

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 160**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2006 E 11178191 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 2439273**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales humanos contra muerte programada 1(PD-1) y métodos para tratar el cáncer usando anticuerpos dirigidos contra PD-1 solos o junto con otras sustancias inmunoterapéuticas**

30 Prioridad:

09.05.2005 US 679466 P

21.11.2005 US 738434 P

08.12.2005 US 748919 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.07.2019

73 Titular/es:

ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)

1-5, Doshomachi 2-chome Chuo-ku

Osaka-shi, Osaka 541-8526, JP y

E. R. SQUIBB & SONS, L.L.C. (50.0%)

72 Inventor/es:

SRINIVASAN, MOHAN;

WANG, CHANGYU;

SELBY, MARK, J.;

CHEN, BING;

CARDARELLI, JOSEPHINE, M.;

KORMAN, ALAN, J. y

HUANG, HAICHUN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 720 160 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales humanos contra muerte programada 1(PD-1) y métodos para tratar el cáncer usando anticuerpos dirigidos contra PD-1 solos o junto con otras sustancias inmunoterapéuticas

5

Campo técnico

La presente invención se refiere de forma general a la inmunoterapia en el tratamiento de enfermedades humanas y a la reducción de eventos adversos relacionados con las mismas. Más concretamente, la presente invención se refiere al uso de inmunoterapia de combinación, en particular la combinación de anticuerpos dirigidos contra -CTLA-4 y contra PD-1, para tratar el cáncer y/o para disminuir la incidencia o la magnitud de efectos adversos relacionados con el tratamiento con dichos anticuerpos individualmente.

10

Antecedentes de la invención

15

La proteína Muerte programada 1 (PD-1) es un miembro inhibidor de la familia de receptores CD28, que también incluye CD28, CTLA-4, ICOS y BTLA. PD-1 se expresa en linfocitos B activados, linfocitos T, y células mieloides (Agata *et al.*, citado anteriormente, Okazaki *et al.* (2002) *Curr. Opin. Immunol* 14: 391779-82; Bennett *et al.* (2003) *J Immunol* 170:711- 8). Los miembros iniciales de la familia, CD28 e ICOS, se descubrieron por sus efectos funcionales sobre el aumento de la proliferación de células T después de la adición de anticuerpos monoclonales (Hutloff *et al.* (1999) *Nature* 397:263-266; Hansen *et al.* (1980) *Immunogenetics* 10:247- 260). PD-1 se descubrió a través de cribado selectivo de la expresión diferencial en las células apoptóticas (Ishida *et al.* (1992) *EMBO J* 11:3887-95). Los otros miembros de la familia, CTLA-4 y BTLA, se descubrieron mediante cribado selectivo de la expresión diferencial en linfocitos T citotóxicos y células TH1, respectivamente. CD28, ICOS y CTLA-4 tienen, todos ellos, un resto de cisteína no emparejado que permite la homodimerización. Por el contrario, se sugiere que PD-1 existe como monómero, careciendo del resto de cisteína no emparejado característico de otros miembros de la familia de CD28.

20

25

El gen de PD-1 es una proteína transmembrana de tipo I de 55 kDa que forma parte de la superfamilia del gen de Ig (Agata *et al.* (1996) *Int Immunol* 8:765-72). PD-1 contiene un motivo inhibidor del inmunorreceptor de tirosina proximal de la membrana (ITIM) y un motivo de conmutación basado en tirosina distal de la membrana (ITSM) (Thomas, M.L. (1995) *J Exp Med* 181:1953-6; Vivier, E y Daeron, M (1997) *Immunol Today* 18:286-91). Aunque estructuralmente similar a CTLA-4, PD-1 carece del motivo MYPPPY que es fundamental para la unión a B7-1 y B7-2. Se han identificado dos ligandos para PD-1, PD-L1 y PD-L2, que han mostrado regular de forma defectiva la activación de linfocitos T después de su unión a PD-1 (Freeman *et al.* (2000) *J Exp Med* 192:1027-34; Latchman *et al.* (2001) *Nat Immunol* 2:261-8; Carter *et al.* (2002) *Eur J Immunol* 32:634-43). Tanto PD-L1 como PD-L2 son homólogos de B7 que se unen a PD-1, pero no se unen a otros miembros de la familia de CD28. Un ligando de PD-1, PD-L1, es abundante en diversos cánceres humanos (Dong *et al.* (2002) *Nat. Med.Nat. Med* 8:787-9). La interacción entre PD-1 y PD-L1 da como resultado una disminución de linfocitos infiltrantes de tumores, una disminución de la proliferación mediada por receptores de células T y una evasión inmunitaria de las células cancerosas (Dong *et al.* (2003) *J Mol. Med.* 81:281-7; Blank *et al.* (2005) *Cancer Immunol. Immunother.* 54:307-314; Konishi *et al.* (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:5094-100). La supresión inmunitaria se puede revertir por inhibición de la interacción local de PD-1 con PD-L1, y el efecto es aditivo cuando la interacción de PD-1 con PD-L2 también se bloquea (Iwai *et al.* (2002) *Proc. Nat'l. Acad. Sci USA* 99:12293-7; Brown *et al.* (2003) *J. Immunol.* 170:1257-66).

30

35

40

45

PD-1 es un miembro inhibidor de la familia de CD28 que se expresa en linfocitos B activados, linfocitos T, y células mieloides (Agata *et al.*, más arriba, Okazaki *et al.* (2002) *Curr Opin Immunol* 14: 391779-82; Bennett *et al.* (2003) *J Immunol* 170:711-8). Los animales con deficiencia de PD-1 desarrollan varios fenotipos autoinmunitarios, incluyendo miocardiopatía autoinmunitaria y un síndrome de tipo lupus con artritis y nefritis (Nishimura *et al.* (1999) *Immunity* 11:141-51; Nishimura *et al.* (2001) *Science* 291:319-22). De manera adicional, se ha descubierto que PD-1 desempeña un papel en la encefalomiелitis autoinmunitaria, lupus eritematoso sistémico, enfermedad del injerto contra el hospedador (EICH), diabetes tipo I y artritis reumatoide (Salama *et al.* (2003) *J Exp Med* 198:71-78; Prokunina y Alarcon-Riquelme (2004) *Hum Mol Genet* 13:R143; Nielsen *et al.* (2004) *Lupus* 13:510). En una línea tumoral de línea de linfocitos B murinos, se demostró que el ITSM de PD-1 era esencial para bloquear el flujo de Ca²⁺ mediado por BCR y la fosforilación con tirosina de las moléculas efectoras posteriores (Okazaki *et al.* (2001) *PNAS* 98:13866-71).

50

55

En consecuencia, se desean agentes que reconocen PD-1, y métodos para utilizar dichos agentes.

Divulgación de la invención

60

La presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales aislados, en particular anticuerpos monoclonales humanos, que se unen a PD-1 y que presentan numerosas propiedades deseables. Estas propiedades incluyen, por ejemplo, unión de alta afinidad con PD-1 humana, pero que carecen de reactividad cruzada con cualquiera de CD28, CTLA-4 o ICOS humanas. Adicionalmente, se ha demostrado que los anticuerpos de la divulgación modulan las respuestas inmunitarias. En consecuencia, otro aspecto de la divulgación se refiere a métodos para modular

65

respuestas inmunitarias utilizando anticuerpos dirigidos contra PD-1. En particular, la divulgación proporciona un método para inhibir el crecimiento de células tumorales *in vivo* usando anticuerpos dirigidos contra PD-1.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a la proteína Muerte programada 1 (PD-1) humana y comprende una región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO:4 y una región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO: 11; para su uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto junto con un anticuerpo monoclonal, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a CTLA-4 humano.

En un aspecto, La divulgación se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo presenta al menos una de las siguientes propiedades:

- (a) se une a PD-1 humana con una K_D de 1×10^{-7} M o menos;
- (b) no se une prácticamente a CD28, CTLA-4 o ICOS humanos;
- (c) aumenta la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción mixta de linfocitos (MLR);
- (d) aumenta la producción de interferón gamma en un ensayo MLR;
- (e) aumenta la secreción de IL-2 en un ensayo MLR;
- (f) se une PD-1 humana y a PD-1 de macaco;
- (g) inhibe la unión de PD-L1 y/o PD-L2 a PD-1;
- (h) estimula las respuestas de memoria específicas de antígeno;
- (i) estimula las respuestas de anticuerpos;
- (j) inhibe el crecimiento de células tumorales *in vivo*.

Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo humano, aunque en una divulgación alternativa, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

En ejemplos más preferidos, el anticuerpo se une a la PD-1 humana con una K_D de 5×10^{-8} M o menos, se une a PD-1 humana con una K_D de 1×10^{-8} M o menos, se une a la PD-1 humana con una K_D de 5×10^{-9} M o menos, o se une a la PD-1 humana con una K_D de entre 1×10^{-8} M y 1×10^{-10} M.

Los anticuerpos para su uso en la invención pueden ser, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, de un isotipo IgG1 o IgG4. Como alternativa, los anticuerpos pueden ser fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos Fab, o Fab'2, o anticuerpos monocatenarios.

La divulgación también proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de la divulgación, o una porción de unión a antígeno del mismo, unido a un agente terapéutico, tal como una citotoxina o un isótopo radioactivo. La divulgación también proporciona una molécula biespecífica que comprende un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la divulgación, unido a un segundo resto funcional que tiene una especificidad de unión diferente a la de dicho anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo.

También se proporcionan composiciones que comprenden un anticuerpo, o porciones de unión a antígeno del mismo, o inmunoconjugado o molécula biespecífica de la divulgación, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:57) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:1) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 17D8. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:15), CDR2 (SEQ ID NO:22) y CDR3 (SEQ ID NO:29) están resaltadas, y se indican las derivaciones V, D, y J de la línea germinal.

La Figura 1B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:64) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:8) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 17D8. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:36), CDR2 (SEQ ID NO:43) y CDR3 (SEQ ID NO:50) están resaltadas, y se indican las derivaciones V y J de la línea germinal.

La Figura 2A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:58) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:2) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 2D3. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:16), CDR2 (SEQ ID NO:23) y CDR3 (SEQ ID NO:30) están resaltadas, y se indican las derivaciones V y J de la línea germinal.

La Figura 2B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:65) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:9) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 2D3. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 37), CDR2 (SEQ ID NO:44) y CDR3 (SEQ ID NO:51) están resaltadas, y se indican las derivaciones V y J de la línea germinal.

La Figura 3A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:59) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:3) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 4H1. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:17), CDR2 (SEQ ID NO:24) y CDR3 (SEQ ID NO:31) están resaltadas, y se indican las derivaciones V y J de la línea germinal.

La Figura 3B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:66) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:10) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 4H1. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:38), CDR2 (SEQ ID NO:45) y CDR3 (SEQ ID NO: 52) están resaltadas, y se indican las derivaciones V y J de la línea germinal.

5 La Figura 4A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:60) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:4) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 5C4. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:18), CDR2 (SEQ ID NO:25) y CDR3 (SEQ ID NO:32) están resaltadas, y se indican las derivaciones V y J de la línea germinal.

10 La Figura 4B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:67) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:11) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 5C4. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:39), CDR2 (SEQ ID NO:46) y CDR3 (SEQ ID NO:53) están resaltadas, y se indican las derivaciones V y J de la línea germinal.

15 La Figura 5A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:61) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:5) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 4A11. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:19), CDR2 (SEQ ID NO: 26) y CDR3 (SEQ ID NO: 33) están resaltadas, y se indican las derivaciones V y J de la línea germinal.

20 La Figura 5B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:68) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:12) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 4A11. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:40), CDR2 (SEQ ID NO:47) y CDR3 (SEQ ID NO:54) están resaltadas, y se indican las derivaciones V y J de la línea germinal.

25 La Figura 6A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:62) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:6) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 7D3. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:20), CDR2 (SEQ ID NO:27) y CDR3 (SEQ ID NO:34) están resaltadas, y se indican las derivaciones V y J de la línea germinal.

30 La Figura 6B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:69) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:13) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 7D3. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:41), CDR2 (SEQ ID NO:48) y CDR3 (SEQ ID NO:55) están resaltadas, y se indican las derivaciones V y J de la línea germinal.

35 La Figura 7A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:63) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 7) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 5F4. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:21), CDR2 (SEQ ID NO:28) y CDR3 (SEQ ID NO:35) están resaltadas, y se indican las derivaciones V y J de la línea germinal.

40 La Figura 7B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:70) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:14) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 5F4. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO:42), CDR2 (SEQ ID NO: 49) y CDR3 (SEQ ID NO: 56) están resaltadas, y se indican las derivaciones V y J de la línea germinal.

45 La Figura 8 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada de 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 y 7D3 con la secuencia de aminoácidos de V_H 3-33 de la línea germinal humana (SEQ ID NO:71).

50 La Figura 9 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera de 17D8, 2D3 y 7D3 con la secuencia de aminoácidos de V_L L6 de la línea germinal humana (SEQ ID NO:73).

55 La Figura 10 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 4H1 y 5C4 con la secuencia de aminoácidos de V_L L6 de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 73).

60 La Figura 11 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 4A11 y 5F4 con la secuencia de aminoácidos de V_H 4-39 de la línea germinal humana (SEQ ID NO:72).

65 La Figura 12 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera de 4A11 y 5F4 con la secuencia de aminoácidos de V_L L15 de la línea germinal humana (SEQ ID NO:74).

Las Figuras 13A-13B muestran los resultados de los experimentos de citometría de flujo que demuestran que los anticuerpos monoclonales humanos 5C4 y 4H1, dirigidos contra PD-1 humana, se unen a la superficie celular de células CHO transfectadas con la PD-1 humana de longitud completa. La Figura 13A muestra la representación gráfica de citometría de flujo para 5C4. La Figura 13B muestra la representación gráfica de citometría de flujo para 4H1. La línea fina representa la unión a células CHO y la línea gruesa representa la unión a células CHO bPD-1.

La Figura 14 muestra un gráfico que demuestra que los anticuerpos monoclonales humanos 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, y 4A11, dirigidos contra PD-1 humana, se unen específicamente a PD-1, y no a otros miembros de la familia CD28.

Las Figuras 15A-15C muestran los resultados de los experimentos de citometría de flujo que demuestran que los anticuerpos monoclonales humanos 4H1 y 5C4, dirigidos contra PD-1 humana, se unen a PD-1 sobre la superficie celular. La Figura 15A muestra la unión a linfocitos T humanos activados. La Figura 15B muestra la unión a linfocitos T de macaco. La Figura 15C muestra la unión a células CHO transfectadas que expresan PD-1.

Las Figuras 16A-16C muestran los resultados de experimentos que demuestran que los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra PD-1 estimulan la proliferación de linfocitos T, la secreción de IFN-gamma, y la secreción de IL-2 en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos. La Figura 16A es un gráfico de barras que muestra la proliferación de linfocitos T dependiente de la concentración; La Figura 16B es un gráfico de barras que muestra la secreción de IFN-gamma dependiente de la concentración; La Figura 16C es un gráfico de barras que muestra la secreción de IL-2 dependiente de la concentración.

Las Figuras 17A-17B muestran los resultados de experimentos de citometría de flujo que demuestran que los anticuerpos monoclonales humanos contra PD-1 humana bloquean la unión de PD-L1 y PD-L2 a células CHO transfectadas que expresan PD-1. La Figura 17A es un gráfico que muestra la inhibición de la unión de PD-L1; La Figura 17B es un gráfico que muestra la inhibición de la unión de PD-L2.

5 La Figura 18 muestra los resultados de experimentos de citometría de flujo que demuestran que los anticuerpos monoclonales humanos contra PD-1 no estimulan la apoptosis de linfocitos T.

La Figura 19 muestra los resultados de experimentos que demuestran que los HuMab dirigidos contra PD-1 tienen un efecto dependiente de la concentración sobre la secreción de IFN gamma por las PBMC de donantes positivos para el CMV cuando los PBMC se estimularon con un lisado de CMV y anticuerpo dirigido contra PD-1.

10 La Figura 20 muestra los resultados de experimentos de crecimiento tumoral; en un sistema modelo en ratón que demuestran que el tratamiento de tumores de ratón *in vivo* con anticuerpos dirigidos contra PD-1 inhibe el crecimiento de los tumores.

Las Figuras 21A a 21D muestran el volumen del tumor con el tiempo en ratones individuales que recibieron implantes con células tumorales de colon MC38 (PD-L1⁺) y que el mismo día se trataron con una de las siguientes terapias: (A) IgG de ratón (control), (B) anticuerpo dirigido contra CTLA-4, (C) anticuerpo dirigido contra PD-1, y (D) anticuerpo dirigido contra CTLA-4 y anticuerpo dirigido contra PD-1. Los ratones recibieron posteriormente tratamientos con anticuerpos los días 3, 6 y 10 como se describe en el Ejemplo 13, y el volumen tumoral se controló durante 60 días.

La Figura 22 muestra el volumen tumoral medio de los ratones mostrado en la Figura 21.

20 La Figura 23 muestra la mediana del volumen tumoral de los ratones mostrado en la Figura 21.

Las Figuras 24A a 24D muestran el volumen del tumor con el tiempo en ratones individuales que recibieron implantes con células tumorales de colon MC38 (PD-L1⁺) y que una semana después se trataron con una de las siguientes terapias: (A) IgG de ratón (control), (B) anticuerpo dirigido contra CTLA-4, (C) anticuerpo dirigido contra PD-1, y (D) anticuerpo dirigido contra CTLA-4 y anticuerpo dirigido contra PD-1. El volumen tumoral el primer día de tratamiento fue de aproximadamente 315 mm³. Los ratones recibieron posteriormente tratamientos con anticuerpos los días 3, 6 y 10 como se describe en el Ejemplo 14.

25 La Figura 25 muestra el volumen tumoral medio de los ratones mostrado en la Figura 24.

La Figura 26 muestra la mediana del volumen tumoral de los ratones mostrado en la Figura 24.

30 La Figura 27 muestra el volumen tumoral medio con el tiempo en ratones individuales que recibieron implantes de células tumorales de colon MC38 (PD-L1⁺) (día -7) y posteriormente se trataron los días 0, 3, 6 y 10 después del implante (como se describe en el Ejemplo 15) con una de las siguientes terapias: (A) IgG de ratón como control (20 mg/kg, X₂₀) (B) anticuerpo dirigido contra PD-1 (10 mg/kg) e IgG de ratón IgG (10 mg/kg) (P₁₀X₁₀), (C) anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (10 mg/kg) e IgG de ratón (10 mg/kg) (C₁₀X₁₀), (D) anticuerpo dirigido contra CTLA-4 y anticuerpo dirigido contra PD-1 (10 mg/kg cada uno) (C₁₀P₁₀), (E) anticuerpo dirigido contra CTLA-4 y anticuerpo dirigido contra PD-1 (3 mg/kg cada uno) (C₃P₃), and (F) anticuerpo dirigido contra CTLA-4 y anticuerpo dirigido contra PD-1 (1 mg/kg cada uno) (C₁P₁). Dos grupos de ratones se trataron con cada anticuerpo secuencialmente de la siguiente forma: (G) anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (10 mg/kg, día 0), anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (10 mg/kg, día 3), anticuerpo dirigido contra PD-1 (10 mg/kg, día 6), y anticuerpo dirigido contra PD-1 (10 mg/kg, día 10) (C₁₀C₁₀P₁₀P₁₀); y (H) anticuerpo dirigido contra PD-1 (10 mg/kg, día 0), anticuerpo dirigido contra PD-1 (10 mg/kg, día 3), anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (10 mg/kg, día 6), y anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (10 mg/kg, día 10) (10 mg/kg, día 10) (P₁₀P₁₀C₁₀C₁₀).

