct tctctggggt ctcactcagc actaatagaa tgtgtgtgac ctggatccgt 120
cagcccccag ggaaggccct ggagtggctt gcgcgcattg attgggatgg tgttaaatac 180
tacaacacat ctctgaagac caggctcacc atctccaagg acacctcaa aaaccagggtg 240
gtccttaciaa tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca ctttttactg tgcacggtcg 300
acttcggtga ctttttacta ctttgactac tggggccagc gaaccctggt caccgtctcc 360
tca 363
    
```

40  
<210> 186  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45  
<220>  
<223> Sintética

<400> 186

# ES 2 711 450 T3

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

5 <210> 187  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 187  
 gggttctcac tcagcactaa tagaatgtg 30

15 <210> 188  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 188

Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Asn	Arg	Met	Cys
1				5					10

25 <210> 189  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

35 <400> 189  
 attgattggg atgggttaa a 21

40 <210> 190  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

45 <400> 190



ES 2 711 450 T3

Asp	Ile	Gln	Met	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	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	Pro	Pro
				85					90					95	
Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys				
			100					105							

5 <210> 195  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 195  
 cagagcatta gcagctat 18

15 <210> 196  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 196

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 1 5

25 <210> 197  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

35 <400> 197  
 gctgcatcc 9

40 <210> 198  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

45 <400> 198

Ala Ala Ser  
 1



# ES 2 711 450 T3

```

5
  <210> 199
  <211> 30
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial

  <220>
  <223> Sintética

  <400> 199
10 caacagagtt acagtacccc tccgatcacc      30

  <210> 200
  <211> 10
  <212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

  <220>
  <223> Sintética

20 <400> 200

      Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
      1          5          10

25 <210> 201
  <211> 345
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial

  <220>
30 <223> Sintética

  <400> 201

  gaggtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttgggtccagc cggggggggtc cctgagactc 60
  tcctgtgcag cctctgagtt caccgtcggg accaaccaca tgaactgggt ccgccaggct 120
  ccaggggaagg gactggagtg ggtctcagtt atttatagcg gtggtaaacac attctacgca 180
  gactccgtga agggccgatt caccatctcc agacacactt ccaagaacac gctgtatctt 240
  caaatgaaca gcctgacagc agaggacacg gccgtatatt actgtgocgcg aggattgggg 300
  ggtatggacg tctggggcca agggaccacg gtcaccgtct cctca 345

35

  <210> 202
  <211> 115
  <212> PRT
  <213> Secuencia artificial

40

  <220>
  <223> Sintética

45 <400> 202

```

ES 2 711 450 T3

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

5 <210> 203  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 203  
 gagttcaccg tcggtaccaa ccac 24

15 <210> 204  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 204

Glu Phe Thr Val Gly Thr Asn His  
 1 5

25 <210> 205  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

35 <400> 205  
 atttatagcg gtggtaacac a 21

40 <210> 206  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

45 <400> 206

# ES 2 711 450 T3

Ile Tyr Ser Gly Gly Asn Thr  
1 5

5  
<210> 207  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10  
<220>  
<223> Sintética

<400> 207  
gcgcgaggat tggggggtat ggacgtc 27

15  
<210> 208  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20  
<220>  
<223> Sintética

<400> 208

Ala Arg Gly Leu Gly Gly Met Asp Val  
1 5

25  
<210> 209  
<211> 321  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30  
<220>  
<223> Sintética

35  
<400> 209

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcgagtca ggtcattagc aattatntag cctgggatca gcagaaacca 120
gggaaagtcc ctaggctcct gatctatgct gcatccactt tgcaatcagg ggtcccatct 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagatgttg caacttatta ctgtcaaaag tataacagtg cccctcggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321
    
```

40  
<210> 210  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45  
<220>  
<223> Sintética

<400> 210

ES 2 711 450 T3

Asp Ile Gln Met 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 Gln Val Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Arg 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 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Arg  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

5 <210> 211  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 211  
 caggtcatta gcaattat 18

15 <210> 212  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 212

Gln Val Ile Ser Asn Tyr  
 1 5

25 <210> 213  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

35 <400> 213  
 gctgcatcc 9

40 <210> 214  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

45 <400> 214

Ala Ala Ser  
 1

ES 2 711 450 T3

5 <210> 215  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sintética  
  
 10 <400> 215  
 caaaagtata acagtgcccc tcggacg 27  
  
 15 <210> 216  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 20 <220>  
 <223> Sintética  
  
 <400> 216  
  
 Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Arg Thr  
 1 5  
  
 25 <210> 217  
 <211> 360  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Sintética  
  
 <400> 217  
  
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttgggtccagc gggggggagtc cctgagactt 60  
 tactgtgcag cctctggatt cacctttagt aaatattgga tgaactgggt cgcgccaggct 120  
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaagggag atggaagtga gaaatactat 180  
  
 gtggactctg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactatat 240  
 ctacaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgttt attactgtgc gagagattat 300  
 35 tgggggatcag gctactactt tgacttctgg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca 360  
  
 40 <210> 218  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sintética  
  
 45 <400> 218

# ES 2 711 450 T3

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Arg	Gly	Glu
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Tyr	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Lys	Tyr
			20					25					30		
Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Asn	Ile	Lys	Gly	Asp	Gly	Ser	Glu	Lys	Tyr	Tyr	Val	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	Asp	Tyr	Trp	Gly	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115					120								

5 <210> 219  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 219  
 ggattcacct ttagtaaata ttgg 24

15 <210> 220  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 220

Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr Trp  
 1 5

25 <210> 221  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

35 <400> 221  
 ataaaggag atggaagtga gaaa 24

40 <210> 222  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

45 <400> 222



ES 2 711 450 T3

Asp Ile Gln Met 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 Gln Asn Ile Asn Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Phe Gln Asn Ala Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Asn Thr Pro Leu  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

5 <210> 227  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 227  
 cagaacatta acaactat 18

15 <210> 228  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 228

Gln Asn Ile Asn Asn Tyr  
 1 5

25 <210> 229  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

35 <400> 229  
 gctgcatcc 9

40 <210> 230  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

45 <400> 230

Ala Ala Ser  
 1



# ES 2 711 450 T3

<210> 231  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 231  
 10 caacagagtt acaatacccc gctcact 27  
 <210> 232  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Sintética  
 20 <400> 232  
 Gln Gln Ser Tyr Asn Thr Pro Leu Thr  
 1 5  
 <210> 233  
 <211> 390  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Sintética  
 30 <400> 233  
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttgggtccagt ctgggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt agctattgga tgagctgggt ccgccaggct 120  
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaagcaag atggaagtga gaaatactat 180  
 gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgatgac acggctgtgt attactgtgc gagagatgat 300  
 attgtagtag taccagctcc tatgggatat tactactact acttcggtat ggacgtctgg 360  
 ggccaagga ccacggteac cgtctcctca 390  
 35  
 <210> 234  
 <211> 130  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 234  
 45

ES 2 711 450 T3

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Ser	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		
Trp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Asn	Ile	Lys	Gln	Asp	Gly	Ser	Glu	Lys	Tyr	Tyr	Val	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	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Asp	Asp	Ile	Val	Val	Val	Pro	Ala	Pro	Met	Gly	Tyr	Tyr	Tyr
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Phe	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val
		115					120						125		
Ser	Ser														
	130														