35 La Figura 28 muestra el volumen tumoral medio de los ratones mostrado en la Figura 27.

La Figura 29 muestra la mediana del volumen tumoral de los ratones mostrado en la Figura 27.

45 Las Figuras 30A a 30F muestran el volumen del tumor con el tiempo en ratones individuales que recibieron implantes con células de fibrosarcoma SA1/N (PD-L1⁺) y que un día después se trataron con una de las siguientes terapias: (A) PBS (control con vehículo), (B) IgG de ratón (control con anticuerpo, 10 mg/kg), (C) anticuerpo dirigido contra PD-1 (10 mg/kg), (D) anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (10 mg/kg), (E) anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (0,2 mg/kg), y (F) anticuerpo dirigido contra PD-1 (10 mg/kg) y anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (0,2 mg/kg). Los ratones recibieron posteriormente tratamientos con anticuerpos los días 4, 7 y 11 como se describe en el Ejemplo 16, y el volumen tumoral se controló durante 41 días.

50 La Figura 31 muestra el volumen tumoral medio de los ratones mostrado en la Figura 29.

La Figura 32 muestra la mediana del volumen tumoral de los ratones mostrado en la Figura 29.

55 Las Figuras 33A a 33J muestran muestra el volumen tumoral con el tiempo en ratones individuales que recibieron implantes de células de fibrosarcoma SA1/N (PD-L1⁺) y posteriormente se trataron los días 7, 10, 13 y 17 después del implante (como se describe en el Ejemplo 17) con una de las siguientes terapias: (A) PBS (control con vehículo), (B) IgG de ratón (control con anticuerpo, 10 mg/kg), (C) anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (0,25 mg/kg), (D) anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (0,5 mg/kg), (E) anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (5 mg/kg), (F) anticuerpo dirigido contra PD-1 (3 mg/kg), (G) anticuerpo dirigido contra PD-1 (10 mg/kg), (H) anticuerpo dirigido contra PD-1 (10 mg/kg) y anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (0,25 mg/kg), (I) anticuerpo dirigido contra PD-1 (10 mg/kg) y anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (0,5 mg/kg), y (F) anticuerpo dirigido contra PD-1 (3 mg/kg) y anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (0,5 mg/kg). El volumen tumoral el primer día de tratamiento fue de aproximadamente 110 mm³.

60 La Figura 34 muestra el volumen tumoral medio de los ratones mostrado en la Figura 33.

La Figura 35 muestra la mediana del volumen tumoral de los ratones mostrado en la Figura 33.

65 Las Figuras 36A y 36B muestran muestra el volumen tumoral con el tiempo en ratones individuales que recibieron implantes de células de fibrosarcoma SA1/N (PD-L1⁺) y posteriormente se trataron los días 10, 13, 16

y 19 después del implante (como se describe en el Ejemplo 17) con una de las siguientes terapias: (A) IgG de ratón (control con anticuerpo, 10 mg/kg) o (B) anticuerpo dirigido contra PD-1 (10 mg/kg) y anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (1 mg/kg). El volumen tumoral el primer día de tratamiento fue de aproximadamente 250 mm³.

La Figura 37 muestra el volumen tumoral medio de los ratones mostrado en la Figura 36.

5 La Figura 38 muestra la mediana del volumen tumoral de los ratones mostrado en la Figura 36.

La Figura 39 la media y la mediana del porcentaje de inhibición del tumor calculado a partir de los volúmenes tumorales mostrados en las Figuras 33 y 36.

10 Las Figuras 40A a 40D muestran el volumen tumoral en ratones BALB/c que recibieron un implante subcutáneo de células de adenocarcinoma renal RENCA (PD-L1⁺) (Murphy y Hrushesky (1973) *J Nat'l. Cancer Res.* 50:1013-1025) (día -12) y posteriormente se trataron por vía intraperitoneal los días 0, 3, 6 y 9 después del implante con una de las siguientes terapias: (A) IgG de ratón (control con anticuerpo, 20 mg/kg), (B) anticuerpo dirigido contra PD-1 (10 mg/kg), (C) anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (10 mg/kg), y (D) anticuerpo dirigido contra PD-1 (10 mg/kg) junto con anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (10 mg/kg). El volumen tumoral el primer día de tratamiento fue de aproximadamente 115 mm³.

15 La Figura 41 muestra que la unión de la proteína de fusión PD-L2-Fc de ratón a PD-1 de ratón (mPD-1) se bloquea con el anticuerpo dirigido contra mPD-1, 4H2, de una forma dependiente de la dosis. La unión se detecta por medición de la fluorescencia de un anticuerpo de burro dirigido contra IgG de rata marcado con FITC mediante ELISA. Cuanto mayor sea la IMF (intensidad de fluorescencia promedio) mayor es la unión.

20 La Figura 42 muestra las curvas de unión de anticuerpos dirigidos contra mPD-1 a la proteína de fusión mPD-1-Fc inmovilizada mediante ELISA.

La Figura 43 muestra la curva de unión del anticuerpo dirigido contra mPD-1 de rata, 4H2.B3, a células CHO que expresaban mPD-1-. La unión se detectó mediante un anticuerpo de burro dirigido contra IgG de rata, conjugado con FITC, y medición con FACS (MFI).

25 La Figura 44 muestra la curva de unión de la proteína de fusión mPD-L1-hFc a células CHO que expresaban mPD-1- en presencia de concentraciones crecientes del anticuerpo dirigido contra mPD-1, 4H2.B3. La unión se detectó mediante un anticuerpo de cabra dirigido contra IgG humana, conjugado con FITC, y medición con FACS (MFI).

La Figura 45 muestra las curvas de unión de anticuerpo de rata dirigido contra mPD-1, 4H2.B3, a células CHO que expresaban mPD-1- en comparación con el anticuerpo quimérico de rata:ratón dirigido contra mPD-1, 4H2.

30 La Figura 46 muestra las curvas de unión de la proteína de fusión mPD-L1-hFc a células CHO que expresaban mPD-1- en presencia de concentraciones crecientes del bien anticuerpo de rata dirigido contra mPD-1, 4H2.B3, o del anticuerpo quimérico de rata:ratón dirigido contra mPD-1, 4H2.

La Figura 47 muestra el volumen tumoral promedio de ratones sin tumor previamente tratados con anticuerpo dirigido contra PD1, y vueltos a estimular con células de fibrosarcoma SAI/N (PD-L1⁻). También se muestra el volumen tumoral medio de ratones no expuestos al tratamiento (control, anteriormente no estimulados ni tratados) con implante de células de fibrosarcoma SAI/N.

35 La Figura 48 muestra el volumen tumoral con el tiempo para los ratones individuales, que sobrevivieron sin tumor después del implante de células tumorales de colon MC38 (PD-L1⁻) y tratamiento con un anticuerpo dirigido contra PD1, o una combinación de anticuerpo dirigido contra PD1 y un anticuerpo dirigido contra CTLA-4), vueltos a estimular con 10x células tumorales de colon MC38 más que en el tratamiento inicial. También se muestra el volumen tumoral medio de ratones no expuestos al tratamiento (control, anteriormente no estimulados ni tratados) con implante de células tumorales de colon MC38.

La Figura 49 muestra el volumen tumoral medio de los ratones mostrado en la Figura 48.

40 La Figura 50 muestra el volumen tumoral medio con el tiempo en ratones individuales que recibieron un implante con células tumorales de colon CT26.

Las Figuras 51A-B muestran los resultados de experimentos que demuestran que los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra PD-1 estimulan la proliferación de linfocitos T, y la secreción de IFN-gamma en células que contienen linfocitos T reguladores. La Figura 50A es un gráfico de barras que muestra la proliferación de linfocitos T dependiente de la concentración usando el HuMab 5C4; La Figura 50B es un gráfico de barras que muestra la secreción de IFN-gamma dependiente de la concentración usando el HuMab 5C4.

50 Las Figuras 52A-B muestran los resultados de experimentos que demuestran que los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra PD-1 estimulan la proliferación de linfocitos T, y la secreción de IFN-gamma en cultivos que contienen linfocitos T activados. La Figura 51A es un gráfico de barras que muestra la proliferación de linfocitos T dependiente de la concentración usando el HuMab 5C4; La Figura 51B es un gráfico de barras que muestra la secreción de IFN-gamma dependiente de la concentración usando el HuMab 5C4.

55 La Figura 53 muestra los resultados de un ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) que demuestra que los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra PD-1 destruyen los linfocitos T humanos activados de una forma dependiente de la concentración de ADCC respecto a la región Fc del anticuerpo dirigido contra PD-1.

60 La Figura 54 muestra los resultados de un ensayos de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) que demuestra que los anticuerpos monoclonales dirigidos contra PD-1 no destruyen los linfocitos T humanos activados de una forma dependiente de la concentración de CDC.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a anticuerpos monoclonales aislados, especialmente anticuerpos monoclonales humanos, que se unen específicamente a PD-1. En determinados aspectos, los anticuerpos de la divulgación presentan una o más propiedades funcionales deseables, tales como elevada afinidad de unión a PD-1, falta de reactividad cruzada con otros miembros de la familia de CD28, la capacidad de estimular la proliferación de linfocitos T, secreción de IFN- γ y/o de IL-2 en reacciones de linfocitos mixtos, la capacidad de inhibir la unión de uno o más ligandos de PD-1 (por ejemplo, PD-L1 y/o PD-L2), la capacidad de reaccionar de forma cruzada con PD-1 de macaco, la capacidad de estimular las respuestas de memoria específicas de antígeno y/o la capacidad de inhibir el crecimiento de células tumorales *in vivo*. De manera adicional o alternativa, los anticuerpos de la divulgación se derivan de secuencias específicas de las cadenas ligeras y pesadas de la línea germinal y/o comprenden rasgos estructurales específicos tales como regiones CDR que comprenden secuencias de aminoácidos específicas. La invención se refiere al uso combinado de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a PD-1 y anticuerpos que se unen específicamente a CTLA-4.

Los inventores describen métodos para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto utilizando anticuerpos dirigidos contra PD-1. Tal como se demuestra en el presente documento, los anticuerpos dirigidos contra PD-1 son capaces de inhibir el crecimiento de células tumorales *in vivo*. La divulgación se refiere también a métodos para usar los anticuerpos para modificar una respuesta inmunitaria, así como para tratar enfermedades tales como cáncer o enfermedades infecciosas, o para estimular una respuesta autoinmunitaria protectora o para estimular respuestas inmunitarias específicas de antígeno (por ejemplo, mediante la administración simultánea de un anti-PD-1 con un antígeno de interés).

Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, se definen previamente determinados términos. Se proporcionan definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

Las expresiones "Muerte programada 1", "Muerte celular programada 1", "Proteína PD-1", "PD-1", "PD1", "PDCD1", "hPD-1" y "hPD-1" se usan de forma indistinta, e incluyen variantes, isoformas, homólogos de especies de PD-1 humana y análogos que tienen al menos un epítipo común con PD-1. La secuencia completa de PD-1 puede encontrarse con el número de registro de GenBank U64863.

Las expresiones "antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos", "CTLA-4", "CTLA4", "antígeno de CTLA-4" y "CD152" (véase, por ejemplo, Murata, *Am. J. Pathol.* (1999) 155:453-460) se usan de forma indistinta, e incluyen variantes, isoformas, homólogos de especies de CTLA-4 humana y análogos que tienen al menos un epítipo común con CTLA-4 (véase, por ejemplo, Balzano (1992) *Int. J. Cancer Suppl.* 7:28-32). La secuencia completa de ácido nucleico de CTLA-4 puede encontrarse con el número de registro de GenBank L15006.

La expresión "respuesta inmunitaria" se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células presentadoras de antígenos, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (incluyendo anticuerpos, citoquinas, y complemento) que da como resultado un daño selectivo en, la destrucción de o la eliminación en el cuerpo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas, o, en los casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

Una "ruta de transducción de la señal" se refiere a la relación bioquímica entre varias moléculas de transducción de la señal que tienen un papel en la transmisión de una señal desde una parte de una célula a otra parte de una célula. Como se usa en el presente documento, la expresión "receptor de la superficie celular" incluye, por ejemplo, moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y la transmisión de dicha señal a través de la membrana plasmática de una célula. Un ejemplo de un "receptor de la superficie celular" de la presente invención es el receptor PD-1.

El término "anticuerpo" tal como se cita en el presente documento incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno) o sus cadenas individuales. Un anticuerpo se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) conectadas entre sí mediante enlaces disulfuro, o una porción de unión a antígeno del mismo. Cada cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada (abreviada en el presente documento como V_H) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera (abreviada en el presente documento como V_L) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera comprende un dominio, C_L . Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR, del inglés *complementarity determining regions*), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada una de las V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con el antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del hospedador, incluidas diferentes células del sistema inmunitario (por

ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

La expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente la "porción del anticuerpo"), como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, PD-1). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados en la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1} ; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento de dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio V_H ; y (vi) una región determinante de la complementariedad aislada (CDR). Asimismo, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes independientes, estos se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite conformar una sola cadena de proteína en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenarias (scFv); véanse, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426, y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). También se pretende que dichos anticuerpos monocatenarios estén comprendidos en la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas de los expertos en la materia y se seleccionan según su utilidad del mismo modo que los anticuerpos intactos.

Un "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que está prácticamente exento de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une de manera específica a PD-1 está prácticamente exento de anticuerpos que se unen de manera específica a antígenos que no sean PD-1). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas PD-1 procedentes de otras especies. Sin embargo, un anticuerpo aislado puede estar prácticamente exento de otros materiales celulares y/o químicos.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se usan en el presente documento se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpos de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una especificidad y afinidad de unión únicas para un epítipo concreto.

La expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones marco como las regiones CDR provienen de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Asimismo, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria y de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en que los que secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se hayan injertado en secuencias marco humanas.

La expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que expresan una única especificidad de unión que tiene regiones variables a la vez en las regiones marco y CDR que se han derivado de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada humana y un transgén de la cadena ligera fusionados a una célula inmortalizada.

La expresión "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se han preparado, expresado, creado o aislado por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para los genes de las inmunoglobulinas humanas o un hibridoma preparado a partir de las mismas (descrito con mayor detalle más adelante), (b) anticuerpos aislados a partir de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatoria recombinante, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implica el corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulinas humanas en otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones del marco y las CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes se pueden someter a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y de esta manera, las secuencias de aminoácidos de las regiones de V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se derivan y están relacionadas con las secuencias de V_H y V_L de una línea germinal humana, pueden no existir de manera natural *in vivo* en el repertorio de la línea germinal del anticuerpo humano.

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

Las expresiones "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico de un antígeno" se utilizan de manera indistinta en el presente documento con el término "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

La expresión "derivados de anticuerpos humanos" se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo humano, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

Se pretende que el término "anticuerpo humanizado" se refiera a anticuerpos en los que las secuencias de las CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se hayan injertado en secuencias marco humanas. Se pueden realizar modificaciones adicionales en la región marco dentro de las secuencias del marco humanas.

Se pretende que el término "anticuerpo quimérico" se refiera a anticuerpos en los que las secuencias de la región variable se derivan de una especie y las secuencias de la región constante se derivan de otra especie, tal como un anticuerpo, en el que las secuencias de la región variable se derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de la región constante se derivan de un anticuerpo humano.

Como se usa en el presente documento, un anticuerpo que "se une específicamente a PD-1 humana" pretende referirse a un anticuerpo que se une a la PD-1 humana con una K_D de 1×10^{-7} M o menos, más preferentemente 5×10^{-8} M o menos, más preferentemente 1×10^{-8} M o menos, más preferentemente 5×10^{-9} M o menos.

Se pretende que el término " K_{asoc} " o " K_a ", tal como se usa en el presente documento, se refiera a la velocidad de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno concreta, mientras que el término " K_{dis} " o " K_d ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno concreta. Se pretende que el término " K_d ", tal como se usa en el presente documento, se refiera a la constante de disociación, que se obtiene a partir de la relación de K_d a K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de K_D se pueden determinar para anticuerpos utilizando métodos bien establecidos en la materia. Un método preferido para determinar la K_D de un anticuerpo es utilizar la resonancia de plasmón superficial, preferentemente mediante el uso de un sistema de biodetección tal como el sistema Biacore®.

Como se usa en el presente documento, La expresión "elevada afinidad" para un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10^{-8} M o menos, más preferentemente 10^{-9} M o menos e incluso más preferentemente 10^{-10} M o menos para un antígeno diana. Sin embargo, la unión con "alta afinidad" puede variar para otros isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, la unión con "elevada afinidad" para un isotipo de IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10^{-7} M o menos, más preferentemente 10^{-8} M o menos, incluso más preferentemente 10^{-9} M o menos.

El término "tratamiento" o "terapia" se refiere a la administración de un principio activo con el objetivo de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, mejorar, avanzar la curación o alterar una dolencia (por ejemplo, una enfermedad), los síntomas de la dolencia, o evitar o retrasar el inicio de los síntomas, complicaciones, indicios bioquímicos de una enfermedad, o detener o inhibir de otro modo el desarrollo adicional de la enfermedad, dolencia o trastorno de una forma estadísticamente significativa.

Un "acontecimiento adverso" (AE) como se utiliza en el presente documento, es cualquier signo (incluido un hallazgo de laboratorio anómalo), síntoma o enfermedad desfavorables, generalmente inesperados, asociados con el uso de un tratamiento médico. Por ejemplo, un acontecimiento adverso puede estar asociado con la activación del sistema inmunitario o la expansión de células del sistema inmunitario (por ejemplo, linfocitos T) en respuesta a un tratamiento. Un tratamiento médico puede tener uno o más AE asociados, y cada AE puede tener el mismo nivel de gravedad, o uno diferente. Una referencia a métodos capaces de "alterar acontecimientos adversos" significa un régimen de tratamiento que disminuye la incidencia y/o la gravedad de uno o más AE asociados con el uso de un régimen de tratamiento diferente.

Como se usa en el presente documento, "enfermedad hiperproliferativa" se refiere a dolencias en las que el crecimiento celular está aumentado sobre los niveles normales. Por ejemplo, enfermedades o trastornos hiperproliferativos incluyen las enfermedades neoplásicas malignas (por ejemplo, cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer biliar) y de enfermedades neoplásicas no malignas (por ejemplo, aterosclerosis, hiperplasia benigna, hipertrofia prostática benigna).

Como se usa en el presente documento, "dosis subterapéutica" significa una dosis de un compuesto terapéutico (por ejemplo, un anticuerpo) que es menor que la dosis normal o típica del compuesto terapéutico cuando se administra en solitario para el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa (por ejemplo, cáncer). Por ejemplo, una dosis subterapéutica de un anticuerpo de CTLA-4 es una sola dosis del anticuerpo en menos de aproximadamente 3 mg/kg, es decir, la dosis conocida del anticuerpo dirigido contra CTLA-4.

El uso de la alternativa (por ejemplo, "o") deberá entenderse que significa uno cualquiera, ambos, o cualquier combinación de las alternativas citadas. Tal como se usa en el presente documento, los artículos indefinidos uno o "una" deberán considerarse referidos a "uno o más" de cualquier componente citado o enumerado.