5 <210> 235  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 235  
 ggattcacct ttagtagcta ttgg 24

15 <210> 236  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 236  
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp  
 1 5

25 <210> 237  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

35 <400> 237  
 ataaagcaag atggaagtga gaaa 24

40 <210> 238  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética



# ES 2 711 450 T3

Asp	Ile	Gln	Met	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	Gln	Gly	Ile	Arg	Asn	Asp
		20						25					30		
Leu	Gly	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Arg	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	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	Leu	Gln	His	Asn	Ser	Tyr	Pro	Tyr
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
			100					105							

5 <210> 243  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 243  
 cagggcatta gaaatgat 18

15 <210> 244  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 244

25 Gln Gly Ile Arg Asn Asp  
 1 5

30 <210> 245  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

35 <400> 245  
 gctgcatcc 9

40 <210> 246  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

45 <400> 246

Ala Ala Ser  
 1

ES 2 711 450 T3

<210> 247  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 247  
 10 ctacagcata atagttaccc gtacact 27  
 <210> 248  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Sintética  
 20 <400> 248  
 Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr  
 1 5  
 <210> 249  
 25 <211> 369  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> Sintética  
 <400> 249  
 gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggttcagc ctggcaggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattttgcca tgcactgggt ccgacaagct 120  
 ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga ctggtggtaa catggactat 180  
 gcgaactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagagg acgccaagaa ttccctgtat 240  
 ctgcaaataga acagtctgag agctgcggac acggccttgt attactgtgt aaaagatata 300  
 agggggatag tggctacggg gggggccttt gatatctggg gccgaggggac aatggtcacc 360  
 gtctcttca 369  
 35  
 <210> 250  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 250  
 45

ES 2 711 450 T3

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

5 <210> 251  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 251  
 ggattcacct ttgatgatt tgcc 24

15 <210> 252  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 252

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Phe Ala  
 1 5

25 <210> 253  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

35 <400> 253  
 attagttgga ctggtggtaa catg 24

40 <210> 254  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

45 <400> 254

# ES 2 711 450 T3

Ile Ser Trp Thr Gly Gly Asn Met  
1 5

5  
<210> 255  
<211> 48  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10  
<220>  
<223> Sintética

<400> 255  
gtaaaagata taaggggat agtggctacg ggggggctt ttgatatc 48

15  
<210> 256  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20  
<220>  
<223> Sintética

<400> 256

Val Lys Asp Ile Arg Gly Ile Val Ala Thr Gly Gly Ala Phe Asp Ile  
1 5 10 15

25  
<210> 257  
<211> 321  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30  
<220>  
<223> Sintética

35  
<400> 257

```

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atctcttgcc gggcaagtca gaccattagc acttatttaa attggtttca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatggt gtgtccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatthttg caacttatta ctgtcaacag agttacagta cccattcac tttcggcct 300
gggaccaaaag tggatatcaa a 321
    
```

40  
<210> 258  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45  
<220>  
<223> Sintética

<400> 258

# ES 2 711 450 T3

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

- 5 <210> 259
- <211> 18
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> Sintética
- 10 <400> 259
- cagaccatta gcacttat 18
  
- 15 <210> 260
- <211> 6
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- 20 <220>
- <223> Sintética
  
- <400> 260
  
- 25 Gln Thr Ile Ser Thr Tyr
- 1 5
  
- 30 <210> 261
- <211> 9
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- 35 <220>
- <223> Sintética
  
- <400> 261
- gttgtgtcc 9
  
- 40 <210> 262
- <211> 3
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> Sintética
  
- 45 <400> 262





ES 2 711 450 T3

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

5 <210> 267  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 267  
 ggattcaccg tcggtaccaa ctac 24

15 <210> 268  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 268

25 Gly Phe Thr Val Gly Thr Asn Tyr  
 1 5

30 <210> 269  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

35 <400> 269  
 atttatagcg gtggtagcac a 21

40 <210> 270  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

ES 2 711 450 T3

<400> 270

Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr  
1 5

5 <210> 271  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Sintética

<400> 271  
gcgagaggta tacgtgggtt tgatatc 27

15 <210> 272  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Sintética

25 <400> 272

Ala Arg Gly Ile Arg Gly Phe Asp Ile  
1 5

30 <210> 273  
<211> 324  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Sintética

<400> 273

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccgtca 180  
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
gaagatthttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300  
caagggacac gactggagat taaa 324

40 <210> 274  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Sintética

<400> 274

# ES 2 711 450 T3

Asp	Ile	Gln	Met	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	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	Pro	Pro
				85					90					95	
Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys				
			100					105							

5 <210> 275  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 275  
 cagagcatta gcagctat 18

15 <210> 276  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 276

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 1 5

25 <210> 277  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

35 <400> 277  
 gctgcatcc 9

40 <210> 278  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

45 <400> 278

# ES 2 711 450 T3

Ala Ala Ser  
1

5  
<210> 279  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10  
<220>  
<223> Sintética

<400> 279  
caacagagtt acagtacccc tccgatcacc 30

15  
<210> 280  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20  
<220>  
<223> Sintética

<400> 280

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr  
1 5 10

25  
<210> 281  
<211> 345  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30  
<220>  
<223> Sintética

35  
<400> 281

gaggtgcagc	tgggtggagtc	tggaggaggc	ttgggtccagc	cggggggggtc	cctgagactc	60
tccctgtgcag	cctctggggtt	taccatcagt	accaactaca	tgaactgggt	ccgccaggct	120
ccaggggaagg	ggctggagtg	ggtcgcagtt	atltatagca	gtggttccac	atactataatc	180
gactccgtga	agggccgatt	caccatctcc	agactcactt	ccaagaacac	gggtgatctt	240
caaatgagca	gcctgaattc	tgaagacacg	gccgtgtatt	actgtgcbag	ggggatcagg	300
ggttttgata	tttggggcca	agggacaatg	gtcaccgtct	cttca		345

40  
<210> 282  
<211> 115  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45  
<220>  
<223> Sintética

<400> 282

ES 2 711 450 T3

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 Ile Ser Thr Asn  
 20 25 30  
 Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Val Ile Tyr Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ile Asp Ser Val Lys  
 50 55 60  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Leu Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Met Ser Ser Leu Asn Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95  
 Arg Gly Ile Arg Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

5 <210> 283  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 283  
 gggttacca tcagtaccaa ctac 24

15 <210> 284  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 284

25 Gly Phe Thr Ile Ser Thr Asn Tyr  
 1 5

30 <210> 285  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

35 <400> 285  
 atttatagca gtggtccac a 21

40 <210> 286  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

# ES 2 711 450 T3

<400> 286

Ile Tyr Ser Ser Gly Ser Thr  
1 5

5 <210> 287  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Sintética

<400> 287  
gcgaggggga tcaggggtt tgatatt 27

15 <210> 288  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Sintética

25 <400> 288

Ala Arg Gly Ile Arg Gly Phe Asp Ile  
1 5

30 <210> 289  
<211> 372  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Sintética

<400> 289

```

gaagtgcagc tgggtggagtc ggggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccattgat gatagtgcca tgcactgggt ccggcaaact 120
ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga aaagtggtag cataggttat 180
gcggaactctg tgaggggccc attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ttccctctat 240
ctgcaaataga acagtctgag agttgaggac acggccttgt attactgtgt aaaagatata 300
aggggcaact ggaactacgg gggaaactgg ttcgaccctt ggggccaggg aaccctggtc 360
actgtctcct ca 372
    
```

40 <210> 290  
<211> 124  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Sintética

<400> 290

ES 2 711 450 T3

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 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asp Asp Ser  
 20 25 30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Gly Ile Ser Trp Lys Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Arg 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 Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Lys Asp Ile Arg Gly Asn Trp Asn Tyr Gly Gly Asn Trp Phe Asp

100 105 110  
 Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

5  
 <210> 291  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10  
 <220>  
 <223> Sintética

<400> 291  
 ggattcacca ttgatgatag tgcc 24

15  
 <210> 292  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20  
 <220>  
 <223> Sintética

<400> 292

Gly Phe Thr Ile Asp Asp Ser Ala  
 1 5

25  
 <210> 293  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30  
 <220>  
 <223> Sintética

<400> 293  
 attagttgga aaagtggtag cata 24

35  
 <210> 294  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40  
 <220>  
 <223> Sintética



# ES 2 711 450 T3

<400> 294

Ile Ser Trp Lys Ser Gly Ser Ile  
1 5

5 <210> 295  
<211> 51  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Sintética

<400> 295  
gtaaaagata taaggggcaa ctggaactac gggggaaact ggctcgacct c 51

15 <210> 296  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Sintética

25 <400> 296

Val Lys Asp Ile Arg Gly Asn Trp Asn Tyr Gly Gly Asn Trp Phe Asp  
1 5 10 15  
Pro

30 <210> 297  
<211> 345  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Sintética

<400> 297

```

gaggtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttgggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcatgtgaag cctctggggt caccgtcggg gtcaaccaca tgaactgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctggagtg ggtctcagtt attttcagta gtggtaggac attctacgga 180
gactacgtga aggggcgatt aaccatcttc agacaaacct cccagaacac ggtgtatctt 240
caaatgaata gcttgagaag tgaggacacg gccatatatt actgtgagag agggattggc 300
ggttttgaca tctggggccg agggacaatg gtcaccgtct cttca 345
    
```

40 <210> 298  
<211> 115  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Sintética

<400> 298

# ES 2 711 450 T3

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	Glu	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Val	Gly	Val	Asn
			20					25					30		
His	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40						45			
Ser	Val	Ile	Phe	Ser	Ser	Gly	Arg	Thr	Phe	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Val	Lys
	50					55					60				
Gly	Arg	Leu	Thr	Ile	Phe	Arg	Gln	Thr	Ser	Gln	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu
65					70					75					80
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85					90					95	
Arg	Gly	Ile	Gly	Gly	Leu	Asp	Ile	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Met	Val	Thr
			100					105					110		

Val Ser Ser  
115

5 <210> 299  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Sintética

<400> 299  
gggttcaccg tcggtgtcaa ccac 24

15 <210> 300  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Sintética

<400> 300

25 Gly Phe Thr Val Gly Val Asn His  
1 5

30 <210> 301  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Sintética

<400> 301  
athttcagta gtggttaggac a 21

40 <210> 302  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Sintética

# ES 2 711 450 T3

<400> 302

Ile Phe Ser Ser Gly Arg Thr  
1 5

5 <210> 303  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Sintética

<400> 303  
gcgagagga ttggcggttt ggacatc 27

15 <210> 304  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Sintética

25 <400> 304

Ala Arg Gly Ile Gly Gly Leu Asp Ile  
1 5

30 <210> 305  
<211> 369  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Sintética

<400> 305

```

gaagtgcagc ttggtggagtc tgggggaggc ttggttcagc ctggcaggtc cctaagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgcct tgcactgggt cgggcaagct 120
ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga ctggtggtac tatagactat 180
gcggaactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga gcagtctgag aactgaggac acggccatat attactgtac aagagatata 300
cgggggaact ggaagtacgg aggctggttc gaccctctggg gccagggaac cctggtcacc 360
gtctcctca 369
    
```

40 <210> 306  
<211> 123  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Sintética

<400> 306

# ES 2 711 450 T3

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	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr
			20					25					30		
Ala	Leu	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Gly	Ile	Ser	Trp	Thr	Gly	Gly	Thr	Ile	Asp	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	Ser	Ser	Leu	Arg	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Thr	Arg	Asp	Ile	Arg	Gly	Asn	Trp	Lys	Tyr	Gly	Gly	Trp	Phe	Asp	Pro
			100					105					110		
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
		115					120								

5 <210> 307  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 307  
 ggattcacct ttgatgatta tgcc 24

15 <210> 308  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 308

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala  
 1 5

25 <210> 309  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

35 <400> 309  
 attagttgga ctggtgtac tata 24

40 <210> 310  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

45 <400> 310

# ES 2 711 450 T3

Ile Ser Trp Thr Gly Gly Thr Ile  
1 5

5  
<210> 311  
<211> 48  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10  
<220>  
<223> Sintética

<400> 311  
acaagagata tccgggggaa ctggaagtac ggaggctggt tcgacccc 48

15  
<210> 312  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20  
<220>  
<223> Sintética

<400> 312

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

25

30  
<210> 313  
<211> 360  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35  
<220>  
<223> Sintética

<400> 313

caggtgcagc tgggtgcagtc tgggactgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60  
tcttgcaagg cttctggata caccttcacc gcctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120  
cctgggtcaag gacttgactg gatgggatgg atcagcccta acagtggttt cacaaactat 180  
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcaa cacattttat 240  
atggagctga gtggactgag atctgacgac acggccgtat attactgtgc gcgagagggt 300  
tctactcacc acaattcttt cgaccctggt ggccagggaa ccttggtcac cgtctcctca 360

40  
<210> 314  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45  
<220>  
<223> Sintética

<400> 314

# ES 2 711 450 T3

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

5 <210> 315  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 315  
 ggatacacct tcaccgcta ctat 24

15 <210> 316  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 316

Gly Tyr Thr Phe Thr Ala Tyr Tyr  
 1 5

25 <210> 317  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

35 <400> 317  
 atcagcccta acagtggttt caca 24

40 <210> 318  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

45 <400> 318

# ES 2 711 450 T3

Ile Ser Pro Asn Ser Gly Phe Thr  
1 5

5  
<210> 319  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10  
<220>  
<223> Sintética

<400> 319  
gcgcgagagg gttctactca ccacaattct ttogacccc 39

15  
<210> 320  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20  
<220>  
<223> Sintética

<400> 320

Ala Arg Glu Gly Ser Thr His His Asn Ser Phe Asp Pro  
1 5 10

25  
<210> 321  
<211> 342  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30  
<220>  
<223> Sintética