5 Como se usa en el presente documento, "aproximadamente" o "que comprende esencialmente de" significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular determinado por un experto en la materia, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, es decir, de las limitaciones del sistema de medida. Por ejemplo, "aproximadamente" o "que comprende esencialmente de" puede significar comprendido dentro de 1 desviación estándar, o más de 1 desviación estándar, según lo habitual en la técnica. Como alternativa, "aproximadamente" o
10 "que comprende esencialmente de" puede significar un intervalo de hasta el 20 %. Asimismo, particularmente con respecto a los sistemas o procesos biológicos, los términos pueden significar un orden de magnitud de hasta 5 veces un valor. Cuando se proporcionan valores particulares en la solicitud y en las reivindicaciones, salvo que se indique otra cosa, el significado de "aproximadamente" o "que comprende esencialmente de" deberá asumirse comprendido en un intervalo de error aceptable para dicho valor concreto.

15 Tal como se describe en el presente documento, cualquier intervalo de concentración, intervalo de porcentaje, intervalo de relaciones o intervalo de números enteros debe entenderse que incluye el valor de cualquier número entero dentro del intervalo citado y, cuando es apropiado, fracciones del mismo (tal como una décima y una centésima de un número entero), salvo que se indique otra cosa.

20 Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, aves de corral, anfibios, reptiles, etc. Salvo donde se indica, los términos "paciente" y "sujeto" se utilizan de forma indistinta.

25 Diversos aspectos de la invención se describen con más detalle en los siguientes subapartados.

Anticuerpos dirigidos contra PD-1

30 Los anticuerpos descritos en el presente documento se caracterizan por rasgos funcionales particulares o propiedades de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos que se unen específicamente a PD-1 (por ejemplo, se unen a la PD-1 humana y pueden reaccionar de forma cruzada con PD-1 de otras especies, tal como macaco). Preferiblemente, un anticuerpo descrito en el presente documento se une a PD-1, con alta afinidad, por ejemplo, con una K_D de 1×10^{-7} M o menos. Los anticuerpos dirigidos contra PD-1 de la divulgación presentan preferentemente
35 una o más de las siguientes características:

- (a) se une a PD-1 humana con una K_D de 1×10^{-7} M o menos;
- (b) no se une prácticamente a CD28, CTLA-4 o ICOS humanos;
- (c) aumenta la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción mixta de linfocitos (MLR);
- 40 (d) aumenta la producción de interferón gamma en un ensayo MLR;
- (e) aumenta la secreción de IL-2 en un ensayo MLR;
- (f) se une PD-1 humana y a PD-1 de macaco;
- (g) inhibe la unión de PD-L1 y/o PD-L2 a PD-1;
- (h) estimula las respuestas de memoria específicas de antígeno;
- 45 (i) estimula las respuestas de anticuerpos;
- (j) inhibe el crecimiento de células tumorales *in vivo*.

Preferentemente, el anticuerpo se une a la PD-1 humana con una K_D de 5×10^{-8} M o menos, se une a PD-1 humana con una K_D de 1×10^{-8} M o menos, se une a la PD-1 humana con una K_D de 5×10^{-9} M o menos, o se une a la PD-1
50 humana con una K_D de entre 1×10^{-8} M y 1×10^{-10} M o menos.

Un anticuerpo de la divulgación puede presentar cualquier combinación de las características anteriormente relacionadas, tales como dos, tres, cuatro, cinco o más de las características anteriormente relacionadas.

55 Se conocen en la técnica ensayos para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos frente a PD-1 humana, que incluyen, por ejemplo, ELISA, la transferencia Western y la RIA. La cinética de unión (por ejemplo, afinidad de unión) de los anticuerpos también puede evaluarse por ensayos convencionales conocidos en la técnica, tal como análisis Biacore. Los ensayos adecuados para evaluar cualquiera de las características anteriormente descritas se describen con detalle en los Ejemplos.

Los anticuerpos monoclonales 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 y 5F4

60 Un anticuerpo preferido para su uso en la presente invención es el anticuerpo 5C4. Los inventores también describen los anticuerpos monoclonales humanos 17D8, 2D3, 4H1, 4A11, 7D3 y 5F4 aislados y caracterizado estructuralmente como se describe en los Ejemplos 1 y 2. Las secuencias de aminoácidos de la V_H de 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 y 5F4 se muestran en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, respectivamente. Las secuencias de
65

aminoácidos de la V_L de 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 y 5F4 se muestran en las SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14, respectivamente.

5 La divulgación proporciona anticuerpos que comprenden las CDR1, CDR2 y CDR3 de las cadenas pesada y ligera de 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 y 5F4, o combinaciones de los mismos. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de la V_H de 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 y 5F4 se muestran en las SEQ ID NOs: 15, 16, 17, 18, 19, 20 y 21, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de la V_H de 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 y 5F4 se muestran en las SEQ ID NOs: 22, 23, 24, 25, 26, 27 y 28, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de la V_H de 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 y 5F4 se muestran en las SEQ ID NOs: 29, 30, 31, 32, 33, 34 y 35, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de la V_K de 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 y 5F4 se muestran en las SEQ ID NOs: 36, 37, 38, 39, 40, 41 y 42, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de la V_K de 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 y 5F4 se muestran en las SEQ ID NOs: 43, 44, 45, 46, 47, 48 y 49, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de la V_K de 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 y 5F4 se muestran en las SEQ ID NOs: 50, 51, 52, 53, 54, 55 y 56, respectivamente. Las regiones CDR están delineadas mediante el sistema Kabat (Kabat, E. A, *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N.º 91-3242).

20 La Tabla 1 siguiente muestra numerosos cambios de aminoácidos en las regiones marco de los anticuerpos dirigidos contra PD-1 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 y 5F4 que difieren de la secuencia de la cadena pesada de la línea germinal precursora. Para devolver uno o más de los restos de aminoácidos de las secuencias de la región marco a su configuración de la línea germinal, las mutaciones somáticas se pueden "retromutar" a la secuencia de la línea germinal mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR.

25 Se pueden producir cambios de aminoácidos en las regiones marco de los anticuerpos dirigidos contra PD-1 que difieren de la secuencia de la cadena ligera de la línea germinal precursora. Por ejemplo, para 17D8, el resto de aminoácido n.º 47 (dentro de FR2) de V_K es una isoleucina mientras que ese resto en la correspondiente V_K de la secuencia de la línea germinal L6 es una leucina. Para restablecer las secuencias de la región marco a su configuración de la línea germinal, las mutaciones somáticas se pueden "retromutar" a la secuencia de la línea germinal mediante, por ejemplo, mutagénesis de sitio dirigido o mutagénesis mediada por PCR (por ejemplo, el resto de aminoácido n.º 47 (resto n.º 13 de FR2) de la V_K de 17D8 se puede "retromutar" de isoleucina a leucina).

30 Como ejemplo adicional, para 4A11, el resto de aminoácido n.º 20 (dentro de FR1) de V_K es una serina mientras que ese resto en la correspondiente V_K de la secuencia de la línea germinal L15 es una treonina. Para restablecer las secuencias de la región marco a su configuración de la línea germinal, por ejemplo, el resto n.º 20 de la V_K de 4A11 se puede "retromutar" de serina a treonina. También se pretende que dichos anticuerpos "retromutados" estén abarcados por la invención.

40 El alineamiento de las regiones de V_H para 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 y 7D3, contra la secuencia de la V_H 3-33 de la línea germinal precursora se muestra en la Figura 8. El alineamiento de las regiones de V_H para 4A11 y 5F4 contra la secuencia de V_H 4-39 de la línea germinal precursora se muestra en la Figura 11.

Tabla 1. Modificaciones de los anticuerpos 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 y 5F4 desde la configuración de la cadena pesada de la línea germinal.

Ab Anti-PD-1	Posición de aminoácido	Aminoácido del anticuerpo	Aminoácido original en la configuración de la línea germinal
17D8	10	D	G
	16	G	R
	27	V	F
	28	A	T
	78	M	T
	93	M	V
2D3	10	D	G
	27	L	F
	30	T	S
	85	N	S
	98	T	R
4H1	3	Y	Q
	84	T	N

(continuación)

Ab Anti-PD-1	Posición de aminoácido	Aminoácido del anticuerpo	Aminoácido original en la configuración de la línea germinal
	88	V	A
	98	s	R
5C4	21	D	S
	23	K	A
	27	I	F
	80	F	Y
	98	T	R
4A11	29	L	I
	79	Q	H
	98	V	A
7D3	23	T	A
	24	T	A
	27	I	F
	70	L	I
	74	D	N
	97	V	A
	98	T	R
5F4	23	S	T
	29	L	I
	51	A	G
	77	R	K

Otro tipo de modificación en la región marco implica mutar uno o más restos en la región marco o incluso en una o más regiones CDR, para eliminar epítomos de linfocitos T y reducir de este modo la posible inmunogenicidad del anticuerpo. Esta estrategia también se denomina "desinmunización" y se describe con más detalle en la publicación de patente de Estados Unidos N.º 20030153043 de Carr et al.

5 De forma adicional o alternativa a las modificaciones realizadas en la región marco o en las regiones CDR, los anticuerpos de la divulgación se pueden genomanipular para incluir modificaciones en la región Fc, normalmente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la semivida en suero, la fijación del complemento, la unión al receptor Fc y/o la citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Asimismo, un anticuerpo de la presente divulgación se puede modificar químicamente (por ejemplo, se pueden unir uno o más restos químicos al anticuerpo) o modificarse para alterar su glicosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe con más detalle a continuación. La numeración de los restos de la región Fc es la del índice de la UE de Kabat.

15 En un ejemplo, la región bisagra de CH1 se modifica de manera que se altera el número de restos cisteína en la región bisagra, por ejemplo, se aumenta o se disminuye. Esta estrategia se describe con más detalle en la patente de Estados Unidos N.º 5.677.425 de Bodmer *et al.* El número de restos cisteína en la región bisagra de CH1 se altera para, por ejemplo, facilitar el ensamblaje de las cadenas ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

20 En otro ejemplo, la región bisagra de Fc de un anticuerpo se muta para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más concretamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de la interfase del dominio CH2-CH3 del fragmento bisagra-Fc de manera que el anticuerpo tiene una unión a la proteína A estafilocócica (SpA) deteriorada comparada con la unión a SpA de Fc-bisagra natural. Esta aproximación se describe en mayor detalle en la patente de Estados Unidos N.º 6.165.745 de Ward *et al.*

25 En otro ejemplo, el anticuerpo se modifica para aumentar su semivida biológica. Son posibles diversas estrategias. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la patente de los Estados Unidos n.º 6.277.375 de Ward. Como alternativa, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo se puede alterar en la región CH1 o CL para que contenga un epítomo de unión al receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, tal como se describe en las patentes de Estados Unidos 5.869.046 y 6.121.022 de Presta et al.

35 En otro ejemplo adicional, la región Fc se altera sustituyendo al menos un resto de aminoácido por un resto de aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos

seleccionados de entre los restos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 se pueden sustituir por un resto de aminoácido diferente de manera que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector pero mantenga la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo precursor. El ligando efector para el que se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Esta estrategia se describe en detalle en las patentes de Estados Unidos con números 5.624.821 y 5.648.260, ambas de Winter et al.

En otro ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los restos de aminoácidos 329, 331 y 322 se pueden sustituir por un resto de aminoácido diferente de manera que el anticuerpo tenga una unión a C1q alterada y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o eliminada. Esta estrategia se describe en detalle en la patente de Estados Unidos n.º 6.194.551 de Idusogie *et al.* En otro ejemplo, uno o más restos de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 231 y 239 se alteran para modificar de esta forma la capacidad del anticuerpo de fijarse al complemento. Esta estrategia se describe en detalle en la publicación PCT WO 94/29351 de Bodmer et al.

En otro ejemplo más, la región Fc está modificada para aumentar la capacidad del anticuerpo de mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcγ modificando uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Esta estrategia se describe adicionalmente en la publicación PCT WO 00/42072 de Presta. Además, los sitios de unión sobre la IgG1 humana para FcγR1, FcγR2, FcγR3 y FcγR4 se ha cartografiado, y se han descrito variantes con unión mejorada (véase Shields, R.L. et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604). Se ha demostrado que mutaciones específicas en posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 mejoran la unión a FcγR3. De manera adicional, se ha mostrado que los siguientes mutantes combinados mejoran la unión a FcγR3: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A.

En otro ejemplo más, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede alterarse para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dichas modificaciones en los carbohidratos se pueden llevar a cabo, por ejemplo, mediante la alteración de uno o más sitios de glicosilación en la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden hacer una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación en la región marco variable para eliminar de este modo la glicosilación en ese sitio. Dicha aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dicho enfoque se describe con más detalle en las patentes de Estados Unidos números 5.714.350 y 6.350.861 de Co et al.

De manera adicional o alternativa, se puede preparar un anticuerpo que tiene un tipo de glicosilación alterado, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de restos fucosilo o un anticuerpo que tiene que tiene estructuras GlcNAc bisectadas en más cantidad. Se ha demostrado que tales patrones de glicosilación alterada aumentan la capacidad ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de hidratos de carbono se pueden lograr mediante, por ejemplo, la expresión del anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria de glicosilación alterada. Las células con la maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la materia y se pueden usar como células hospedadoras en las que expresar anticuerpos recombinantes de la invención para producir de este modo un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, las líneas de células Ms704, Ms705, y Ms709 carecen del gen de la fucosiltransferasa, FUT8 (alfa (1,6) fucosiltransferasa), de tal manera que los anticuerpos expresados en las líneas de células theMs704, Ms705 y Ms709 carecen de fucosa en sus hidratos de carbono. Las líneas de células Ms704, Ms705, y Ms709 FUT8-/- se crearon mediante perturbación dirigida del gen FUT8 en células CHO/DG44 usando dos vectores de sustitución (véanse la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20040110704) de Yamane et al y Yamane-Ohnuki et al. (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22). Como ejemplo adicional, el documento EP 1.176.195 de Hanai et al. describe una línea de células con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosiltransferasa, de tal manera que los anticuerpos expresados en dicha línea de células presentan hipofucosilación al reducir o eliminar la enzima relacionada con el enlace alfa-1,6. Hanai et al. describen también líneas de células que tienen una baja actividad enzimática para añadir fucosa a la N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo o que no tiene actividad enzimática, por ejemplo, la línea de células YB2/O de mieloma de rata (ATCC CRL 1662). La publicación PCT WO 03/035835 de Presta describe una variante de la línea de células CHO, células Lec13, con capacidad reducida para unir fucosa a los hidratos de carbono unidos a Asn(297), que también da como resultado una hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (véase también Shields, R.L. et al. (2002) *J Biol. Chem.* 277:26733-26740). La publicación de la PCT WO 99/54342 de Umana et al. describe líneas de células diseñadas mediante ingeniería genética para expresar glicosil transferasas que modifican glicoproteínas (por ejemplo, beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de tal forma que los anticuerpos expresados en las líneas de células genomanipuladas presentan un aumento de estructuras GlcNAc bisectantes que da como resultado un aumento en la actividad ADCC de los anticuerpos (véase también Umana et al (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180). Como alternativa, los restos de fucosa del anticuerpo se pueden escindir usando una enzima fucosidasa. Por ejemplo, la fucosidasa alfa-L-fucosidasa elimina restos fucosilo de los anticuerpos (Tarentino, A.L. et al. (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

Otra modificación de los anticuerpos que se contempla en el presente documento es la pegilación. Se puede pegar un anticuerpo para, por ejemplo, aumentar la semivida biológica (por ejemplo, en suero) del anticuerpo. Para pegar

un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento del mismo, se hace reaccionar normalmente con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o un derivado de aldehído de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos PEG quedan unidos al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Preferentemente, la pegilación se lleva a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Como se usa en el presente documento, el término "polietilenglicol" pretende abarcar cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivatizar otras proteínas, tales como monoalcoxi (C1-C10) o ariloxipolietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En ciertas realizaciones, el anticuerpo a pegilar es un anticuerpo aglucosilado. Los métodos para pegilar proteínas son conocidos en la materia y se pueden aplicar a los anticuerpos de la invención. Véanse, por ejemplo, el documento EP 0 154 316 de Nishimura et al., y el documento EP 0 401 84 de Ishikawa et al.,

Moléculas de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos

Los inventores también describen moléculas de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la divulgación. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado de células, o en una forma parcialmente purificada o prácticamente pura. Un ácido nucleico está "aislado" o "convertido en prácticamente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas convencionales, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, formación de bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en la materia. Véanse, F. Ausubel, *et al.* (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing y Wiley Interscience, Nueva York. Un ácido nucleico de la divulgación puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede contener o no secuencias intrónicas. En un ejemplo preferido, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Los ácidos nucleicos de la divulgación pueden obtenerse usando técnicas de biología molecular convencionales. Para los anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos que contienen genético de la inmunoglobulina humana como se describe más detalladamente a continuación), los ADNc que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo fabricados por el hibridoma se pueden obtener mediante amplificación PCR convencional o técnicas de clonación del ADNc. Para los anticuerpos obtenidos a partir de una genoteca de inmunoglobulina (por ejemplo, usando técnicas de expresión en fago), se puede recuperar ácido nucleico que codifica el anticuerpo de la biblioteca.

Las moléculas de ácidos nucleicos preferidas de la divulgación son las que codifican las secuencias V_H y V_L de los anticuerpos monoclonales 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 o 5F4. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias de la V_H de 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 y 5F4 se muestran en las SEQ ID NOs: 57, 58, 59, 60, 61, 62 y 63, respectivamente. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias de la V_L de 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 y 5F4 se muestran en las SEQ ID NOs: 64, 65, 66, 67, 68, 69 y 70, respectivamente.

Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican los segmentos V_H y V_L , estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente mediante técnicas de ADN recombinante convencionales, por ejemplo, para convertir los genes de la región variable en genes de la cadena del anticuerpo de longitud completa, en los genes del fragmento Fab o en un gen de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica V_L o V_H se une operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. La expresión "unido operativamente", tal como se usa en este contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN se unen de tal manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en marco.

El ADN aislado que codifica la región V_H puede convertirse en un gen de la cadena pesada de longitud completa uniendo operativamente el ADN que codifica la V_H a otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena pesada humana se conocen en la materia (véase por ejemplo, Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación de NIH N.º 91-3242) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación PCR convencional. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero lo más preferible es una región constante de IgG1 o IgG4. Para un gen de la cadena pesada de un fragmento Fab, el ADN que codifica V_H puede estar unido operativamente a otra molécula de ADN que codifica solo la región constante CH1 de la cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región V_L puede convertirse en un gen de la cadena ligera de longitud completa (así como un gen de la cadena ligera de Fab) uniendo operativamente el ADN que codifica V_L a otra molécula de ADN que codifica la región constante de la cadena ligera, CL. Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena ligera humana se conocen en la materia (véase por ejemplo, Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación de NIH N.º 91-3242) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación PCR convencional. La región constante de la cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, pero lo más preferible es una región constante kappa.

Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican VH y VL están unidos operativamente a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃, de tal manera que las secuencias VH y VL pueden expresarse como una proteína monocatenaria contigua, donde las regiones VL y VH están unidas mediante el enlazador flexible (véanse, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al (1988) Proc. Natl. Acad. Set USA 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554).

Producción de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) de la presente divulgación se pueden producir mediante diferentes técnicas, incluida metodología convencional de anticuerpos monoclonales (por ejemplo, la técnica de hibridación de células somáticas convencional de Kohler y Milstein (1975) Nature 256: 495. Aunque se prefieren los procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, se pueden emplear otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales (por ejemplo, la transformación vírica o mediante oncogenes de linfocitos B.