35  
<400> 321

gaggtgcagc	tgggtggagtc	tggaggaggc	ttgggtccaac	cggggggggtc	cctgaggctc	60
tctctgtgcag	cctctggggt	caccgtcggc	actaacttca	tgaattgggt	cggccaggct	120
ccaggaagg	ggctggagtg	ggtctcagcg	atztatagcg	gtggtaccgc	taactacgca	180
gactccgtga	agggccgatt	caccatttcc	agagacactt	ccaggaacac	gctgtatctt	240
caaatgaaca	gcctgagaac	tgaggacacg	gccgtttatt	attgtgagcg	aggggggggt	300
atggacgtct	ggggccaagg	gaccacggtc	accgtctctc	ca		342

40  
<210> 322  
<211> 114  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45  
<220>  
<223> Sintética

<400> 322

ES 2 711 450 T3

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

5 <210> 323  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 323  
 gggttcaccg tcggtactaa cttc 24

15 <210> 324  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 324

Gly Phe Thr Val Gly Thr Asn Phe  
 1 5

25 <210> 325  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

35 <400> 325  
 atttatagcg gttgtaccgc t 21

40 <210> 326  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

45 <400> 326



# ES 2 711 450 T3

Ile Tyr Ser Gly Gly Thr Ala  
1 5

5  
<210> 327  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10  
<220>  
<223> Sintética

<400> 327  
gcgagagggg ggggtatgga cgtc 24

15  
<210> 328  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20  
<220>  
<223> Sintética

<400> 328

Ala Arg Gly Gly Gly Met Asp Val  
1 5

25  
<210> 329  
<211> 354  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30  
<220>  
<223> Sintética

35  
<400> 329

```

caggtccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg ctcttgaggg caccttcaac acctatgttc tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggagag atcatcccta tcttaggtgc agcaaacctac 180
gcacagaact tccagggcag agtcactttt accacggacg aatccacgaa tacagcctac 240
atggacctga gcagcctaag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatcgg 300
acctccgggg ggttcgacct ctggggccag ggaacctgg tcaactgtctc ctca 354

```

40  
<210> 330  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45  
<220>  
<223> Sintética

<400> 330

ES 2 711 450 T3

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

5 <210> 331  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 331  
 ggaggcacct tcaacaccta tggt 24

15 <210> 332  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 332

Gly Gly Thr Phe Asn Thr Tyr Val  
 1 5

25 <210> 333  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

35 <400> 333  
 atcatcccta tcttaggtgc agca 24

40 <210> 334  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

45 <400> 334

# ES 2 711 450 T3

Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ala Ala  
1 5

5  
<210> 335  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10  
<220>  
<223> Sintética

<400> 335  
gcgagagatc ggacctccgg ggggttcgac ccc 33

15  
<210> 336  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20  
<220>  
<223> Sintética

<400> 336

Ala Arg Asp Arg Thr Ser Gly Gly Phe Asp Pro  
1 5 10

25  
<210> 337  
<211> 357  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30  
<220>  
<223> Sintética

35  
<400> 337

```

caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtggagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctgggta catctttacc cactatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag gacttgagtg ggtgggctgg atcagccctt acaatgggta cacagactat 180
gcacagaaac tccagggcag agtcaccttg accacagaca catccacgac cacagcctac 240
atggagctga ggaacctgag atctgacgac acggccatgt attactgttc gagagggagg 300
ggcccttact ggtccttcga tctctggggc cgtggcacc cgtggcacc tggtcaccgt ctctca 357
    
```

40  
<210> 338  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45  
<220>  
<223> Sintética

<400> 338

# ES 2 711 450 T3

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

5 <210> 339  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 339  
 ggttacatct ttaccacta tggc 24

15 <210> 340  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 340

25 Gly Tyr Ile Phe Thr His Tyr Gly  
 1 5

30 <210> 341  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

35 <400> 341  
 atcagccctt acaatggta caca 24

40 <210> 342  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

45 <400> 342

# ES 2 711 450 T3

Ile Ser Pro Tyr Asn Gly Tyr Thr  
1 5

5 <210> 343  
<211> 36  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Sintética

<400> 343  
tcgagagga ggggcccta ctggtcctc gatctc 36

15 <210> 344  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Sintética

<400> 344

Ser Arg Gly Arg Gly Pro Tyr Trp Ser Phe Asp Leu  
1 5 10

25 <210> 345  
<211> 249  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> hPD-LI-MMH

35 <220>  
<223> 1-221: aa 19-239 of NP\_054862.1

<220>  
<223> 222-249: myc-myc-hexahistidine tag

40 <400> 345

ES 2 711 450 T3

Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu  
 20 25 30  
 Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln  
 35 40 45  
 Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg  
 50 55 60  
 Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys  
 85 90 95  
 Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val  
 100 105 110  
 Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro  
 115 120 125  
 Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys  
 130 135 140  
 Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys  
 145 150 155 160  
 Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr  
 165 170 175  
 Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr  
 180 185 190  
 Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile  
 195 200 205  
 Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr Glu Gln Lys  
 210 215 220  
 Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu  
 225 230 235 240  
 Glu Asp Leu His His His His His His

<210> 346  
 <211> 249  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> MfPD-L1-MMH

10

<220>  
 <223> 1-221:MfPD-L1

15

<220>  
 <223> 222-249: myc-myc-hexahistidine tag

<400> 346

ES 2 711 450 T3

Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu  
 20 25 30  
 Thr Ser Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln  
 35 40 45  
 Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Asn Tyr Arg  
 50 55 60  
 Gln Arg Ala Gln Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala  
 65 70 75 80  
 Leu Arg Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys  
 85 90 95  
 Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val  
 100 105 110  
 Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Asp Pro  
 115 120 125  
 Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys  
 130 135 140  
 Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys  
 145 150 155 160  
 Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Leu Asn Val Thr  
 165 170 175  
 Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Ala Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Ile  
 180 185 190  
 Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile  
 195 200 205  
 Pro Glu Leu Pro Leu Ala Leu Pro Pro Asn Glu Arg Thr Glu Gln Lys  
 210 215 220  
 Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu  
 225 230 235 240  
 Glu Asp Leu His His His His His His  
 245

<210> 347  
 <211> 448  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> hPD-L1-hFc