El sistema animal preferido para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Los protocolos de inmunización y las técnicas de aislamiento de los esplenocitos inmunizados para su fusión son conocidos en la técnica. Los ligandos de fusión (por ejemplo, células de mieloma de murino) y los procedimientos de fusión son también conocidos.

Se pueden preparar anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente divulgación basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado como se ha descrito anteriormente. El ADN que codifica las cadenas ligera y pesada de la inmunoglobulina se pueden obtener a partir del hibridoma murino de interés, y genomanipularse para contener secuencias de inmunoglobulina no murinas (por ejemplo humanas) usando técnicas convencionales de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables de murino se pueden unir a regiones constantes humanas usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.816.567 de Cabilly et al.). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR de murino se pueden introducir en un marco humano usando métodos conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.225.539 de Winter, y las patentes de Estados Unidos con números 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen et al.).

En un ejemplo preferido, los anticuerpos de la divulgación son anticuerpos monoclonales humanos. Dichos anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra PD-1 humana se pueden generar utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que contienen partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones denominados en el presente documento como ratones HuMAb y ratones KMTM, respectivamente, y se denominan conjuntamente en el presente documento "ratones Ig humanos".

El HuMAb Mouse® (Medarex, Inc.) contiene miniloci del gen de la inmunoglobulina humana que codifican las secuencias de la inmunoglobulina de la cadena pesada (μ y γ) y la cadena ligera k humana no reordenadas junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci endógenos de las cadenas μ y k (véase por ejemplo, Lonberg, et al. (1994) Nature 368(6474): 856- 859). En consecuencia, los ratones presentan una expresión reducida de IgM o κ de ratón y, en respuesta a la inmunización, los transgenes de la cadena pesada y ligera introducidos experimentan cambio de clase y mutación somática para generar monoclonales humanos IgGκ de alta afinidad (Lonberg, N. et al. (1994), más arriba, revisado en Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) Ann. NY Acad. Sci. 764:536- 546). La preparación y uso del ratón HuMAb, y las modificaciones genómicas que lleva dicho ratón, se describen adicionalmente en Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20:6287- 6295; Chen, i. et al. (1993) International Immunology 5: 647-656; Tuailon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724; Choi et al. (1993) Nature Genetics 4:111-123; Chen, J. et al. (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuailon et al. (1994) Immunol. 152:2912- 2920; Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6: 579-591; y Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851. Véanse además, las patentes de Estados Unidos números 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todas de Lonberg y Kay; la patente de Estados Unidos n.º 5.545.807 de Turner et al.;

las publicaciones PCT con números WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas de Lonberg y Kay; y la Publicación PCT n.º WO 01/14424 de Korman et al.

En otro ejemplo, los anticuerpos humanos pueden sensibilizarse utilizando un ratón que contiene secuencias de la inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, Dicho ratón transporta un transgén de la cadena pesada humana y un transcromosoma de la cadena ligera humana. Dichos ratones, citados en el presente documento como "KM miceTM", se describen detalladamente en la publicación PCT WO 02/43478 de Ishida et al.

Adicionalmente, sistemas de animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y se pueden utilizar para sensibilizar los anticuerpos dirigidos contra PD-1. Por ejemplo, se puede utilizar un sistema transgénico alternativo denominado Xenomouse (Abgenix, Inc.); dichos ratones se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584

y 6.162.963 de Kucherlapati et al.

Además, sistemas de animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y se pueden utilizar para sensibilizar los anticuerpos dirigidos contra PD-1 de la divulgación. Por ejemplo, ratones que tienen tanto un transcromosoma de la cadena pesada humana como un transcromosoma de la cadena ligera humana, denominados como "ratones TC" son de utilidad; dichos ratones se describe en Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Asimismo, se han descrito en la técnica vacas que tienen transcromosomas de la cadena pesada y ligera humana (Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894) y se puede utilizar para sensibilizar los anticuerpos dirigidos contra PD-1 de la divulgación.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la divulgación también se pueden preparar usando métodos de expresión in fago para cribar genotecas de inmunoglobulina humana. Dichos métodos de expresión in fago para aislar anticuerpos humanos están establecidos en la técnica. Véanse, por ejemplo: las patentes de Estados Unidos números 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 de Ladner et al., las patentes de Estados Unidos con números 5.427.908 y 5.580.717 de Dower et al.; las patentes de Estados Unidos con números 5.969.108 y 6.172.197 de McCafferty et al.; y las patentes de EE.UU. n.º 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 de Griffiths et al.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la divulgación también se pueden preparar usando ratones SCID en los que se han reconstituido células inmunitarias humanas de tal manera que se puede generar una respuesta de anticuerpos humanos tras la inmunización. Dichos ratones se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos con números 5.476.996 y 5.698.767 de Wilson et al.

Inmunización de ratones con Ig humana

Cuando se usan ratones con Ig humana para sensibilizar los anticuerpos humanos de la divulgación, dichos ratones se pueden inmunizar con una preparación purificada o enriquecida del antígeno PD-1 y/o PD-1 recombinante, o una proteína de fusión PD-1, como se describe en Lonberg, N. et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851; y en las publicaciones PCT WO 98/24884 y WO 01/14424. Preferentemente, el ratón tendrá 6-16 semanas de edad durante la primera infusión. Por ejemplo, se puede usar una preparación purificada o recombinante (5-50 µg) del antígeno PD-1 para inmunizar por vía intraperitoneal los ratones con Ig humana.

Los procedimientos detalladas para generar anticuerpo monoclonales completamente humanos contra PD-1 se describen en el Ejemplo 1, más adelante. La experiencia acumulada con varios antígenos ha demostrado que el ratón transgénico responde cuando se inmuniza inicialmente por vía intraperitoneal (IP) con antígeno en adyuvante completo de Freund, seguido por inmunizaciones IP en semanas alternas (hasta un total de 6) con antígeno en adyuvante incompleto de Freund. Sin embargo, se ha descubierto que también son eficaces otros adyuvantes diferentes a los de Freund. Además, se ha descubierto que las células completas, en ausencia de adyuvante, son fuertemente inmunógenas. La respuesta inmunitaria se puede vigilar durante el protocolo de inmunización con muestras de plasma, que se obtiene mediante extracción de sangre retroorbital. El plasma se puede cribar por ELISA (como se describe más adelante), y los ratones con títulos de inmunoglobulina humana contra PD-1 suficientes se pueden usar en las fusiones. Se puede proporcionar un refuerzo por vía intravenosa a los ratones con el antígeno 3 días antes del sacrificio y extirpación de los bazo. Se espera que sean necesarias 2-3 fusiones para cada inmunización. Para cada antígeno se suelen inmunizar entre 6 y 24 ratones. Normalmente, se utilizan ambas cepas HCo7 y HCo12. Además, ambos transgenes HCo7 y HCo12 se pueden reproducir conjuntamente en un mismo ratón que tenga dos transgenes de cadena pesada humana diferentes (HCo7/HCo12). De manera alternativa o adicional, se puede usar la cepa KM mouse™, como se describe en el Ejemplo 1.

Generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales humanos

Para generar hibridomas productores de anticuerpos monoclonales humanos, se pueden aislar esplenocitos y/o células de ganglios linfáticos de ratones inmunizados y fusionarse en una línea de células inmortalizadas adecuadas, tal como una línea de células de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes se pueden cribar según la producción de anticuerpos específicos de antígenos. Por ejemplo, suspensiones monocelulares de linfocitos esplénicos procedentes de ratones inmunizados se pueden fusionar con un sexto de la cantidad de células P3X63-Ag8.653 de mieloma de ratón no secretor (ATCC, CRL 1580) con 50 % PEG. Como alternativa, las suspensiones monocelulares de linfocitos esplénicos procedentes de ratones inmunizados se puede fusionar usando un método de electrofusión basado en un campo eléctrico, usando un electroporador de fusión celular CytoPulse de cámara grande (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD). Las células se sembraron en placas a aproximadamente 2×10^5 en placa de microtitulación de fondo plano, seguido por una incubación de dos semanas en medio selectivo que contiene suero de feto Clone al 20 %, medio condicionado "653" al 18 %, 5 % de origen (IGEN), L-glutamina 4 mM, piruvato sódico 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomina, 50 mg/ml de gentamicina y 1X HAT (Sigma; el HAT se añade 24 horas después de la fusión). Después de aproximadamente dos semanas, las células se pueden cultivar en medio, donde el HAT se ha sustituido por HT. A

continuación, los pocillos individuales se cribaron mediante ELISA para buscar anticuerpos monoclonales humanos IgM e IgG. Una vez que ha producido un amplio crecimiento del hibridoma, el medio se puede observar por lo general después de 10-14 días. Los hibridomas que secretan anticuerpos se pueden volver a sembrar en placas, cribarse de nuevo, y si siguen siendo positivos para la IgG humana, los anticuerpos monoclonales pueden subclonarse al menos dos veces mediante dilución limitante.

Los subclones estables se pueden cultivar después *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpos en medio de cultivo de tejido para su caracterización.

Para purificar los anticuerpos monoclonales humanos, hibridomas seleccionados se pueden hacer crecer en matraces de centrifuga a de dos litros para la purificación del anticuerpo monoclonal. Los sobrenadantes se pueden filtrar y concentrar antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sefarosa (Pharmacia, Piscataway, N.J.). La IgG eluida se puede comprobar mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para garantizar pureza. La solución tampón se puede intercambiar por PBS, y la concentración se puede determinar por DO₂₈₀ usando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales se pueden distribuir en alícuotas y almacenarse a -80 °C.

Generación de transfectomas productores de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos de la divulgación también se puede producir en un transfectoma de célula hospedadora usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección génica como es bien conocido en la técnica (por ejemplo, Morrison, S. (1985) Science 229:1202). Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo del mismo, los ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de longitud parcial o completa, se pueden obtener por técnicas de biología molecular convencionales (por ejemplo, amplificación mediante la PCR o clonación de ADNc usando un hibridoma que expresa el anticuerpo de interés) y los ADN se pueden introducir en vectores de expresión de forma que los genes estén unidos operativamente a secuencias de control de la transcripción y la traducción. En este contexto, la expresión "operativamente unido" pretende denotar que un gen de anticuerpo está ligado en un vector de tal forma que las secuencias de control de la transcripción y la traducción dentro del vector realizan su función prevista de regular la transcripción y la traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se seleccionan para que sean compatibles con la célula hospedadora de expresión utilizada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo se pueden introducir en vectores independientes o, de forma más típica, ambos genes se introducen en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se introducen dentro del vectores de expresión por métodos convencionales (por ejemplo, ligadura de sitios de restricción complementarios del fragmento génico del anticuerpo y el vector, o una ligadura en el extremo enromado si no hay sitios de restricción presentes).

Las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera de los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden utilizar para crear genes de anticuerpos de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo introduciendo en los mismos los vectores de expresión que ya codifican las regiones constantes de la cadena pesada y la cadena ligera del isotipo deseado de tal forma que el segmento V_H está operativamente unido a uno o varios segmentos C_H del vector y el segmento V_L está operativamente unido al segmento C_L dentro del vector. De manera adicional o alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena del anticuerpo de la célula hospedadora. El gen de la cadena del anticuerpo puede clonarse en el vector de tal manera que el péptido señal se une en marco al extremo amino del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

Además de los genes de la cadena del anticuerpo, los vectores de expresión recombinante llevan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena del anticuerpo en una célula hospedadora. Se pretende que el término "secuencia reguladora" incluya promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o la traducción de los genes de la cadena del anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluida la selección de las secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para expresión en células hospedadoras de mamífero incluyen elementos víricos que dirigen altos niveles de expresión de proteína en células de mamífero, tales como los promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus simio 40 (SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y poliovirus. Como alternativa, se pueden utilizar secuencias reguladoras no víricas, tales como el promotor de la ubiquitina o el promotor de la globina β. Aún mejor, elementos reguladores compuestos de secuencias de diferentes procedencias, tales como el sistema promotor SRα, que contiene secuencias procedentes del promotor temprano de SV40 y la repetición terminal larga del virus de la leucemia de linfocitos Tipo 1 (Takebe, Y. et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472).

Además de los genes de la cadena del anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la divulgación pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de las células hospedadoras en las que se ha

introducido el vector (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel et al.). Por ejemplo, el gen marcador seleccionable transmite normalmente resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, a una célula hospedadora en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células hospedadoras dhfr- con selección/amplificación en metotrexato) y el gen neo (para selección en G418).

Para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas, el uno o varios vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se transfectan a una célula hospedadora mediante técnicas convencionales. Se pretende que las diversas formas del término "transfección" abarquen una gran variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la divulgación en células hospedadoras tanto procariotas como eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas y, con máxima preferencia, en células hospedadoras de mamífero, es lo más preferido porque dichas células eucariotas y en particular las células de mamífero, es más probable que las células procariotas se ensamblen y secreten un anticuerpo plegado e inmunológicamente activo. Se ha notificado la expresión procariota de genes de anticuerpo es ineficaz para la producción de elevados rendimientos de anticuerpos activos (Boss, M. A. y Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

Las células hospedadoras de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la divulgación incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr-, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, usadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) *J. Mol. Biol.* 759:601-621), células NSO de mieloma, células COS y células SP2. En particular, para su uso en células NSO de mieloma, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión génica GS divulgado en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036, y EP 338.841. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos se introducen en células hospedadoras de mamíferos, los anticuerpos se producen cultivando las células hospedadoras durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se hacen crecer las células hospedadoras. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo utilizando métodos de purificación de proteínas convencionales.

Caracterización de la unión del anticuerpo al antígeno

Los anticuerpos de la divulgación se pueden analizar para determinar su unión a PD-1 mediante, por ejemplo, ELISA convencional. En resumen, las placas de microtitulación se revisten con PD-1 purificada a 0,25 µg/ml en PBS, y a continuación se bloquean con albúmina de suero bovino al 5 % en PBS. Las diluciones del anticuerpo (por ejemplo, diluciones de plasma procedente de ratones inmunizados con PD-1) se añadieron a cada pocillo y se incubaron durante 1-2 horas a 37 °C. Las placas se lavaron con PBS/Tween y a continuación se incubaron con reactivo secundario (por ejemplo, para anticuerpos humanos, un reactivo policlonal específico de cabra dirigido contra IgG Fc humana) conjugado con fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37 °C. Tras el lavado, las placas se revelaron con sustrato pNPP (1 mg/ml), y se analizaron a una DO de 405-650. Preferentemente, los ratones que desarrollaron los títulos más altos se utilizarán en las fusiones.

Un ensayo ELISA, como se ha descrito anteriormente, también se puede utilizar para cribar hibridomas que muestran reactividad positiva con el inmunógeno PD-1. Los hibridomas que se unen con elevada avidéz a PD-1 se subclonaron y se caracterizaron adicionalmente. Un clon de cada hibridoma, que retiene la reactividad de las células precursoras (según ELISA), se puede seleccionar para fabricar un banco de células en 5-10 viales almacenados a -140 °C, y para la purificación del anticuerpo.

Para purificar los anticuerpos dirigidos contra PD-1, hibridomas seleccionados se pueden hacer crecer en matraces de centrifuga a de dos litros para la purificación del anticuerpo monoclonal. Los sobrenadantes se pueden filtrar y concentrar antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sefarosa (Pharmacia, Piscataway, NJ). La IgG eluida se puede comprobar mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para garantizar pureza. La solución tampón se puede intercambiar por PBS, y la concentración se puede determinar por DO₂₈₀ usando un coeficiente de extinción de 1.43. Los anticuerpos monoclonales se pueden distribuir en alícuotas y almacenarse a -80 °C.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales dirigidos contra PD-1 se unen a epitopos únicos, cada anticuerpo se puede biotinilar usando reactivos comercialmente disponibles (Pierce, Rockford, DL). Los estudios de competición con anticuerpos monoclonales no marcados y anticuerpos monoclonales biotinilados se puede llevar a cabo con placas ELISA revestidas de PD-1 como se ha descrito anteriormente. La unión de los mAb biotinilados se puede detectar con una sonda estreptavidina-fosfatasa alcalina.

Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, se pueden llevar a cabo ELISA de isotipo usando reactivos específicos para los anticuerpos de un isotipo en particular. Por ejemplo, para determinar el isotipo de un anticuerpo

monoclonal humano, los pocillos de las placas de microtitulación se pueden revestir con 1 µg/ml de anticuerpo dirigido contra inmunoglobulina humana durante la noche a 4 °C. Tras bloquear con BSA al 1 %, las placas se hicieron reaccionar con 1 µg /ml o menos de anticuerpos monoclonales de ensayo o controles de isotipo purificados, a temperatura ambiente durante una o dos horas. A continuación, los pocillos se pueden hacer reaccionar con IgG1

5 humana o bien sondas específicas de IgM humana conjugadas con fosfatasa alcalina. Las placas se revelaron y se analizaron como se ha descrito anteriormente.

Las IgG contra PD-1 humana se pueden analizar adicionalmente para determinar su reactividad con el antígeno PD-1 mediante transferencia Western. En resumen, PD-1 se puede preparar y someterse a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio. Tras la electroforesis, los antígenos separados se transfieren a

10 membranas de nitrocelulosa, se bloquearon con suero de feto de ternera al 10 %, y se sondearon con el anticuerpo monoclonal a analizar. La IgG humana unida se puede detectar usando anticuerpo dirigido contra IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina y revelarse con comprimidos de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.).

15 Composiciones Farmacéuticas

Los inventores describen una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos monoclonales, o una o varias porciones de unión a antígeno de los mismos, formulados

20 (por ejemplo, dos o más diferentes) anticuerpos, o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas) que se unen a diferentes epítopos del antígeno diana o que tienen actividades complementarias.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación también pueden administrarse en terapia de combinación, es

25 *decir*, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo dirigido contra PD-1 combinado con al menos otro agente antiinflamatorio o inmunosupresor. Los ejemplos de agentes terapéuticos que se pueden usar en una terapia de combinación se describen con mayor detalle en el apartado dedicado a los usos de los anticuerpos de la divulgación.

Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los

30 disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardantes de la absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el vehículo es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la ruta de administración, es *decir*,

35 anticuerpo, inmunoconjugado o molécula biespecífica, se puede recubrir con un material para proteger el compuesto de la acción de los ácidos y de otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Los compuestos farmacéuticos de la divulgación pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una

40 "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto precursor y no transmite ningún efecto toxicológico indeseado (véase, por ejemplo, Berge, S.M., et al (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). Ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de bases. Las sales de adición de ácido incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos monocarboxílicos y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos

45 hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, y similares. Las sales de adición de base incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N, N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

Una composición farmacéutica de la divulgación también pueden incluir un antioxidante farmacéuticamente

50 aceptable. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloreuro de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito de sodio, sulfito sódico y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de

55 metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones

60 farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como agentes conservantes, agentes humectantes,

65 agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede

garantizar tanto mediante procedimientos de esterilización, más arriba, como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol-ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma inyectable del fármaco se puede conseguir mediante la inclusión de

5 agentes que retrasen la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones estériles inyectables o dispersiones. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la materia. Excepto en el caso de que cualquier

10 agente o medio convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas de la invención. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.

Normalmente, las composiciones terapéuticas deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y

15 almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para la alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, polioliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido

20 en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. Puede lograrse la absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

25 Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por microfiltración. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del principio activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros

30 ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son el secado al vacío y el secado en frío (liofilización) que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir una solución del mismo previamente esterilizada por filtración.