<220>  
 <223> 1-221: aa 19-239 of NP\_054862.1

<220>  
 <223> 222-448: aa 104-330 of P01857

<400> 347

Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser

ES 2 711 450 T3

1				5					10				15		
Asn	Met	Thr	Ile	Glu	Cys	Lys	Phe	Pro	Val	Glu	Lys	Gln	Leu	Asp	Leu
			20					25					30		
Ala	Ala	Leu	Ile	Val	Tyr	Trp	Glu	Met	Glu	Asp	Lys	Asn	Ile	Ile	Gln
		35					40					45			
Phe	Val	His	Gly	Glu	Glu	Asp	Leu	Lys	Val	Gln	His	Ser	Ser	Tyr	Arg
	50					55					60				
Gln	Arg	Ala	Arg	Leu	Leu	Lys	Asp	Gln	Leu	Ser	Leu	Gly	Asn	Ala	Ala
65				70						75					80
Leu	Gln	Ile	Thr	Asp	Val	Lys	Leu	Gln	Asp	Ala	Gly	Val	Tyr	Arg	Cys
				85					90					95	
Met	Ile	Ser	Tyr	Gly	Gly	Ala	Asp	Tyr	Lys	Arg	Ile	Thr	Val	Lys	Val
			100					105					110		
Asn	Ala	Pro	Tyr	Asn	Lys	Ile	Asn	Gln	Arg	Ile	Leu	Val	Val	Asp	Pro
		115					120					125			
Val	Thr	Ser	Glu	His	Glu	Leu	Thr	Cys	Gln	Ala	Glu	Gly	Tyr	Pro	Lys
	130					135					140				
Ala	Glu	Val	Ile	Trp	Thr	Ser	Ser	Asp	His	Gln	Val	Leu	Ser	Gly	Lys
145					150					155					160
Thr	Thr	Thr	Thr	Asn	Ser	Lys	Arg	Glu	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Val	Thr
				165					170					175	
Ser	Thr	Leu	Arg	Ile	Asn	Thr	Thr	Thr	Asn	Glu	Ile	Phe	Tyr	Cys	Thr
			180					185					190		
Phe	Arg	Arg	Leu	Asp	Pro	Glu	Glu	Asn	His	Thr	Ala	Glu	Leu	Val	Ile
		195					200					205			
Pro	Glu	Leu	Pro	Leu	Ala	His	Pro	Pro	Asn	Glu	Arg	Thr	Asp	Lys	Thr
	210					215					220				
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
225					230					235					240
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
				245					250					255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
			260					265					270		
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
		275					280					285			
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
	290					295					300				
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
305					310					315					320
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
				325					330					335	
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
			340					345					350		
Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
		355					360					365			
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
		370				375					380				
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
385					390						395				400
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
				405					410					415	
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
			420					425					430		
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys
		435					440						445		



ES 2 711 450 T3

<211> 454  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> hPD-L1-mFc

10 <220>  
<223> 1-221: aa 19-239 of NP\_054862.1

<220>  
<223> 222-454: aa 98-330 of P01863

15 <400> 348

ES 2 711 450 T3

Phe	Thr	Val	Thr	Val	Pro	Lys	Asp	Leu	Tyr	Val	Val	Glu	Tyr	Gly	Ser
1				5					10					15	
Asn	Met	Thr	Ile	Glu	Cys	Lys	Phe	Pro	Val	Glu	Lys	Gln	Leu	Asp	Leu
			20					25					30		
Ala	Ala	Leu	Ile	Val	Tyr	Trp	Glu	Met	Glu	Asp	Lys	Asn	Ile	Ile	Gln
		35					40					45			
Phe	Val	His	Gly	Glu	Glu	Asp	Leu	Lys	Val	Gln	His	Ser	Ser	Tyr	Arg
	50					55					60				
Gln	Arg	Ala	Arg	Leu	Leu	Lys	Asp	Gln	Leu	Ser	Leu	Gly	Asn	Ala	Ala
65					70					75					80
Leu	Gln	Ile	Thr	Asp	Val	Lys	Leu	Gln	Asp	Ala	Gly	Val	Tyr	Arg	Cys
				85					90					95	
Met	Ile	Ser	Tyr	Gly	Gly	Ala	Asp	Tyr	Lys	Arg	Ile	Thr	Val	Lys	Val
			100					105					110		
Asn	Ala	Pro	Tyr	Asn	Lys	Ile	Asn	Gln	Arg	Ile	Leu	Val	Val	Asp	Pro
		115					120					125			
Val	Thr	Ser	Glu	His	Glu	Leu	Thr	Cys	Gln	Ala	Glu	Gly	Tyr	Pro	Lys
	130					135					140				
Ala	Glu	Val	Ile	Trp	Thr	Ser	Ser	Asp	His	Gln	Val	Leu	Ser	Gly	Lys
145					150					155					160
Thr	Thr	Thr	Thr	Asn	Ser	Lys	Arg	Glu	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Val	Thr
				165					170					175	
Ser	Thr	Leu	Arg	Ile	Asn	Thr	Thr	Thr	Asn	Glu	Ile	Phe	Tyr	Cys	Thr
			180					185					190		
Phe	Arg	Arg	Leu	Asp	Pro	Glu	Glu	Asn	His	Thr	Ala	Glu	Leu	Val	Ile
		195					200					205			
Pro	Glu	Leu	Pro	Leu	Ala	His	Pro	Pro	Asn	Glu	Arg	Thr	Glu	Pro	Arg
	210					215					220				
Gly	Pro	Thr	Ile	Lys	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn
225					230					235					240
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp
				245					250					255	
Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu	Ser	Pro	Ile	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
			260					265					270		
Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn
		275					280					285			
Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn
	290					295					300				
Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp
305					310					315					320
Met	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro
				325					330					335	
Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg	Ala
			340					345					350		
Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Lys
		355					360					365			

ES 2 711 450 T3

Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile  
 370 375 380  
 Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn  
 385 390 395 400  
 Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys  
 405 410 415  
 Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys  
 420 425 430  
 Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe  
 435 440 445  
 Ser Arg Thr Pro Gly Lys  
 450

- 5 <210> 349
- <211> 379
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- 10 <220>
- <223> hPD-1-mFc
  
- <220>
- <223> 1-146: aa 25-170 of NP\_005009.2 with C93S
  
- 15 <220>
- <223> 147-379: aa 98-330 of P01863
  
- <400> 349

ES 2 711 450 T3

Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe  
 20 25 30  
 Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro  
 35 40 45  
 Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln  
 50 55 60  
 Pro Gly Gln Asp Ser Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg  
 65 70 75 80  
 Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr  
 85 90 95  
 Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu  
 100 105 110  
 Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro  
 115 120 125  
 Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr  
 130 135 140  
 Leu Val Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys  
 145 150 155 160  
 Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro  
 165 170 175  
 Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr  
 180 185 190  
 Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser  
 195 200 205  
 Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His  
 210 215 220  
 Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile  
 225 230 235 240  
  
 Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn  
 245 250 255  
 Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys  
 260 265 270  
 Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu  
 275 280 285  
 Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe  
 290 295 300  
 Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu  
 305 310 315 320  
 Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr  
 325 330 335  
 Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg  
 340 345 350  
 Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His  
 355 360 365  
 Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys  
 370 375

<210> 350  
 <211> 373  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> hPD-1-hFc

ES 2 711 450 T3

<220>

<223> 1-146: aa 25-170 of NP\_005009.2 with C93S

<220>

5 <223> 147-373: aa 104-330 of P01857

<400> 350

Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe  
 20 25 30  
 Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro  
 35 40 45  
 Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln  
 50 55 60  
 Pro Gly Gln Asp Ser Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg  
 65 70 75 80  
 Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr  
 85 90 95  
 Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu  
 100 105 110  
 Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro  
 115 120 125  
 Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr  
 130 135 140  
 Leu Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 145 150 155 160  
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 165 170 175  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 180 185 190

10

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 195 200 205  
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 210 215 220  
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 225 230 235 240  
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 245 250 255  
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 260 265 270  
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
 275 280 285  
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 290 295 300  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 305 310 315 320  
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 325 330 335  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 340 345 350  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 355 360 365  
 Leu Ser Pro Gly Lys  
 370