La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material de vehículo para producir una única forma de

35 dosificación variará dependiendo del sujeto que se esté tratando y del modo particular de administración. La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material transportador para producir una única forma farmacéutica será aquella cantidad de la composición que produzca un efecto terapéutico. Generalmente, de un cien por ciento, esta cantidad estará comprendida en un intervalo de aproximadamente 0,01 por ciento a aproximadamente noventa y nueve por ciento de principio activo, preferentemente desde aproximadamente el 0,1 por ciento a

40 aproximadamente el 70 por ciento, lo más preferentemente de aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente 30 por ciento de principio activo, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los regímenes de tratamientos se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis

45 divididas en el tiempo, o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según dicten las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en una forma farmacéutica unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Una forma farmacéutica unitaria, tal como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de principio

50 activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado junto con el vehículo farmacéutico necesario. La especificación de las formas farmacéuticas unitarias de la invención están determinadas por, y son directamente dependientes de (a) las características únicas del principio activo y el efecto terapéutico particular a conseguir, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la composición de tal principio activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

55 Para la administración del anticuerpo, la dosis está comprendida de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente, de 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del hospedador. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal, o comprendidas en el intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ilustrativo

60 conlleva la administración una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a 6 meses. Los regímenes de dosificación preferidos para un anticuerpo dirigido contra PD-1 de la invención incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal mediante administración intravenosa, utilizando el anticuerpo uno de los siguientes calendarios de dosificación: (i) cada cuatro semanas para seis dosificaciones, a continuación cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido por 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas. En algunos métodos, se administran simultáneamente dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes

especificidades de unión, en cuyo caso, la dosis de cada anticuerpo administrado está comprendida en los intervalos indicados. El anticuerpo se administra normalmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis individuales pueden ser, por ejemplo, semanalmente, mensualmente, cada tres meses, o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares, según indiquen las mediciones de los niveles en sangre del anticuerpo al antígeno diana del paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para conseguir una concentración de anticuerpo en plasma de aproximadamente 1-1000 µg /ml y en algunos métodos aproximadamente 25-300 µg /ml.

Como alternativa, se puede administrar el anticuerpo como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia variarán dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la vida más larga, seguido por los anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, y anticuerpos no humanos. La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un periodo de tiempo prolongado. Algunos pacientes siguen recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, a veces se necesita una dosis relativamente alta en intervalos relativamente cortos hasta que se reduce el progreso de la enfermedad o esta termina, y preferentemente hasta que el paciente muestra una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, el paciente puede recibir un régimen profiláctico.

Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden variar para obtener una cantidad del principio activo que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, la composición y el modo de administración, sin que sean tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de diversos factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones concretas de la presente invención utilizadas, o del éster, la sal o la amida del mismo, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados junto con las composiciones concretas utilizadas, la edad, del sexo, el peso, la afección, estado de salud general e historial médico previo del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Una "dosificación terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo dirigido contra PD-1 de la divulgación da como resultado preferentemente una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los periodos exentos de síntomas, o una prevención de un deterioro o incapacidad debido a la afección por la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de tumores, una "dosificación terapéuticamente eficaz" inhibe preferentemente el crecimiento celular o el crecimiento tumoral en al menos aproximadamente un 20 %, más preferentemente en al menos aproximadamente el 40 %, incluso más preferentemente en al menos aproximadamente un 60 %, y aún más preferentemente en al menos aproximadamente un 80 % con respecto a los sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento tumoral se puede evaluar en un sistema modelo en un animal predictivo de la eficacia en tumores humanos. Como alternativa, esta propiedad de una composición se puede evaluar examinando la capacidad del compuesto para inhibir, dicha inhibición *in vitro* con ensayos conocidos del técnico experto. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto puede disminuir el tamaño de un tumor, o bien mejorar los síntomas en un sujeto. Un experto en la materia sería capaz de determinar dichas cantidades dependiendo de factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto, y la composición o vía de administración seleccionada en particular.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un kit farmacéutico de partes que comprende un anticuerpo dirigido contra PD-1 y un anticuerpo dirigido contra CTLA-4, como se describe en el presente documento. El kit puede comprender además instrucciones para el uso en el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa (tal como el cáncer como se describe en el presente documento). En otra realización, los anticuerpos dirigidos contra PD-1 y contra CTLA-4 se pueden envasar simultáneamente en formas farmacéuticas unitarias.

En ciertas realizaciones, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión (por ejemplo anti-PD-1 y anti-CTLA-4) se administran simultáneamente, en cuyo caso, la dosis de cada anticuerpo administrado está comprendida en los intervalos indicados. El anticuerpo se puede administrar en una única dosis o más habitualmente, se puede administrar en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis individuales pueden ser, por ejemplo, semanales, mensuales, cada tres meses, o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares, según indiquen las mediciones de los niveles en sangre del anticuerpo al antígeno diana del paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para conseguir una concentración de anticuerpo en plasma de aproximadamente 1-1000 µg/ml y, en algunos métodos, de aproximadamente 25-300 µg/ml.

Una composición de la presente invención se puede administrar mediante una o más vías de administración usando uno o más de varios métodos conocidos en la materia. Como apreciarán los expertos en la materia, la vía y/o el modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Las vías de administración preferidas para los anticuerpos de la invención incluyen la intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal, u otras vías de administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección o infusión. La expresión "administración parenteral" como se usa en el presente documento significa modos de administración diferentes de la administración entérica y tópica, habitualmente mediante inyección e incluyen, sin limitación, inyección e infusión

intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

- 5 Como alternativa, un anticuerpo de la invención puede administrarse mediante una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosal, por ejemplo, intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

10 Los principios activos se pueden preparar con vehículos que protejan el principio contra su rápida liberación, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Biodegradable, biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o se conocen generalmente por los expertos en la materia. Véanse, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

15 Las composiciones terapéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, una composición terapéutica de la invención se puede administrar mediante un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tales como los dispositivos divulgados en las patentes de Estados Unidos con números 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención incluyen: la patente de EE.UU. n.º 4.487.603, que divulga una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicamento a una tasa controlada; la patente de EE.UU. n.º 4.486.194, que divulga un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la patente de EE.UU. n.º 4.447.233, que divulga una bomba de infusión de medicamento para suministrar medicamento a una tasa de infusión precisa; la patente de EE.UU. n.º 4.447.224, que divulga un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármaco; la patente de EE.UU. n.º 4.439.196, que divulga un sistema de administración osmótica de fármaco que tiene compartimentos multicámara; y la patente de Estados Unidos n.º 4.475.196, que divulga un sistema de administración osmótica de fármaco. Estas patentes se incorporan al presente documento por referencia. Muchos otros de estos implantes, sistemas de administración y módulos son conocidos por los expertos en la materia.

20 En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención pueden formularse para asegurar una distribución adecuada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BHM) excluye muchos compuestos altamente hidrofílicos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención cruzan la BHM (si se desea), se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más grupos que se transportan de manera selectiva a células u órganos específicos, mejorando de este modo la administración dirigida de fármaco (véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685). Los grupos de direccionamiento ilustrativos incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.416.016 de Low et al.); manósidos (Umezawa et al., (1988) Biochem Biophys. Res. Commun. 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); receptor de proteína A del tensioactivo (Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233: 134); p120 (Schreier et al., (1994) J. Biol. Chem. 269:9090); véanse también K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

45 Usos y métodos de la divulgación

Los anticuerpos y composiciones de anticuerpos para su uso en la presente invención tienen numerosas utilidades *in vitro* e *in vivo* que implican, por ejemplo, potenciación de la respuesta inmunitaria mediante el bloqueo de PD-1. En una realización preferida, los anticuerpos usados en la presente invención son anticuerpos humanos. Por ejemplo, estas moléculas se pueden administrar a células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, por ejemplo, *in vivo*, para potenciar la inmunidad en varias situaciones. En consecuencia, los investigadores describen un método para modificar una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende administrar al sujeto el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la divulgación de tal forma que se modifica la respuesta inmunitaria del sujeto. Preferentemente, la respuesta se potencia, estimula o regula en exceso.

55 Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" pretende incluir seres humanos y animales no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas, caballos, pollos, anfibios, y reptiles, aunque se prefieren mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas y caballos. Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos que necesitan potenciar una respuesta inmunitaria. Los métodos son especialmente adecuados para tratar pacientes humanos que tienen un trastorno que se puede tratar aumentando la respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T. En una realización particular, los métodos son especialmente adecuados para el tratamiento de células cancerosas *in vivo*. Para conseguir la potenciación de la inmunidad específica de antígeno, los anticuerpos dirigidos contra PD-1 se pueden administrar junto con un antígeno de interés. Cuando los anticuerpos de PD-1 se administran junto con otro agente, los dos se pueden administrar en cualquier orden o simultáneamente.

Cáncer

5 El bloqueo de PD-1 por anticuerpos puede potenciar la respuesta inmunitaria a células cancerosas en el paciente. El
 10 ligando de PD-1, PD-L1, no se expresa en células normales humanas, pero es abundante en diversos cánceres
 humanos (Dong *et al.* (2002) *Nat Med* 8:787-9). La interacción entre PD-1 y PD-L1 da como resultado una
 disminución de linfocitos infiltrantes de tumores, una disminución de la proliferación mediada por receptores de
 15 células T y una evasión inmunitaria de las células cancerosas (Dong *et al.* (2003) *J Mol Med* 81:281-7; Blank *et al.*
 (2005) *Cancer Immunol. Immunother.* 54:307-314; Konishi *et al.* (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:5094-100). La
 supresión inmunitaria se puede revertir por inhibición de la interacción local de PD-1 con PD-L1 y el efecto es aditivo
 cuando la interacción de PD-1 con PD-L2 también se bloquea (Iwai *et al.* (2002) *PNAS* 99:12293-7; Brown *et al.*
 (2003) *J. Immunol.* 170:1257-66). Aunque estudios anteriores habían mostrado que la proliferación de linfocitos T se
 puede restaurar mediante la inhibición de la interacción de PD-1 con PD-L1, no hay informes de un efecto directo
 sobre el crecimiento de tumor canceroso in vivo mediante el bloqueo de la interacción PD-1/PD-L1. En un aspecto,
 20 la presente invención se refiere al tratamiento de un sujeto in vivo usando un anticuerpo dirigido contra PD-1 de forma
 que se inhibe el crecimiento de tumores cancerosos. El anticuerpo dirigido contra PD-1 se usa junto con anticuerpos
 dirigidos contra CTLA-4, como se describe más adelante.

20 Los cánceres preferidos cuyo crecimiento puede inhibirse utilizando los anticuerpos de la invención incluyen
 cánceres normalmente sensibles a la inmunoterapia. Los ejemplos no limitantes de cánceres preferidos para
 tratamiento incluyen melanoma (por ejemplo, metastásico melanoma maligno), cáncer renal (por ejemplo, carcinoma
 de células transparentes), cáncer de próstata (por ejemplo, adenocarcinoma de próstata resistente al tratamiento
 hormonal), cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico).
 De manera adicional, la invención incluye neoplasias resistentes al tratamiento o recurrentes cuyo crecimiento puede
 25 inhibirse utilizando los anticuerpos de la invención.

Los ejemplos de otros cánceres que se pueden tratar de acuerdo con la invención incluyen cáncer de huesos,
 30 cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de
 útero, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer de
 útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la
 vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer del
 intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroidea,
 35 cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de la uretra, cáncer del pene, leucemias
 crónicas o agudas, incluyendo leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda,
 leucemia linfocítica crónica, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o
 del uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC,
 angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma hipofisario, sarcoma de Kaposi,
 40 cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de linfocitos T, cánceres inducidos ambientalmente
 incluyendo aquellos inducidos por amianto, y combinaciones de dichos cánceres. La presente combinación también
 es útil para el tratamiento de cánceres metastásicos, especialmente cánceres metastásicos que expresan PD-L1
 (Iwai y otros (2005) *Int. Immunol.* 17:133-144).

Opcionalmente, los anticuerpos contra PD-1 se pueden combinar con un agente inmunógeno, tales como células
 45 cancerosas, antígenos tumorales purificados (incluyendo proteínas recombinantes, péptidos y moléculas de
 carbohidratos), células y células transfectadas con genes que codifican citocinas inmunoestimulantes (He *et al.*
 (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Los ejemplos no limitativos de vacunas tumorales que se pueden usar incluyen
 péptidos de antígenos de melanoma, tales como péptidos de gp100, antígenos MAGE, Trp-2, MART1 y/o tirosinasa,
 o células tumorales transfectadas para expresar la citoquina GM-CSF (analizada más detalladamente a
 50 continuación).

En los seres humanos, se ha demostrado que algunos tumores son inmunogénicos tales como melanomas. Se
 anticipa que al elevar el umbral de la activación de los linfocitos T por el bloqueo de PD-1, los inventores pueden
 esperar activar respuestas tumorales en el hospedador.

55 Es probable que el bloqueo de PD-1 sea más eficaz cuando se combina con un protocolo de vacunación. Se han
 ideado muchas estrategias experimentales para la vacunación contra tumores (véase Rosenberg, S., 2000,
Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, *ASCO Educational*
Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 414-428; Foon, K. 2000, *ASCO Educational*
Book Spring: 730-738; véase también Restifo, N. y Sznol, M., *Cancer Vaccines*, cap. 61, págs. 3023-3043 en DeVita,
 60 V. *et al.* (eds.), 1997, *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Quinta Edición). En una de estas estrategias, se
 prepara una vacuna utilizando células tumorales autólogas o alogénicas. Se ha mostrado que estas vacunas
 celulares son más eficaces cuando las células tumorales se transducen para expresar GM-CSF. Se ha mostrado que
 el GM-CSF es un potente activador de la presentación de antígenos para la vacunación de tumores (Dranoff *et al.*
 (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 3539-43).

65 El estudio de la expresión génica y los patrones de expresión génica a gran escala en diversos tumores ha

conducido a la definición de los denominados antígenos específicos de tumores (Rosenberg, SA (1999) *Immunity* 10: 281-7). En muchos casos, estos antígenos específicos de tumor son antígenos de diferenciación expresados en los tumores y en la célula de la que se originó el tumor, por ejemplo, antígenos de melanocitos gp100, antígenos MAGE y Trp-2. De forma más importante, se puede demostrar que muchos de estos antígenos son las dianas de linfocitos T específicos de tumor encontrados en el hospedador. El bloqueo de PD-1 se puede usar junto con una colección de proteínas recombinantes y/o péptidos expresados en un tumor para generar una respuesta inmunitaria a estas proteínas. El sistema inmunitario suele ver estas proteínas como autoantígenos y, por tanto, son tolerantes a los mismos. El antígeno tumoral también puede incluir la proteína telomerasa, que se requiere para la síntesis de telómeros de cromosomas y que se expresa en más del 85 % de los cánceres humanos y solo en un número limitado de tejidos somáticos (Kim, N et al. 1994) *Science* 266: 2011-2013). (Estos tejidos somáticos pueden protegerse del ataque inmunitario por diversos medios). El antígeno tumoral también puede ser "neoantígenos" expresados en células cancerosas debido a mutaciones somáticas que alteran la secuencia proteica o crean proteínas de fusión entre dos secuencias no relacionadas (es decir, bcr-abl en el cromosoma Filadelfia), o idiotipo de tumores de linfocitos B.

Otras vacunas de tumores pueden incluir las proteínas de virus implicados en cánceres humanos tales como virus del papiloma humano (VPH), virus de la hepatitis (VHB y VHC) y virus del herpes sarcoma de Kaposi (VHSK). Otra forma de antígeno específico del tumor que se puede usar junto con el bloqueo de PD-1 son las proteínas de choque térmico purificadas (HSP) aisladas del propio tejido tumoral. Estas proteínas de choque térmico contienen fragmentos de proteínas de las células tumorales y estas HSP son muy eficaces en su administración a las células presentadoras de antígenos para estimular la inmunidad tumoral (Suot, R y Srivastava, P (1995) *Science* 269:1585-1588, Tamura, Y. et al. (1997) *Science* 278:117-120).

Las células dendríticas (DC) son potentes células presentadoras de antígenos que se pueden usar para cebar respuestas específicas de antígeno. Las DC pueden producirse *ex vivo* y cargarse con diversos antígenos de proteínas y péptidos, así como con extractos de células tumorales (Nestle, F. et al. (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332). Las DC también se pueden transducir por medios genéticos para expresar también estos antígenos tumorales. Las DC también se han fusionado directamente con células tumorales con fines de inmunización (Kugler, A. et al. (2000) *Nature Medicine* 6:332-336). Como método de vacunación, la inmunización con DC se puede combinar eficazmente con el bloqueo de PD-1 para activar respuestas antitumorales más potentes.

El bloqueo de PD-1 también puede combinarse con tratamientos estándar contra el cáncer. El bloqueo de PD-1 puede combinarse eficazmente con regímenes quimioterapéuticos. En estos casos, puede ser posible reducir la dosis de reactivo quimioterapéutico administrado (Mokyr, M. et al. (1998) *Cancer Research* 58: 5301 -5304). Un ejemplo de dicha combinación es un anticuerpo dirigido contra PD-1 junto con dacarbazina para el tratamiento del melanoma. Otro ejemplo de dicha combinación es un anticuerpo dirigido contra PD-1 junto con interleuquina-2 (IL-2) para el tratamiento del melanoma. La razón científica que respalda el uso combinado del bloqueo de PD-1 y la quimioterapia es que la muerte celular, que es una consecuencia de la acción citotóxica de la mayoría de los compuestos quimioterapéuticos, debería dar lugar a niveles aumentados de antígeno tumoral en la ruta de presentación del antígeno. Otras terapias combinadas que pueden dar como resultado la sinergia con el bloqueo de PD-1 a través de la muerte celular son radiación, cirugía y privación de hormonas. Cada uno de estos protocolos crea una fuente de antígeno tumoral en el hospedador. Los inhibidores de la angiogénesis también se pueden combinar con el bloqueo de PD-1. La inhibición de la angiogénesis conduce a la muerte de células tumorales que pueden alimentar el antígeno tumoral a las rutas de presentación del antígeno del hospedador.

Los anticuerpos que bloquean PD-1 también se pueden usar junto con anticuerpos biespecíficos que se dirigen a células efectoras que expresan el receptor Fc alfa o Fc gamma hacia las células tumorales (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 5.922.845 y 5.837.243). Se pueden usar anticuerpos biespecíficos para dirigirse a dos antígenos independientes. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos del antígeno anti-receptor Fc/antígeno antitumoral (por ejemplo, Her-2/neu) se han utilizado para dirigir macrófagos a sitios de tumor. Este direccionamiento puede activar más eficazmente las respuestas específicas de tumores. El brazo de linfocitos T de estas respuestas estaría aumentado por el uso del bloqueo de PD-1. Como alternativa, el antígeno se puede administrar directamente a las DC mediante el uso de anticuerpos biespecíficos que se unan al antígeno tumoral y a una célula dendrítica específica de un marcador de la superficie de una célula.

Los tumores evitan la vigilancia inmunitaria del hospedador mediante una gran diversidad de mecanismos. Muchos de estos mecanismos se pueden superar por la inactivación de proteínas que se expresan en los tumores y que son inmunosupresoras. Estas incluyen entre otras TGF-beta (Kehrl, J. et al. (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard, M. & O'Garra, A. (1992) *Immunology Today* 13: 198-200), y ligando Fas (Hahne, M. et al. (1996) *Science* 274: 1363-1365). Los anticuerpos contra cada una de estas entidades se pueden usar junto con un anticuerpo dirigido contra PD-1 para contrarrestar los efectos del agente inmunosupresor y favorecer las respuestas inmunitarias tumorales del hospedador.