ES 2 711 450 T3

<210> 351  
 <211> 290  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> hPD-L1 NP\_054862.1

10

<400> 351

Met	Arg	Ile	Phe	Ala	Val	Phe	Ile	Phe	Met	Thr	Tyr	Trp	His	Leu	Leu
1				5					10					15	
Asn	Ala	Phe	Thr	Val	Thr	Val	Pro	Lys	Asp	Leu	Tyr	Val	Val	Glu	Tyr
			20					25					30		
Gly	Ser	Asn	Met	Thr	Ile	Glu	Cys	Lys	Phe	Pro	Val	Glu	Lys	Gln	Leu
		35					40					45			
Asp	Leu	Ala	Ala	Leu	Ile	Val	Tyr	Trp	Glu	Met	Glu	Asp	Lys	Asn	Ile
	50					55					60				
Ile	Gln	Phe	Val	His	Gly	Glu	Glu	Asp	Leu	Lys	Val	Gln	His	Ser	Ser
65					70					75					80
Tyr	Arg	Gln	Arg	Ala	Arg	Leu	Leu	Lys	Asp	Gln	Leu	Ser	Leu	Gly	Asn
				85					90					95	
Ala	Ala	Leu	Gln	Ile	Thr	Asp	Val	Lys	Leu	Gln	Asp	Ala	Gly	Val	Tyr
			100					105					110		
Arg	Cys	Met	Ile	Ser	Tyr	Gly	Gly	Ala	Asp	Tyr	Lys	Arg	Ile	Thr	Val
		115					120					125			
Lys	Val	Asn	Ala	Pro	Tyr	Asn	Lys	Ile	Asn	Gln	Arg	Ile	Leu	Val	Val
	130					135					140				
Asp	Pro	Val	Thr	Ser	Glu	His	Glu	Leu	Thr	Cys	Gln	Ala	Glu	Gly	Tyr
145					150					155					160
Pro	Lys	Ala	Glu	Val	Ile	Trp	Thr	Ser	Ser	Asp	His	Gln	Val	Leu	Ser
				165					170					175	
Gly	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Asn	Ser	Lys	Arg	Glu	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn
			180					185					190		
Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Arg	Ile	Asn	Thr	Thr	Thr	Asn	Glu	Ile	Phe	Tyr
		195					200					205			
Cys	Thr	Phe	Arg	Arg	Leu	Asp	Pro	Glu	Glu	Asn	His	Thr	Ala	Glu	Leu
	210					215					220				
Val	Ile	Pro	Glu	Leu	Pro	Leu	Ala	His	Pro	Pro	Asn	Glu	Arg	Thr	His
225					230					235					240
Leu	Val	Ile	Leu	Gly	Ala	Ile	Leu	Leu	Cys	Leu	Gly	Val	Ala	Leu	Thr
				245					250					255	
Phe	Ile	Phe	Arg	Leu	Arg	Lys	Gly	Arg	Met	Met	Asp	Val	Lys	Lys	Cys
			260					265					270		
Gly	Ile	Gln	Asp	Thr	Asn	Ser	Lys	Lys	Gln	Ser	Asp	Thr	His	Leu	Glu
		275					280					285			
Glu	Thr														
	290														

<210> 352  
 <211> 288  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> hPD-1 NP\_005009.2

20

# ES 2 711 450 T3

<400> 352

Met	Gln	Ile	Pro	Gln	Ala	Pro	Trp	Pro	Val	Val	Trp	Ala	Val	Leu	Gln	
1				5					10					15		
Leu	Gly	Trp	Arg	Pro	Gly	Trp	Phe	Leu	Asp	Ser	Pro	Asp	Arg	Pro	Trp	
			20					25					30			
Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Ser	Pro	Ala	Leu	Leu	Val	Val	Thr	Glu	Gly	Asp	
		35					40					45				
Asn	Ala	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Asn	Thr	Ser	Glu	Ser	Phe	Val	
	50					55					60					
Leu	Asn	Trp	Tyr	Arg	Met	Ser	Pro	Ser	Asn	Gln	Thr	Asp	Lys	Leu	Ala	
65					70					75				80		
Ala	Phe	Pro	Glu	Asp	Arg	Ser	Gln	Pro	Gly	Gln	Asp	Cys	Arg	Phe	Arg	
				85					90				95			
Val	Thr	Gln	Leu	Pro	Asn	Gly	Arg	Asp	Phe	His	Met	Ser	Val	Val	Arg	
			100					105					110			
Ala	Arg	Arg	Asn	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Leu	Cys	Gly	Ala	Ile	Ser	Leu	
			115				120					125				
Ala	Pro	Lys	Ala	Gln	Ile	Lys	Glu	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Leu	Arg	Val	
	130					135					140					
Thr	Glu	Arg	Arg	Ala	Glu	Val	Pro	Thr	Ala	His	Pro	Ser	Pro	Ser	Pro	
145					150					155					160	
Arg	Pro	Ala	Gly	Gln	Phe	Gln	Thr	Leu	Val	Val	Gly	Val	Val	Gly	Gly	
				165					170					175		
Leu	Leu	Gly	Ser	Leu	Val	Leu	Leu	Val	Trp	Val	Leu	Ala	Val	Ile	Cys	
			180					185				190				
Ser	Arg	Ala	Ala	Arg	Gly	Thr	Ile	Gly	Ala	Arg	Arg	Thr	Gly	Gln	Pro	
		195					200					205				
Leu	Lys	Glu	Asp	Pro	Ser	Ala	Val	Pro	Val	Phe	Ser	Val	Asp	Tyr	Gly	
	210					215					220					
Glu	Leu	Asp	Phe	Gln	Trp	Arg	Glu	Lys	Thr	Pro	Glu	Pro	Pro	Val	Pro	
225					230					235					240	
Cys	Val	Pro	Glu	Gln	Thr	Glu	Tyr	Ala	Thr	Ile	Val	Phe	Pro	Ser	Gly	
				245					250					255		
Met	Gly	Thr	Ser	Ser	Pro	Ala	Arg	Arg	Gly	Ser	Ala	Asp	Gly	Pro	Arg	
			260					265					270			
	Ser	Ala	Gln	Pro	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Gly	His	Cys	Ser	Trp	Pro	Leu
			275					280					285			

- 5     <210> 353
- <211> 454
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10    <220>
- <223> MfPD-L1-mFc aa1-221: Mf PD-L1 (aa 19-239 of XP\_005581836.1) aa222-454: mFc tag (aa 98-330 of P01863)
- 15    <400> 353

ES 2 711 450 T3

Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu  
 20 25 30  
 Thr Ser Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln  
 35 40 45  
 Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Asn Tyr Arg  
 50 55 60  
 Gln Arg Ala Gln Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala  
 65 70 75 80  
 Leu Arg Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys  
 85 90 95  
 Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val  
 100 105 110  
 Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro  
 115 120 125  
 Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys  
 130 135 140  
 Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys  
 145 150 155 160  
 Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Leu Asn Val Thr  
 165 170 175  
 Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Ala Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Ile  
 180 185 190  
 Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile  
 195 200 205  
 Pro Glu Leu Pro Leu Ala Leu Pro Pro Asn Glu Arg Thr Glu Pro Arg  
 210 215 220  
 Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn  
 225 230 235 240  
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp  
 245 250 255  
 Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 260 265 270  
 Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn  
 275 280 285  
 Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn  
 290 295 300  
 Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp  
 305 310 315 320  
 Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro  
 325 330 335  
 Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala  
 340 345 350



# ES 2 711 450 T3

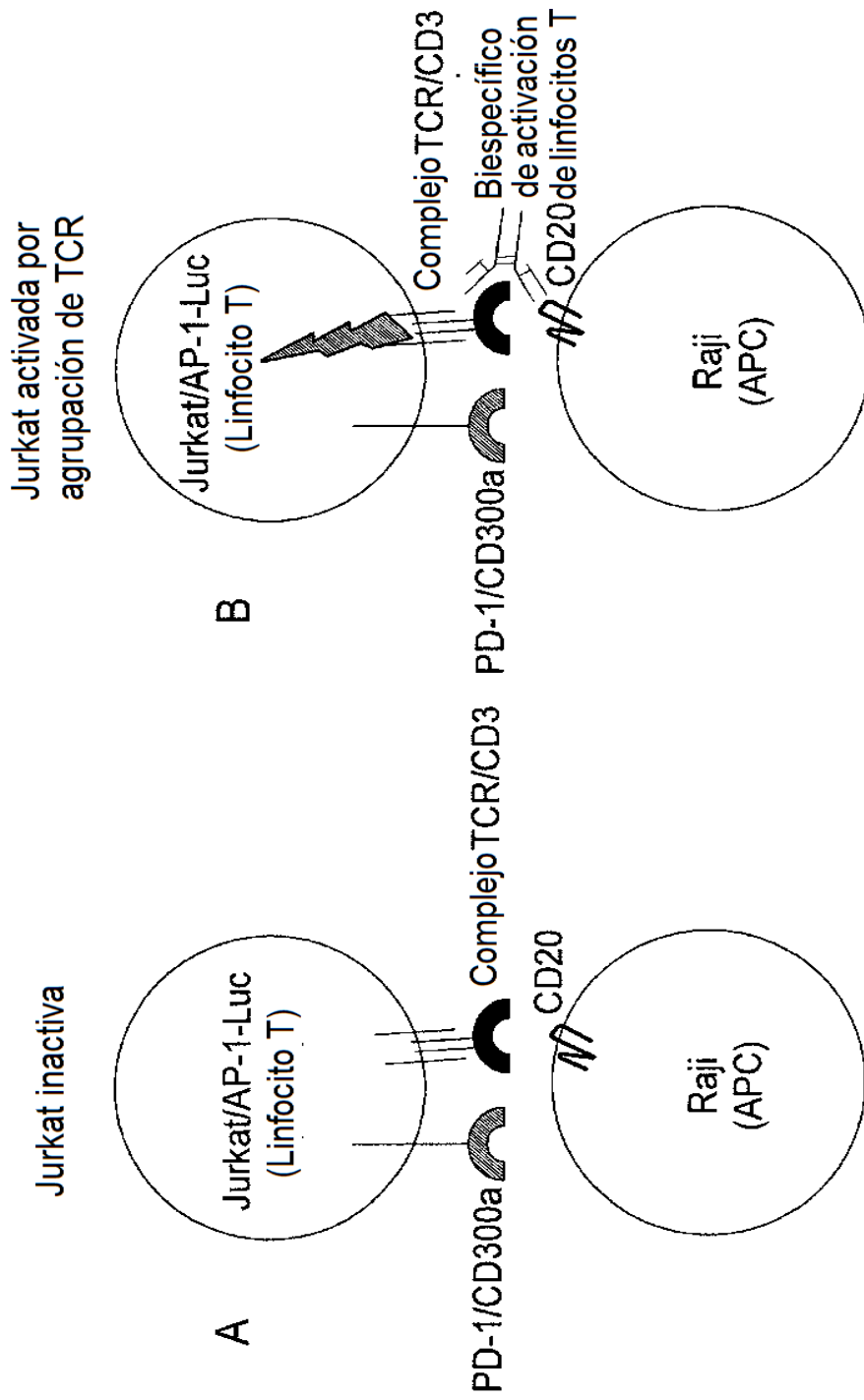
Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Lys
		355					360					365			
Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met	Pro	Glu	Asp	Ile
	370					375					380				
Tyr	Val	Glu	Trp	Thr	Asn	Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Asn	Tyr	Lys	Asn
385					390					395					400
Thr	Glu	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Met	Tyr	Ser	Lys
				405					410					415	
Leu	Arg	Val	Glu	Lys	Lys	Asn	Trp	Val	Glu	Arg	Asn	Ser	Tyr	Ser	Cys
			420					425					430		
Ser	Val	Val	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Thr	Lys	Ser	Phe
	435						440					445			
Ser	Arg	Thr	Pro	Gly	Lys										
	450														