Otros anticuerpos que se pueden usar para activar la capacidad de respuesta inmunitaria del hospedador pueden usarse junto con anti-PD-1. Estos incluyen moléculas en la superficie de las células dendríticas que activan la función DC y la presentación del antígeno. Los anticuerpos dirigidos contra CD40 pueden sustituir eficazmente la

actividad de los linfocitos T auxiliares (Ridge, J. et al. (1998) Nature 393: 474-478) y se pueden utilizar junto con el bloqueo de PD-1. (Ito, N. et al. (2000) Immunobiology 201 (5) 527-40). La activación de anticuerpos contra las moléculas coestimuladoras de linfocitos T tales como CTLA-4 (por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 5,811.097), OX-40 (Weinberg, A. et al. (2000) Immunol 164: 2160-2169), 4-1BB (Melero, I. et al. (1997) Nature Medicine 3: 682-685 (1997), e ICOS (Hutloff, A. et al. (1999) Nature 397: 262-266) también se pueden usar para proporcionar niveles aumentados de activación de linfocitos T.

El trasplante de médula ósea se utiliza actualmente para tratar diversos tumores de origen hematopoyético. Aunque la enfermedad del injerto contra hospedador es una consecuencia de este tratamiento, el beneficio terapéutico puede obtenerse a partir de respuestas del injerto frente a tumor. El bloqueo de PD-1 se puede usar para aumentar la eficacia de los linfocitos T específicos en tumores injertados de donantes.

También existen varios protocolos de tratamiento experimentales que implican la activación y expansión *ex vivo* de linfocitos T específicos de antígeno y la transferencia adoptiva de estas células a receptores para estimular los linfocitos T específicos de antígenos frente al tumor (Greenberg y Riddell, S. (1999) Science 285: 546-51). Estos métodos se pueden usar también para activar respuestas de los linfocitos T a agentes infecciosos tales como CMV. Puede esperarse que la activación *ex vivo* en presencia de anticuerpos dirigidos contra PD-1 pueda aumentar la frecuencia y la actividad de los linfocitos T transferidos adoptivamente.

20 Terapia de combinación

La presente invención está basada, en parte, en los siguientes datos experimentales. Se usaron modelos de tumor en ratones (cáncer de colon MC38 y fibrosarcoma SA1/N) para examinar el efecto del tratamiento *in vivo* de un tumor mediante la combinación de anticuerpos terapéuticos estimuladores -anti-CTLA-4 y anti-PD-1. La combinación inmunoterapéutica se proporcionó bien simultáneamente con el implante de las células tumorales (Ejemplos 14 y 17) o una vez que las células tumorales se implantaron durante un tiempo suficiente para ser un tumor establecido (Ejemplos 15, 16 y 18). Independientemente del calendario del tratamiento con anticuerpos, se descubrió que el tratamiento con el anticuerpo dirigido contra CTLA-4, en solitario y el tratamiento con el anticuerpo dirigido contra PD-1 (el anticuerpo quimérico dirigido contra PD-1 de rata se modificó con una región Fc de inmunoglobulina de ratón, véase el Ejemplo 1) en solitario tuvo un efecto modesto sobre la reducción del crecimiento tumoral en el modelo de tumor MC38 (véanse, por ejemplo, las Figuras 21, 24 y 27). El anticuerpo dirigido contra CTLA-4 solo fue bastante eficaz en el modelo del tumor SA1/N (véase la Figura 30D), que necesitaba una dosis menor del anticuerpo dirigido contra CTLA-4 para los estudios de combinación en este modelo. Sin embargo, el tratamiento combinado del anticuerpo dirigido contra CTLA-4 y anticuerpo dirigido contra PD-1 mostró un efecto inesperado significativamente mayor sobre la reducción del crecimiento del tumor en comparación con el tratamiento con cualquiera de los anticuerpos en solitario (véanse, por ejemplo, las Figuras 21D, 24D, 30F y 33H-J). Además, los resultados de los Ejemplos 14, 16 y 18 muestran que el tratamiento combinado del anticuerpo dirigido contra CTLA-4 y anticuerpo dirigido contra PD-1 tuvo un efecto significativo (sinérgico) sobre el crecimiento tumoral incluso en dosis terapéuticas subóptimas, en comparación con el tratamiento con cualquiera de los anticuerpos en solitario (es decir, el tratamiento combinado fue sorprendentemente más eficaz a dosis subterapéuticas que cualquiera de las monoterapias). Sin pretender imponer ninguna teoría, es posible que al aumentar el umbral de activación de linfocitos T mediante el bloqueo de PD-1 y CTLA-4, se puedan activar las respuestas antitumorales en el hospedador.

Los inventores describen un anticuerpo de PD-1 y un anticuerpo de CTLA-4 para su uso en el tratamiento del cáncer de un sujeto. En aspectos adicionales, el anticuerpo dirigido contra PD-1 se administra a una dosis subterapéutica, el anticuerpo dirigido contra CTLA-4 se administra a una dosis subterapéutica, o ambos se administran a una dosis subterapéutica. Los inventores también describen un método para alterar un evento adverso asociado con el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa con un agente inmunoestimulador, que comprende administrar un anticuerpo dirigido contra PD-1 y una dosis subterapéutica de anticuerpo dirigido contra CTLA-4 a un sujeto. En ciertas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En ciertas realizaciones, el anticuerpo dirigido contra CTLA-4 la secuencia humana del anticuerpo monoclonal 10D1. El anticuerpo dirigido contra PD-1 es la secuencia humana del anticuerpo monoclonal, 5C4 o un fragmento del mismo.

El anticuerpo dirigido contra CTLA-4 y los anticuerpos monoclonales dirigidos contra PD-1 (mAbs) se pueden producir mediante diferentes técnicas, incluida metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la técnica de hibridación de células somáticas convencional de Kohler y Milstein (1975) Nature 256:495. Se pueden emplear cualquier técnica para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la transformación vírica o mediante oncogenes de linfocitos B. Un sistema animal para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Los protocolos de inmunización y las técnicas de aislamiento de los esplenocitos inmunizados para su fusión son conocidos en la técnica. Los ligandos de fusión (por ejemplo, células de mieloma de murino) y los procedimientos de fusión son también conocidos (véanse, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Nueva York).

Los anticuerpos anti-CTLA-4 de la presente invención se pueden unir a un epítipo del CTLA-4 humano de forma que

inhiba la interacción de CTLA-4 con el contrarreceptor B7 humano. Puesto que la interacción entre CTLA-4 humano con B7 humano transduce una señal que lleva a la inactivación de los linfocitos T que tienen el receptor de CTLA-4 humano, el antagonismo de la interacción eficazmente induce, aumenta o prolonga la activación de los linfocitos T que tienen el receptor de CTLA-4 humano, prolongando o aumentando de esta forma una respuesta inmunitaria. Los anticuerpos dirigidos contra CTLA-4 se describen en las patentes de EE.UU. números 5.811.097; 5.855.887; 6.051.227; en las publicaciones de solicitud PCT números WO 01/14424 y WO 00/37504; y en la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2002/0039581. Cada una de estas referencias se ha incorporado específicamente al presente documento por referencia con el fin de describir los anticuerpos anti-CTLA-4. Un anticuerpo dirigido contra CTLA-4 clínico ilustrativo es el anticuerpo monoclonal humano 10D1 que se divulga en el documento WO 01/14424 y en la solicitud estadounidense con n.º 09/644.668. El anticuerpo 10D1 se ha administrado en dosis simples y múltiples, en solitario o combinado con una vacuna, quimioterapia, o con interleuquina-2 a más de 500 pacientes con diagnóstico de melanoma metastásico, cáncer de próstata, linfoma, cáncer de células renales, cáncer de mama, cáncer de ovario, y VIH. Otros anticuerpos dirigidos contra CTLA-4 abarcados por los métodos de la presente invención incluyen, por ejemplo, los divulgados en: documento WO 98/42752; documento WO 00/37504; patente de Estados Unidos n.º 6.207.156; Hurwitz et al. (1998) Proc. Natl Acad Sci. USA 95(17): 10067-10071; Camacho et al. (2004) J. Clin. Oncology 22(145): Resumen n.º 2505 (anticuerpo CP-675206); y Mokyr et al. (1998) Cancer Res. 58:5301-5304. En ciertas realizaciones, los métodos de la presente invención comprenden el uso de un anticuerpo dirigido contra CTLA-4 que es un anticuerpo de secuencia humana, preferentemente un anticuerpo monoclonal y, en otra realización, es el anticuerpo monoclonal 10D1.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo dirigido contra CTLA-4 se une a CTLA-4 humano con una K_D de 5×10^{-8} M o menos, se une a CTLA-4 humana con una K_D de 1×10^{-8} M o menos, se une a la CTLA-4 humana con una K_D de 5×10^{-9} M o menos, o se une a la CTLA-4 humana con una K_D de entre 1×10^{-8} M y 1×10^{-10} M o menos.

La combinación de anticuerpos es útil para potenciar una respuesta inmunitaria contra una enfermedad hiperproliferativa mediante el bloqueo de PD-1 y CTLA-4. En una realización preferida, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos humanos. Por ejemplo, estas moléculas se pueden administrar a células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, por ejemplo, *in vivo*, para potenciar la inmunidad en varias situaciones. En consecuencia, los investigadores describen un método para modificar una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende administrar al sujeto una combinación de anticuerpos, o una combinación de porciones de unión al antígeno de los mismos; de la invención de tal forma que se modifica la respuesta inmunitaria del sujeto. Preferentemente, la respuesta se potencia, estimula o regula en exceso. En otro aspecto, los inventores describen un método para alterar eventos adversos asociados con el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa con un agente terapéutico inmunostimulador, que comprende administrar un anticuerpo dirigido contra PD-1 y una dosis subterapéutica de anticuerpo dirigido contra CTLA-4 a un sujeto.

El bloqueo de PD-1 y CTLA-4 con anticuerpos puede potenciar la respuesta inmunitaria a células cancerosas del paciente. Los cánceres cuyo crecimiento puede inhibirse utilizando los anticuerpos de la presente divulgación incluyen cánceres normalmente sensibles a la inmunoterapia. Los ejemplos representativos de cánceres para su tratamiento con el tratamiento combinado de la presente divulgación incluyen melanoma (por ejemplo, melanoma metastásico maligno), cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de pulmón. Los ejemplos de otros cánceres que se pueden tratar usando los métodos de la presente divulgación incluyen cáncer de huesos, cáncer pancreático, cáncer cutáneo, cáncer de cabeza y cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma de cuello de útero, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgking, linfoma no de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de la uretra, cáncer del pene, leucemias agudas o crónicas incluidas la leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de la vejiga, cáncer de riñón o uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasia del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor de la espina dorsal, glioma del tronco encefálico, adenoma de la pituitaria, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosa, linfoma de linfocitos T, cánceres inducidos por el medio ambiente que incluyen los inducidos por asbestos, y combinaciones de dichos cánceres. La presente invención también es de utilidad para el tratamiento de cánceres metastásicos.

En ciertas realizaciones, la combinación de anticuerpos terapéuticos analizada en el presente documento se puede administrar simultáneamente como composición independiente en un vehículo farmacéuticamente aceptable, o simultáneamente como composiciones independientes donde cada anticuerpo está en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la combinación de anticuerpos terapéuticos puede administrarse secuencialmente. Por ejemplo, se puede administrar secuencialmente un anticuerpo dirigido contra CTLA-4 y/o un anticuerpo dirigido contra PD-1, tales como un anti-CTLA-4 que se administra primer y un anti-PD-1 después, o se administra primero un anti-PD-1 y un anti-CTLA-4 después. Asimismo, si se administra secuencialmente más de una dosis del tratamiento combinado, puede invertirse el orden de la administración secuencial o mantenerse en el mismo orden en cada punto temporal de administración, las administraciones secuenciales se pueden combinar con administraciones simultáneas, o cualquier combinación de las mismas. Por ejemplo, la primera administración de

una combinación de un anticuerpo dirigido contra CTLA-4 y un anticuerpo dirigido contra PD-1 puede ser simultánea, la segunda administración puede ser secuencial con anti-CTLA-4 primero y anti-PD-1 después, y la tercera administración puede ser secuencial con anti-PD-1 primero y anti-CTLA-4 después, etc. Otro esquema de dosificación representativo puede implicar una primera administración que es secuencial con un anti-PD-1 primero y anti-CTLA-4 después, y las posteriores administraciones pueden ser simultáneas.

Opcionalmente, la combinación de anticuerpos anti-PD-1 y anti-CTLA-4 se puede combinar además con un agente inmunógeno, tales como células cancerosas, antígenos tumorales purificados (incluyendo proteínas recombinantes, péptidos y moléculas de carbohidratos), células y células transfectadas con genes que codifican citoquinas inmunoestimuladoras (He et al (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Los ejemplos no limitativos de vacunas tumorales que se pueden usar incluyen péptidos de antígenos de melanoma, tales como péptidos de gp100, antígenos MAGE, Trp-2, MART1 y/o tirosinasa, o células tumorales transfectadas para expresar la citoquina GM-CSF (analizada más detalladamente a continuación).

Una combinación del bloqueo de PD-1 y CTLA-4 se puede combinar además con un protocolo de vacunación. Se han ideado muchas estrategias experimentales para la vacunación contra tumores (véase Rosenberg, S. (2000) *Development of Cancer Vaccines*, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. (2000) ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. (2000) ASCO Educational Book Spring: 730-738; véase también Restifo y Sznol, *Cancer Vaccines*, cap. 61, págs. 3023-3043 en DeVita et al. (eds.), 1997, *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Quinta Edición). En una de estas estrategias, se prepara una vacuna utilizando células tumorales autólogas o alogénicas. Se ha mostrado que estas vacunas celulares son más eficaces cuando las células tumorales se transducen para expresar GM-CSF. Se ha mostrado que el GM-CSF es un potente activador de la presentación de antígenos para la vacunación de tumores (Dranoff et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 3539-43).

El estudio de la expresión génica y los patrones de expresión génica a gran escala en diversos tumores ha conducido a la definición de los denominados antígenos específicos de tumores (Rosenberg (1999) *Immunity* 10: 281-7). En muchos casos, estos antígenos específicos de tumor son antígenos de diferenciación expresados en los tumores y en la célula de la que se originó el tumor, por ejemplo, antígenos de melanocitos gp100, antígenos MAGE y Trp-2. De forma más importante, se puede demostrar que muchos de estos antígenos son las dianas de linfocitos T específicos de tumor encontrados en el hospedador. En ciertas realizaciones, una combinación del bloqueo de PD-1 y CTLA-4 usando las composiciones de anticuerpos descritas en el presente documento se puede usar junto con una colección de proteínas y/o péptidos recombinantes expresados en un tumor para generar una respuesta inmunitaria a dichas proteínas. El sistema inmunitario suele ver estas proteínas como autoantígenos y, por tanto, son tolerantes a los mismos. El antígeno tumoral también puede incluir la proteína telomerasa, que se requiere para la síntesis de telómeros de cromosomas y que se expresa en más del 85 % de los cánceres humanos y solo en un número limitado de tejidos somáticos (Kim et al. 1994) *Science* 266: 2011-2013). (Estos tejidos somáticos pueden protegerse del ataque inmunitario por diversos medios). El antígeno tumoral también puede ser "neoantígenos" expresados en células cancerosas debido a mutaciones somáticas que alteran la secuencia proteica o crean proteínas de fusión entre dos secuencias no relacionadas (es decir, bcr-abl en el cromosoma Filadelfia), o idiotipo de tumores de linfocitos B.

Otras vacunas de tumores pueden incluir las proteínas de virus implicados en cánceres humanos tales como virus del papiloma humano (VPH), virus de la hepatitis (VHB y VHC) y virus del herpes sarcoma de Kaposi (KHSV). Otra forma de antígeno específico del tumor que se puede usar junto con el bloqueo de PD-1 son las proteínas de choque térmico purificadas (HSP) aisladas del propio tejido tumoral. Estas proteínas de choque térmico contienen fragmentos de proteínas de las células tumorales y estas HSP son muy eficaces en su administración a las células presentadoras de antígenos para estimular la inmunidad tumoral (Suot & Srivastava (1995) *Science* 269:1585-1588; Tamura et al (1997) *Science* 278:117-120).

Las células dendríticas (DC) son potentes células presentadoras de antígenos que se pueden usar para cebar respuestas específicas de antígeno. Las DC pueden producirse *ex vivo* y cargarse con diversos antígenos de proteínas y péptidos, así como con extractos de células tumorales (Nestle et al. (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332). Las DC también se pueden transducir por medios genéticos para expresar también estos antígenos tumorales. Las DC también se han fusionado directamente con células tumorales con fines de inmunización (Kugler et al. (2000) *Nature Medicine* 6:332-336). Como método de vacunación, La inmunización con DC se puede además combinar de forma eficaz con una combinación del bloqueo de PD-1 y CTLA-4 para activar respuestas antitumorales más potentes.

Una combinación del bloqueo de PD-1 y CTLA-4 puede además combinarse también con los tratamientos del cáncer convencionales. Por ejemplo, una combinación del bloqueo de PD-1 y CTLA-4 se puede combinar eficazmente con regímenes quimioterapéuticos. En estos casos, como se observa con la combinación de anticuerpos dirigidos contra PD-1 y contra CTLA-4, puede ser posible reducir la dosis de otros reactivos quimioterapéuticos administrados con la combinación de la presente divulgación (Mokyr et al (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Un ejemplo de dicha combinación es una combinación de anticuerpos anti-PD-1 y anti-CTLA-4 adicionalmente en combinación con dacarbazina para el tratamiento del melanoma. Otro ejemplo es una combinación de anticuerpos anti-PD-1 y anti-

CTLA-4 adicionalmente en combinación con interleuquina-2 (IL-2) para el tratamiento del melanoma. La razón científica que respalda el uso combinado del bloqueo de PD-1 y CTLA-4 con la quimioterapia es que la muerte celular, que es una consecuencia de la acción citotóxica de la mayoría de los compuestos quimioterapéuticos, debería dar lugar a niveles aumentados de antígeno tumoral en la ruta de presentación del antígeno. Otras terapias combinadas que pueden dar como resultado una sinergia con el bloqueo combinado de PD-1 y CTLA-4 a través de la muerte celular incluyen radiación, cirugía, o privación de hormonas. Cada uno de estos protocolos crea una fuente de antígeno tumoral en el hospedador. Los inhibidores de la angiogénesis también se pueden combinar con una combinación del bloqueo de PD-1 y CTLA-4. La inhibición de la angiogénesis conduce a la muerte de las células tumorales, que también puede ser una fuente de antígenos tumorales a alimentar a las rutas de presentación de antígenos del hospedador.

Una combinación de anticuerpos para bloqueo de PD-1 y CTLA-4 también se puede usar junto con anticuerpos biespecíficos que se dirigen a células efectoras que expresan receptores Fc α o Fc γ contra células tumorales (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos con números, 5.922.845 y 5.837.243). Se pueden usar anticuerpos biespecíficos para dirigirse a dos antígenos independientes. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos del antígeno anti-receptor Fc/antígeno antitumoral (por ejemplo, Her-2/neu) se han utilizado para dirigir macrófagos a sitios de tumor. Este direccionamiento puede activar más eficazmente las respuestas específicas de tumores. El brazo de linfocitos T de estas respuestas estaría aumentado por el uso de la combinación del bloqueo de PD-1 y CTLA-4. Como alternativa, el antígeno se puede administrar directamente a las DC mediante el uso de anticuerpos biespecíficos que se unan al antígeno tumoral y a una célula dendrítica específica de un marcador de la superficie de una célula.