## REIVINDICACIONES

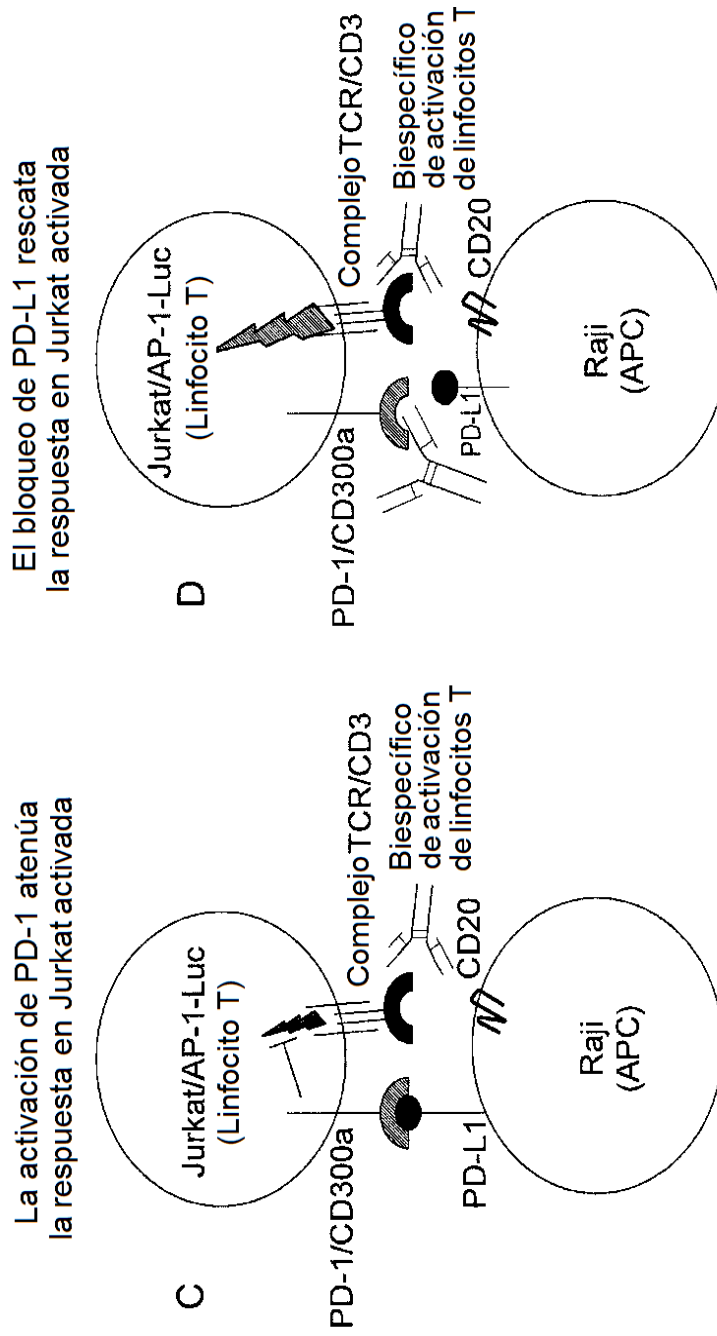
1. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a la proteína ligando de muerte programada 1 (PD-L1) humana, en el que el anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una región variable de la cadena pesada (HCVR) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82, y tres CDR de una región variable de la cadena ligera (LCVR) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 90.
2. El anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una HCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 84, una HCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 86, una HCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 88, una LCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 92, una LCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 94 y una LCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 96.
3. El anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 1 o 2, que comprende un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR de las SEQ ID NOs: 82/90.
4. El anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, que es una IgG1 o IgG4.
5. El anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo es una molécula de unión al antígeno multiespecífica.
6. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a PD-L1 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
7. Una molécula de polinucleótido aislada que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno como se expone en la reivindicación 3.
8. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 7.
9. Una célula que expresa el vector de la reivindicación 8.
10. Un método para producir un anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, comprendiendo dicho método el cultivo de la célula de la reivindicación 9 en condiciones que permitan la producción del anticuerpo o fragmento, y recuperar el anticuerpo o fragmento así producido.
11. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5 o una composición farmacéutica de la reivindicación 6 para su uso en la potenciación de una respuesta inmunitaria en un sujeto o para potenciar la activación de linfocitos T en un sujeto.
12. El anticuerpo, fragmento de unión al antígeno del mismo, o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el sujeto tiene un tumor.
13. El anticuerpo, fragmento de unión al antígeno del mismo, o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el sujeto tiene una infección viral, opcionalmente en el que la infección viral es una infección por VIH, VHB, VHC, VPH, VCML o VIS.
14. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5 o una composición farmacéutica de la reivindicación 6 para su uso en un método para inhibir el crecimiento de un tumor o célula tumoral.
15. El anticuerpo, fragmento de unión al antígeno del mismo, o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 12 o 14, en el que el tumor comprende carcinoma de células renales, cáncer de cerebro, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer de riñón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer colorrectal, mieloma múltiple o melanoma.
16. El anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno del mismo, o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, o la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, está destinado a la administración al sujeto en combinación con un segundo agente terapéutico, en el que opcionalmente el segundo agente terapéutico comprende un AINE, un corticosteroide, un anticuerpo contra un co-inhibidor de linfocitos T, un anticuerpo contra un antígeno tumoral específico, un anticuerpo contra PD-1, un inhibidor de la indoleamina-2,3-dioxigenasa, un inhibidor de Ang2, una vacuna contra el cáncer, un inhibidor del EGFR, un inhibidor del TGF $\beta$ , un

suplemento dietético tal como un antioxidante, un antagonista del VEGF como un anticuerpo anti-VEGF, un inhibidor quinasa del receptor del VEGF de molécula pequeña o una proteína de fusión inhibidora del VEGF, cirugía, radiación, un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico o una combinación de los mismos.

- 5 17. El anticuerpo, fragmento de unión al antígeno del mismo, o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-16, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo está destinado a la administración por vía subcutánea, intravenosa, intradérmica, intraperitoneal, oral, intramuscular o intracraneal.
- 10 18. El anticuerpo, fragmento de unión al antígeno del mismo, o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-17, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno está destinado a la administración en una dosis de aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 60 mg/kg de peso corporal del sujeto.



**FIG. 1**



**FIG. 1 (Cont.)**

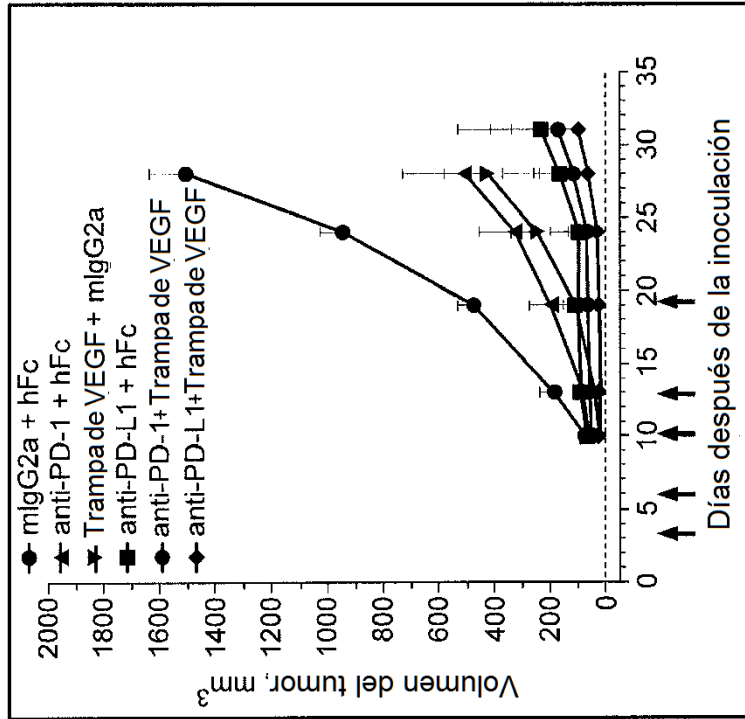


FIG. 2

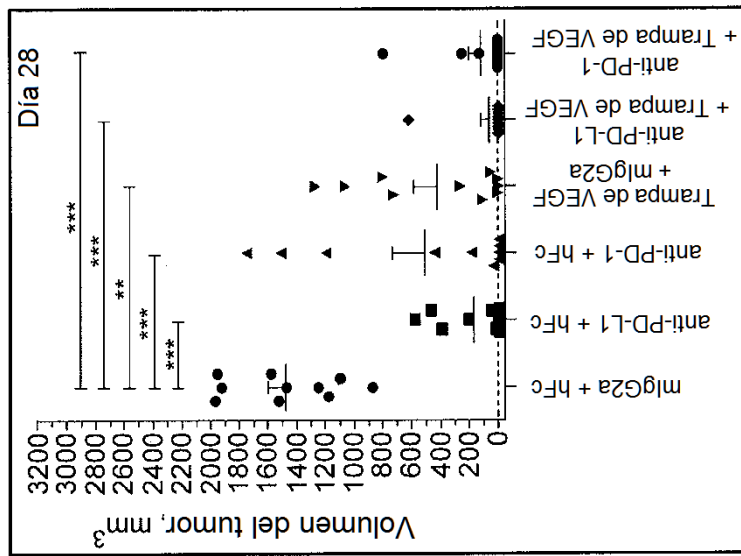


FIG. 3