En otro ejemplo, se pueden usar una combinación de anticuerpos anti-PD-1 y anti-CTLA-4 junto con anticuerpos antineoplásicos, tales como Rituxan® (rituximab), Herceptin® (trastuzumab), Bexxar® (tositumomab), Zevalin® (ibritumomab), Campath® (alemtuzumab), Lymphocide® (epruzumab), Avastin® (bevacizumab), y Tarceva® (erlotinib), y similares. A modo de ejemplo y sin desear quedar ligados a teoría alguna, el tratamiento con un anticuerpo contra el cáncer o un anticuerpo contra el cáncer conjugado con una toxina puede producir la muerte de células cancerosas (por ejemplo, de células tumorales) que potenciarían una respuesta inmunitaria mediada por CTLA-4 o PD-1. En una realización ilustrativa, un tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa (por ejemplo, un tumor canceroso) puede incluir un anticuerpo contra el cáncer junto con anticuerpos anti-PD-1 y anti-CTLA-4, simultánea o simultáneamente o en cualquier combinación de los mismos, lo que puede potenciar una respuesta inmunitaria antitumoral en el hospedador.

Los tumores evitan la vigilancia inmunitaria del hospedador mediante una gran diversidad de mecanismos. Muchos de estos mecanismos pueden superarse por la inactivación de las proteínas, que expresan los tumores y que son inmunosupresoras. Estas incluyen, entre otras, TGF- β (Kehrl, J. et al. (1986) J. Exp. Med. 163: 1037-1050), IL-10 (Howard, M. & O'Garra, A. (1992) Immunology Today 13: 198-200), y ligando Fas ligand (Hahne, M. et al. (1996) Science 274: 1363-1365). En otro ejemplo, los anticuerpos contra cada una de estas entidades se pueden combinar adicionalmente con una combinación contra PD-1 y contra CTLA-4 para contrarrestar los efectos de los agentes inmunosupresores y favorecer las respuestas inmunitarias antitumorales del hospedador.

Otros anticuerpos que se pueden usar para activar la capacidad de respuesta inmunitaria del hospedador se pueden usar además con una combinación de anti-PD-1 y anti-CTLA-4. Estos incluyen moléculas en la superficie de las células dendríticas que activan la función DC y la presentación del antígeno. Los anticuerpos dirigidos contra CD40 pueden sustituir eficazmente la actividad de los linfocitos T auxiliares (Ridge, J. et al. (1998) Nature 393: 474-478) y se pueden utilizar junto con combinación de anti-PD-1 y anti-CTLA-4 (Ito, N. et al. (2000) Immunobiology 201 (5) 527-40). La activación de anticuerpos contra las moléculas coestimuladoras de linfocitos T., tales como OX-40 (Weinberg, A. et al. (2000) Immunol 164: 2160-2169), 4-1BB (Melero, I. et al. (1997) Nature Medicine 3: 682-685 (1997) e ICOS (Hutloff, A. et al. (1999) Nature 397: 262-266) también pueden proporcionar niveles aumentados de activación de linfocitos T.

El trasplante de médula ósea se utiliza actualmente para tratar diversos tumores de origen hematopoyético. Aunque la enfermedad del injerto contra hospedador es una consecuencia de este tratamiento, el beneficio terapéutico puede obtenerse a partir de respuestas del injerto frente a tumor. Se puede usar una combinación del bloqueo de PD-1 y CTLA-4 para aumentar la eficacia de los linfocitos T específicos en tumores injertados de donantes.

También existen varios protocolos de tratamiento experimentales que implican la activación y expansión *ex vivo* de linfocitos T específicos de antígeno y la transferencia adoptiva de estas células a receptores para estimular los linfocitos T específicos de antígenos frente al tumor (Greenberg y Riddell, S. (1999) Science 285: 546-51). Estos métodos se pueden usar también para activar respuestas de los linfocitos T a agentes infecciosos tales como CMV. Puede esperarse que la activación *ex vivo* en presencia de anticuerpos dirigidos contra PD-1 y contra CTLA-4 pueda aumentar la frecuencia y la actividad de los linfocitos T transferidos adoptivamente.

Como se define en el presente documento, los órganos pueden experimentar eventos adversos relacionados con el sistema inmunitario después de un tratamiento con anticuerpos terapéuticos inmunostimuladores, tales como el tracto GI (diarrea y colitis) y la piel (erupciones y prurito) después del tratamiento con anticuerpo dirigido contra

CTLA-4. Por ejemplo, también se han observado efectos adversos relacionados con el sistema inmunitario gastrointestinal no colónicos en el esófago (esofagitis), duodeno (duodenitis), e íleon (ileitis) después del tratamiento con anticuerpo dirigido contra CTLA-4.

- 5 Los inventores también describen un método para alterar un evento adverso asociado con el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa con un agente inmunoestimulador, que comprende administrar un anticuerpo dirigido contra PD-1 y una dosis subterapéutica de anticuerpo dirigido contra CTLA-4 a un sujeto. Por ejemplo, los métodos de la presente divulgación proporcionan un método para reducir la incidencia de colitis o diarrea inducida por anticuerpos terapéuticos inmunoestimuladores mediante la administración al paciente de un esteroide no absorbible.
- 10 Debido a que cualquier paciente que reciba un anticuerpo terapéutico inmunoestimulador está en riesgo de desarrollar colitis o diarrea inducida por dicho anticuerpo, esta población completa de pacientes es adecuada para el tratamiento de acuerdo con los métodos de la presente invención. Aunque se han administrado esteroides para tratar la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) y evitar exacerbaciones de la IBD, no se han utilizado para prevenir (disminuir la incidencia) de la IBD en pacientes a los que no se les ha diagnosticado IBD. Los efectos secundarios significativos asociados con los esteroides, incluso con los esteroides no absorbibles, han desaconsejado el uso profiláctico.

En ejemplos adicionales, un bloqueo combinado de PD-1 y CTLA-4 (es decir, anticuerpos terapéuticos inmunoestimuladores anti-PD-1 y anti-CTLA-4) se puede combinar adicionalmente con el uso de cualquier esteroide no absorbible. Como se utiliza en el presente documento, un "esteroide no absorbible" es un glucocorticoide que presenta un amplio metabolismo de primer paso de tal forma que, después del metabolismo hepático, la biodisponibilidad del esteroide es baja, *es decir*, menos de aproximadamente un 20 %. En una realización de la invención, el esteroide no absorbible es budesonida. La budesonida es un glucocorticoesteroide que actúa localmente, que se metaboliza extensamente, principalmente por el hígado, tras la administración oral. ENTOCORT EC® (Astra-Zeneca) es una formulación oral dependiente del pH y del tiempo de budesonida desarrollada para optimizar la administración del fármaco en el íleon y a lo largo del colon. ENTOCORT EC® está autorizado en Estados Unidos para el tratamiento de la enfermedad de Crohn de leve a moderada que implica el íleon y/o el colon ascendente. La dosificación oral usual de ENTOCORT EC® para el tratamiento de la enfermedad de Crohn es de 6 a 9 mg/día. ENTOCORT EC® se libera en los intestinos antes de absorberse y retenerse en la mucosa del intestino.

20 Una vez que pasa a través del tejido diana de la mucosa del intestino, ENTOCORT EC® se metaboliza extensamente por el sistema del citocromo P450 en el hígado a metabolitos con actividad glucocorticoide despreciable. Por tanto, la biodisponibilidad es baja (aproximadamente un 10 %). La baja disponibilidad de budesonida da como resultado una relación terapéutica mejorada en comparación con otros glucocorticoides con menor extensión del metabolismo de primer paso. La budesonida da como resultado pocos efectos secundarios, incluyendo menos supresión hipotalámica-pituitaria, que los corticoesteroides que actúan sistémicamente. Sin embargo, la administración crónica de ENTOCORT EC® puede dar como resultado efectos glucocorticoides sistémicos tales como hipercorticismismo y supresión adrenal. Véase PDR 58° ed. 2004; 608-610.

En otras realizaciones adicionales, una combinación del bloqueo de PD-1 y CTLA-4 (anticuerpos terapéuticos inmunoestimuladores contra PD-1 y CTLA-4) junto con un esteroide no absorbible se puede combinar además con un salicilato. Los salicilatos incluyen agentes 5-ASA tales como, por ejemplo: sulfasalazina (AZULFIDINE®, Pharmacia & Upjohn); olsalazina (DIPENTUM®, Pharmacia & Upjohn); balsalazida (COLAZAL®, Salix Pharmaceuticals, Inc.); y mesalamina (ASACOL®, Procter & Gamble Pharmaceuticals; PENTASA®, Shire US; CANASA®, Axcan Scandipharm, Inc.; ROWASA®, Solvay).

De acuerdo con la presente invención, un salicilato administrado junto con anticuerpos anti-PD-1 y anti-CTLA-4 y un esteroide no absorbible puede incluir cualquier administración solapante o secuencial del salicilato y del esteroide no absorbible para disminuir la incidencia de la colitis inducida por los anticuerpos inmunoestimuladores. Por tanto, por ejemplo, los métodos para reducir la incidencia de colitis inducida por los anticuerpos inmunoestimuladores abarcan administrar un salicilato y un no absorbible simultánea o secuencialmente (por ejemplo, un salicilato se administra 6 horas después de un esteroide no absorbible), o cualquier combinación de los mismos. Además, un salicilato y un esteroide no absorbible se pueden administrar por la misma vía (por ejemplo, ambos se administran por vía oral) o por diferentes vías (por ejemplo, un salicilato se administra por vía oral y un esteroide no absorbible se administró por vía rectal), que pueden ser diferentes de la una o más vías usadas para administrar los anticuerpos anti-PD-1 y anti-CTLA-4.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos monoclonales humanos contra PD-1

Antígeno

Los protocolos de inmunización utilizaron como antígeno tanto (i) una proteínas de fusión recombinante que comprende la porción extracelular de PD-1 y (ii) una PD-1 de longitud completa unida a membrana. Ambos antígenos se generaron por métodos de transfección recombinante en una línea de células CHO.

Ratones HuMab y KM mice™ transgénicos

Se prepararon anticuerpos monoclonales humanos contra PD-1 usando la cepa HCo7 del ratón transgénico HuMab y la cepa KM del ratón transcromosómico transgénico, expresando cada uno de ellos genes de anticuerpos humanos. En cada una de estas cepas de ratón, el gen de la cadena ligera kappa endógeno de ratón se perturbó homocigóticamente como se describe en Chen et al. (1993) EMBO J. 12; 811-820 y el gen de la cadena pesada endógeno de ratón se perturbó homocigóticamente como se describe en el Ejemplo 1 de la publicación PCT WO 01/09187. Cada una de estas cepas de ratón lleva un transgén de la cadena ligera kappa humana, KCo5, como se describe en Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851. La cepa HCo7 contiene el transgén HCo7 de la cadena pesada humana como se describe en las patentes de Estados Unidos con números 5.545.806; 5.625.825; y 5.545.807. La cepa KM contiene el transcromosoma SC20 como se describe en la publicación PCT WO 02/43478.

Inmunizaciones de HuMab y KM:

Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos contra PD-1, los ratones HuMab y KM mice™ se inmunizaron con proteína de fusión PD-1 recombinante purificada y células CHO transfectadas con PD-1 como antígeno. Los esquemas de inmunización general para los ratones HuMab se describen en Lonberg, N. et al (199A) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851 y en la publicación PCT WO 98/24884. Los ratones tenían 6-16 semanas de edad en el momento de la primera infusión de antígeno. Se usaron una preparación recombinante purificada (5-50 µg) del antígeno de la proteína de fusión PD-1 y 5-10x10⁶ células se utilizaron para inmunizar los ratones HuMab y KM mice™ por vía intraperitoneal, por vía subcutánea (Sc) o mediante inyección en la almohadilla plantar.

Los ratones transgénicos se inmunizaron dos veces con antígeno en adyuvante completo de Freund o adyuvante Ribí IP, seguido por 3-21 días IP (hasta un total de 11 inmunizaciones) con el antígeno en adyuvante completo de Freund o adyuvante Ribí. La respuesta inmunitaria se controló por extracción de sangre retroorbital. El plasma se cribó por ELISA (como se describe más adelante), y los ratones con títulos de inmunoglobulina humana contra PD-1 suficientes se usaron en las fusiones. Los ratones recibieron un refuerzo por vía intravenosa con el antígeno 3 días antes del sacrificio y extirpación de los bazo. Normalmente, se realizaron 10-35 fusiones para cada antígeno. Varias docenas de ratones se inmunizaron con cada antígeno.

Selección de ratones HuMab o KM Mice™ que producen anticuerpos dirigidos contra PD-1:

Para seleccionar ratones HuMab o KM mice™ que producen anticuerpos que se unen a PD-1, el suero de ratones inmunizados se analizó mediante ELISA como se describe en Fishwild, D. et al. (1996). En resumen, placas de microtitulación se revistieron con proteína de fusión PD-1 recombinante purificada de células CHO transfectadas a 1-2 µg/ml en PBS, 100 µl/pocillo incubadas a 4 °C durante la noche después bloqueadas con 200 µl/pocillo de suero de feto bovino al 5 % en PBS/Tween (0,05 %). Las diluciones de los sueros de los ratones inmunizados con PD-1 se añadieron a cada pocillo y se incubaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS/Tween y después se incubaron con un anticuerpo policlonal de cabra dirigido contra IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras el lavado, las placas se revelaron con sustrato ABTS (Sigma, A-1888, 0,22 mg/ml) y se analizaron mediante espectrofotometría a una DO 415-495. Los ratones que desarrollaron los títulos más altos de anticuerpos dirigidos contra PD-1 se utilizaron en las fusiones. Las fusiones se realizaron como se describe a continuación, y los sobrenadantes de hibridoma se analizaron mediante ELISA para determinar actividad anti-PD-1.

Generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales humanos contra PD-1:

Los esplenocitos de ratón, aislados de ratones HuMab o KM, se fusionaron con una línea de células de mieloma de ratón bien usando protocolos normalizados basados en PEG o electrofusión basada en campo eléctrico usando un electroporador de fusión celular CytoPulse de cámara grande (CytoPulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD). Los hibridomas resultantes se cribaron después según la producción de anticuerpos específicos de antígenos. Suspensiones monocelulares de esplenocitos procedentes de ratones inmunizados se fusionaron a un cuarto del número de células de mieloma de ratón SP2/0 no secretor (ATCC, CRL 1581) con PEG al 50 % (Sigma). Las células se sembraron en placas a aproximadamente 1x10⁵/pocillo en una placa de microtitulación de fondo plano, seguido por una incubación de aproximadamente dos semanas en medio selectivo que contiene suero de feto bovino al 10 %, medio condicionado P388D1 al 10 % (ATCC, CRL TIB-63), 3-5 % de origen (IGEN) en DMEM (Mediatech, CRL 10013, rico en glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio) junto con HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 mg/ml de gentamicina e 1x HAT (Sigma, CRL P-7185). Después de 1-2 semanas, las células se cultivaron en un medio donde el HAT se ha sustituido por HT. A continuación, los pocillos individuales se cribaron por ELISA (descrito anteriormente) para determinar anticuerpos monoclonales de IgG contra PD-1. Una vez que ha producido un amplio crecimiento del hibridoma, el medio se controló normalmente después de 10-14 días. Los hibridomas que secretan anticuerpos se volvieron a sembrar en placas, se volvieron a cribar y, si seguían siendo positivos para la IgG humana, los anticuerpos monoclonales contra PD-1 se subclonaron al menos dos veces mediante dilución limitante. Los subclones estables se cultivaron después *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpos en medio de cultivo de tejido para su caracterización adicional.

Los clones de hibridoma 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 y 5F4 se seleccionaron para su análisis adicional.

Ejemplo 2: Caracterización estructural de los anticuerpos monoclonales humanos 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 y 5F4

Las secuencias de ADNc que codifican las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos monoclonales 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 y 5F4 se obtuvieron de los hibridomas 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 y 5F4, respectivamente, usando técnicas convencionales de PCR y se secuenciaron usando técnicas convencionales de secuenciación del ADN.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 17D8 se muestran en la Figura 1A y en las SEQ ID NO: 57 y 1, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 17D8 se muestran en la Figura 1B y en la SEQ ID NO:64 y 8, respectivamente.

La comparación entre la secuencia de la cadena pesada de inmunoglobulina de 17D8 y las secuencias de la cadena pesada de la inmunoglobulina de línea germinal humana conocida demostraron que la cadena pesada de 17D8 utiliza un segmento VH procedente de 3-33 de VH de la línea germinal humana, un segmento D no determinado, y un segmento JH de JH 4b de la línea germinal humana. El alineamiento de la secuencia 17D8 VH con la secuencia VH 3-33 de la línea germinal se muestra en la Figura 8. El análisis adicional de la secuencia de VH de 17D8 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena pesada como se muestran en las Figuras 1A y 8, y en las SEQ ID NO: 15, 22 y 29, respectivamente.

La comparación entre la secuencia de la cadena ligera de inmunoglobulina de 17D8 y las secuencias de la cadena ligera de la inmunoglobulina de la línea germinal humana conocida demostró que la cadena ligera de 17D8 utiliza un segmento VL procedente de VK L6 de la línea germinal humana y un segmento JR procedente de la línea germinal humana 4 de JL. El alineamiento de la secuencia 17D8 VL con la secuencia VR L6 de la línea germinal se muestra en la Figura 9. El análisis adicional de la secuencia de VL de 17D8 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena ligera como se muestran en las Figuras 1B y 9, y en las SEQ ID NOs: 36, 43 y 50, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 2D3 se muestran en la Figura 2A y en la SEQ ID NO: 58 y 2, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 2D3 se muestran en la Figura 2B y en la SEQ ID NO:65 y 9, respectivamente.

La comparación entre la secuencia de la cadena pesada de inmunoglobulina de 2D3 y las secuencias de la cadena pesada de la inmunoglobulina de línea germinal humana conocida demostraron que la cadena pesada de 2D3 utiliza un segmento VH procedente de 3-33 de VH de la línea germinal humana, un segmento D procedente de 7-27 de la línea germinal humana, y un segmento JH procedente de 4b de JH de la línea germinal humana. El alineamiento de la secuencia 2D3 VH con la secuencia VH 3-33 de la línea germinal se muestra en la Figura 8. El análisis adicional de la secuencia de VH de 2D3 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena pesada como se muestran en las Figuras 2A y 8, y en las SEQ ID NO: 16, 23 y 30, respectivamente.

La comparación entre la secuencia de la cadena ligera de inmunoglobulina de 2D3 y las secuencias de la cadena ligera de la inmunoglobulina de la línea germinal humana conocida demostró que la cadena ligera de 2D3 utiliza un segmento VL procedente de VK L6 de la línea germinal humana y un segmento JR procedente de JR 4 de la línea germinal humana.

El alineamiento de la secuencia 2D3 VL con la secuencia VR L6 de la línea germinal se muestra en la Figura 9. El análisis adicional de la secuencia de VL de 2D3 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena ligera como se muestran en las Figuras 2B y 9, y en las SEQ ID NOs: 37, 44 y 51, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 4H1 se muestran en la Figura 3A y en la SEQ ID NO: 59 y 3, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 4H1 se muestran en la Figura 3B y en la SEQ ID NO:66 y 10, respectivamente.

La comparación entre la secuencia de la cadena pesada de inmunoglobulina de 4H1 y las secuencias de la cadena pesada de la inmunoglobulina de línea germinal humana conocida demostraron que la cadena pesada de 4H1 utiliza

5 un segmento VH procedente de 3-33 de VH de la línea germinal humana, un segmento D no determinado, y un segmento JH de JH 4b de la línea germinal humana. El alineamiento de la secuencia 4H1 VH con la secuencia VH 3-33 de la línea germinal se muestra en la Figura 8. El análisis adicional de la secuencia de VH de 4H1 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena pesada como se muestran en las Figuras 3A y 8, y en las SEQ ID NO: 17, 24 y 31, respectivamente.

10 La comparación entre la secuencia de la cadena ligera de inmunoglobulina de 4H1 y las secuencias de la cadena ligera de la inmunoglobulina de la línea germinal humana conocida demostró que la cadena ligera de 4H1 utiliza un segmento VL procedente de VK L6 de la línea germinal humana y un segmento JR procedente de JL1 de la línea germinal humana.

15 El alineamiento de la secuencia 4H1 VL con la secuencia VK L6 de la línea germinal se muestra en la Figura 10. El análisis adicional de la secuencia de VL de 4H1 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena ligera como se muestran en las Figuras 3B y 10, y en las SEQ ID NOs: 38, 45 y 52, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 5C4 se muestran en la Figura 4A y en la SEQ ID NO: 60 y 4, respectivamente.

20 Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 5C4 se muestran en la Figura 4B y en la SEQ ID NO:67 y 11, respectivamente.

25 La comparación entre la secuencia de la cadena pesada de inmunoglobulina de 5C4 y las secuencias de la cadena pesada de la inmunoglobulina de línea germinal humana conocida demostraron que la cadena pesada de 5C4 utiliza un segmento VH procedente de 3-33 de VH de la línea germinal humana, un segmento D no determinado, y un segmento JH de JH 4b de la línea germinal humana. El alineamiento de la secuencia 5C4 VH con la secuencia VH 3-33 de la línea germinal se muestra en la Figura 8. El análisis adicional de la secuencia de VH de 5C4 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena pesada como se muestran en las Figuras 4A y 8, y en las SEQ ID NO: 18, 25 y 32, respectivamente.

30 La comparación entre la secuencia de la cadena ligera de inmunoglobulina de 5C4 y las secuencias de la cadena ligera de la inmunoglobulina de la línea germinal humana conocida demostró que la cadena ligera de 5C4 utiliza un segmento VL procedente de VK L6 de la línea germinal humana y un segmento JR procedente de JL1 de la línea germinal humana.

35 El alineamiento de la secuencia 5C4 VL con la secuencia VK L6 de la línea germinal se muestra en la Figura 10. El análisis adicional de la secuencia de VL de 5C4 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena ligera como se muestran en las Figuras 4B y 10, y en las SEQ ID NOs: 39, 46 y 53, respectivamente.

40 Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 4A11 se muestran en la Figura 5A y en la SEQ ID NO: 61 y 5, respectivamente.

45 Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 4A11 se muestran en la Figura 5B y en la SEQ ID NO:68 y 12, respectivamente.

50 La comparación entre la secuencia de la cadena pesada de inmunoglobulina de 4A11 y las secuencias de la cadena pesada de la inmunoglobulina de línea germinal humana conocida demostraron que la cadena pesada de 4A11 utiliza un segmento V_H procedente de 4-39 de VH de la línea germinal humana, un segmento D procedente de 3-9 de la línea germinal humana, y un segmento JH procedente de 4b de JH de la línea germinal humana. El alineamiento de la secuencia 4A11 VH con la secuencia VH 4-39 de la línea germinal se muestra en la Figura 11. El análisis adicional de la secuencia de VH de 4A11 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena pesada como se muestran en las Figuras 5A y 11, y en las SEQ ID NO: 19, 26 y 33, respectivamente.

55 La comparación entre la secuencia de la cadena ligera de inmunoglobulina de 4A11 y las secuencias de la cadena ligera de la inmunoglobulina de la línea germinal humana conocida demostró que la cadena ligera de 4A11 utiliza un segmento VL procedente de VK L15 de la línea germinal humana y un segmento JR procedente de JL1 de la línea germinal humana. El alineamiento de la secuencia 4A11 VL con la secuencia VK L6 de la línea germinal se muestra en la Figura 12. El análisis adicional de la secuencia de VL de 4A11 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, GDR2 y CD3 de la cadena ligera como se muestran en las Figuras 5B y 12, y en las SEQ ID NOs: 40, 47 y 54, respectivamente.

60 Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 7D3 se muestran en la Figura 7A y en las SEQ ID NO: 62 y 6, respectivamente.

65

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 7D3 se muestran en la Figura 7B y en las SEQ ID NO: 69 y 13, respectivamente.

5 La comparación entre la secuencia de la cadena pesada de inmunoglobulina de 7D3 y las secuencias de la cadena pesada de la inmunoglobulina de línea germinal humana conocida demostraron que la cadena pesada de 7D3 utiliza un segmento V_H procedente de 3-33 de V_H de la línea germinal humana, un segmento 7-27 D de la línea germinal humana, y un segmento JH de JH 4b de la línea germinal humana. El alineamiento de la secuencia 7D3 V_H con la secuencia V_H 3-33 de la línea germinal se muestra en la Figura 8. El análisis adicional de la secuencia de V_H de 7D3 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, 10 CDR2 y CD3 de la cadena pesada como se muestran en las Figuras 6A y 8, y en las SEQ ID NO: 20, 27 y 34, respectivamente.

15 La comparación entre la secuencia de la cadena ligera de inmunoglobulina de 7D3 y las secuencias de la cadena ligera de la inmunoglobulina de la línea germinal humana conocida demostró que la cadena ligera de 7D3 utiliza un segmento V_L procedente de VK L6 de la línea germinal humana y un segmento JR procedente de la línea germinal humana 4 de JK.

20 El alineamiento de la secuencia 7D3 V_L con la secuencia VK L6 de la línea germinal se muestra en la Figura 9. El análisis adicional de la secuencia de V_L de 7D3 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena ligera como se muestran en las Figuras 6B y 9, y en las SEQ ID NOs: 41, 48 y 55, respectivamente.

25 Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 5F4 se muestran en la Figura 7A y en la SEQ ID NO: 63 y 7, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 5F4 se muestran en la Figura 7B y en la SEQ ID NO:70 y 14, respectivamente.

30 La comparación entre la secuencia de la cadena pesada de inmunoglobulina de 5F4 y las secuencias de la cadena pesada de la inmunoglobulina de línea germinal humana conocida demostraron que la cadena pesada de 5F4 utiliza un segmento V_H procedente de 4-39 de V_H de la línea germinal humana, un segmento D procedente de 3-9 de la línea germinal humana, y un segmento JH procedente de 4b de JH de la línea germinal humana. El alineamiento de la secuencia 5F4 V_H con la secuencia V_H 4-39 de la línea germinal se muestra en la Figura 11. El análisis adicional de la secuencia de V_H de 5F4 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena pesada como se muestran en las Figuras 7A y 11, y en las SEQ ID NO: 21, 28 y 35, respectivamente.

40 La comparación entre la secuencia de la cadena ligera de inmunoglobulina de 5F4 y las secuencias de la cadena ligera de la inmunoglobulina de la línea germinal humana conocida demostró que la cadena ligera de 5F4 utiliza un segmento V_L procedente de VK L15 de la línea germinal humana y un segmento JR procedente de la línea germinal humana 1 de JK. El alineamiento de la secuencia 5F4 V_L con la secuencia VK L6 de la línea germinal se muestra en la Figura 12. El análisis adicional de la secuencia de V_L de 5F4 según el sistema Kabat de la región de determinación CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena ligera como se muestran en las Figuras 7B y 12, y en las SEQ ID NOs: 42, 49 y 56, respectivamente.

45 **Ejemplo 3: Caracterización de la especificidad de unión y cinética de unión de los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra PD-1**

50 En este ejemplo, se ha estudiado la afinidad de unión y cinética de unión de los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra PD-1 mediante análisis BIAcore. La especificidad de unión y la competición cruzada se han estudiado mediante citometría de flujo.

Afinidad y cinética de unión

55 Los anticuerpos anti-PD-1 se caracterizaron según afinidades y cinéticas de unión mediante análisis BIAcore (Biacore AB, Upsala, Suecia). La proteína de fusión PD-1 recombinante humana se unió covalentemente a una oblea CM5 (oblea revestida con carboximetildextrano) mediante aminas primarias, usando química convencional de acoplamiento de aminas y un kit proporcionado por Biacore. La unión se midió haciendo fluir los anticuerpos en tampón HBS EP (proporcionado por Biacore AB) a una concentración 267 nM a un caudal de 50 µl/min. La cinética de asociación del antígeno-anticuerpo se siguió durante 3 minutos y la cinética de disociación se siguió durante 7 minutos. Las curvas de asociación y disociación se ajustaron a un modelo de unión de Langmuir 1:1 usando el programa informático BIAevaluation (Biacore AB). Para minimizar los efectos de la avidéz en la estimación de las constantes de unión, solo se usó en el ajuste el segmento inicial de los datos correspondientes a las fases de asociación y disociación. Los valores determinados para K_D, K_{on} y K_{off} se muestran en la Tabla 2.

65 Tabla 2. Datos de unión Biacore para los anticuerpos monoclonales humanos de PD-1.

N.º de muestra	ID de muestra	Afinidad, $K_D \times 10^{-9}$ (M)	Asociación (<i>on rate</i>) $k_{on} \times 10^5$ (1/Ms)	Disociación (<i>off rate</i>) $k_{off} \times 10^{-4}$ l/s
1	17D8	0,16	2,56	0,45
2	2D3	1,20	3,77	4,52
3	4H1	5,46	3,15	1,72
4	5C4	0,73	4,32	3,15
5	4A11	0,13	0,76	0,099
6	7D3	2,49	18,2	4,54
7	5F4	2,91	8,74	2,54

Especificidad de unión mediante citometría de flujo

5 Líneas de células de ovario de hámster chino (CHO) que expresan PD-1 recombinante humana en la superficial celular se desarrollaron y se usaron para determinar la especificidad de los anticuerpos monoclonales humanos de PD-1 mediante citometría de flujo. Las células CHO se transfectaron con plásmidos de expresión que contenían ADNc de longitud completa que codifican formas transmembrana de PD-1. La unión de los anticuerpos monoclonales humanos contra PD-1 5C4 y 4H1 se evaluó incubando las células transfectadas con los anticuerpos monoclonales humanos contra PD-1 a una concentración de 20 µg/ml. Las células se lavaron y la unión se detectó con un Ab dirigido contra IgG humana marcado con FITC. Los análisis de citometría de flujo se realizaron con un citómetro de flujo FACS (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los resultados se representa gráficamente en las Figuras 13 A (5C4) y 13B (4H1). Los anticuerpos monoclonales humanos contra PD-1 se unieron a las células CHO transfectadas con PD-1 pero no a las células CHO que no se transfectaron con PD-1 humana. Estos datos demuestran la especificidad de los anticuerpos monoclonales humanos contra PD-1 para la PD-1.

15 Especificidad de unión mediante ELISA contra otros miembros de la familia de CD28

Se realizó una comparación de la unión de los anticuerpos anti-PD-1 a otros miembros de la familia de CD28 mediante ELISA convencional usando cuatro miembros de la familia de CD28 diferentes para estudiar la especificidad de unión a la PD-1 humana.

20 Las proteínas de fusión de los miembros de la familia de CD28, ICOS, CTLA-4 y CD28 (R&D Biosystems) se estudiaron para determinar su unión a los anticuerpos monoclonales humanos contra PD-1 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, y 4A11. Se realizaron procedimientos ELISA convencionales. Los anticuerpos monoclonales humanos contra PD-1 se añadieron a una concentración de 20 µg/ml. Como anticuerpo secundario, se usó un anticuerpo policlonal de cabra dirigido contra IgG humana (específico de la cadena kappa) conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). En la Figura 14 se muestran los resultados. Cada uno de los anticuerpos monoclonales humanos contra PD-1 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 y 5F4 se unieron con elevada especificidad a la PD-1, pero no a otros miembros de la familia de CD28.

30 **Ejemplo 4: Caracterización de la unión del anticuerpo dirigido contra PD-1 a la PD-1 expresada sobre la superficie de células humanas y de mono**

Los anticuerpos dirigidos contra PD-1 se estudiaron por su unión a células que expresan PD-1 sobre su superficie celular mediante citometría de flujo.

35 Los linfocitos T humanos, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de mono, y células CHO transfectadas con PD-1 se analizaron individualmente para determinar su unión al anticuerpo, los linfocitos T humanos y las PBMC de macaco se activaron con un anticuerpo dirigido contra CD3 para inducir la expresión de PD-1 en los linfocitos T antes de la unión con un anticuerpo monoclonal dirigido contra PD-1 humano. La unión de los anticuerpos monoclonales humanos contra PD-1 5C4 y 4H1 se evaluó incubando las células transfectadas con cualquiera de las formas IgG1 o IgG4 de los anticuerpos monoclonales humanos contra PD-1 a diferentes concentraciones. Las células se lavaron y la unión se detectó con un Ab dirigido contra IgG humana marcado con FITC. Los análisis de citometría de flujo se realizaron con un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los resultados se muestran en las Figuras 15A (linfocitos T humanos activados), 15B (PBMC de macaco) y 15C (células CHO transfectadas con PD-1). Los anticuerpos monoclonales anti-PD-1 5C4 y 4H1 se unieron a los linfocitos T humanos activados, las PBMC activadas de mono, y las células CHO transfectadas con PD-1 humana, medido según la intensidad de fluorescencia media (MFI) de la tinción. Estos datos demuestran que los HuMAB contra PD-1 se unen a PD-1 en la superficie de células tanto de ser humano como de macaco.

50

Ejemplo 5: Efecto de los anticuerpos humanos contra PD-1 sobre la proliferación celular y la producción de citoquinas en una reacción de linfocitos mixtos

5 Se usó una reacción de linfocitos mixtos para demostrar el efecto de bloqueo de la ruta de la PD-1 hacia los células linfocíticas efectoras. Los linfocitos T del ensayo se analizaron para determinar la proliferación, secreción de IFN-gamma y secreción de IL-2 en presencia o ausencia del anticuerpo HuMAb dirigido contra PD-1.

10 Los linfocitos T humanos se purificaron a partir de PBMC usando una columna de enriquecimiento de linfocitos T CD4+ humanos (R&D systems). Cada cultivo contenía 10^5 linfocitos T purificados y 10^4 células dendríticas alogénicas en un volumen total de 200 μ l. El anticuerpo monoclonal dirigido contra PD-1 5C4, 4H1, 17D8, 2D3 o una porción del fragmentos Fab de 5C4 se añadió a cada cultivo en diferentes concentraciones del anticuerpo. Como control negativo, se usó bien nada de anticuerpo, o un anticuerpos control de isotipo. Las células se cultivaron durante 5 días a 37 °C. Después del día 5, 100 μ l de medio se tomaron de cada cultivo para la medición de citoquinas. Los niveles de IFN-gamma, y de otras citoquinas se midieron usando kits OptEIA ELISA (BD Bio sciences). Las células se marcaron con 3 H-timidina, se cultivaron durante 18 horas más, y se analizaron para determinar la proliferación celular. Los resultados se muestran en las Figuras 16A (proliferación de linfocitos T), 16B (secreción de IFN- γ) y 16C (secreción de IL-2). Los anticuerpos monoclonales humanos contra PD-1 estimularon la proliferación de linfocitos T, la secreción de IFN-gamma y la secreción de IL-2 de una manera dependiente de la concentración. El fragmento 5C4-Fab también estimuló la proliferación de linfocitos T, la secreción de IFN-gamma y la secreción de IL-2 de una manera dependiente de la concentración. Por el contrario, los cultivos que contenían el anticuerpo control de isotipo no mostraron un aumento en la proliferación de linfocitos T, secreción de IFN-gamma o secreción de IL-2.

Ejemplo 6: Bloqueo del ligando de unión a PD-1 mediante los anticuerpos dirigidos contra PD-1 humana

25 Los HuMAb anti-PD-1 se sometieron a ensayo para determinar su capacidad para bloquear la unión de los ligandos PD-L1 y PD-L2 a PD-1 expresada sobre células CHO transfectadas mediante el uso de un ensayo de citometría de flujo.

30 Las células CHO que expresaban PD-1 se suspendieron en tampón FACS (PBS con suero fetal de bovino al 4 %). Se añadieron diferentes concentraciones de los HuMAb anti-PD-1 5C4 y 4H1 a la suspensión celular y se incubaron a 4 °C durante 30 minutos. El anticuerpo no unido se eliminó por lavado y se añadieron bien la proteína de fusión PD-L1 marcada con FITC o bien la proteína de fusión PD-L2 marcada con FITC a los tubos, que se incubaron a 4 °C durante 30 minutos. Los análisis de citometría de flujo se realizaron con un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los resultados se representan gráficamente en las Figuras 17A (bloqueo de PD-L1) y 17B (bloqueo de PD-L2). Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra PD-1 5C4 y 4H1 bloquearon la unión de PD-1-L1 y PD-L2 a las células CHO transfectadas con la PD-1 humana, medido según la intensidad de fluorescencia media (MFI) de la tinción. Estos datos demuestran que los HuMAb contra PD-1 bloquean la unión del ligando (tanto PD-L1 como PD-L2) a PD-1 de la superficie celular.

40 **Ejemplo 7: Efecto de los anticuerpos humanos contra PD-1 sobre la liberación de citoquinas en la sangre humana**

45 Los HuMAb anti-PD-1 se mezclaron con sangre completa humana reciente para determinar si los HuMAb anti-PD-1 en solitario estimulaban la liberación de determinadas citoquinas desde células sanguíneas humanas.

50 500 μ l de sangre completa humana reciente heparinizada, se añadió a cada pocillo. Se añadieron a cada pocillo bien 10 μ g o 100 μ g de un HuMAb anti-PD-1 (4H1 o 5C4, este último cualquiera de un isotipo IgG1 o IgG4). Algunos pocillos se cultivaron con anticuerpo dirigido contra CD3 como control positivo, o con un anticuerpo de IgG1 humana o de IgG4 humana como controles negativos emparejados por isotipo. Las células se incubaron a 37 °C durante cualquiera de 6 o 24 horas. Las células se centrifugaron y el plasma se recogió para medir las citoquinas IFN-gamma, TNF-alfa, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12 usando un ensayo citométrico de arrastre de perlas para citoquinas (BD Biosciences). La concentración de cada citoquina (pg/ml) se muestra en las Tablas 3a, con una incubación de 6 horas, y 3b, con una incubación de 24 horas, a continuación. Los resultados muestran que el tratamiento con los anticuerpos humanos dirigidos contra PD-1, 5C4 y 4H1, en solitario no estimularon las células sanguíneas humanas para liberar ninguna de las citoquinas IFN-gamma, TNF-alfa, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12.

Tabla 3a. Producción de citoquinas después de 6 horas de incubación

Ab	IFN-gamma (pg/ml)	TNF-alfa (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)
Sin Ab	12,3	2	3	5	3,6	1,9
10 mg/ml anti-CD3	5000	530	82,6	510,4	37,2	467,9
100 mg/ml anti-CD3	5000	571	91,3	530	43,9	551,5
10 mg/ml hlgG1	7	1,8	2,8	4,4	2,6	1,5
100 mg/ml hlgG1	0	2,2	2,7	6	2,6	1,4
10 mg/ml hlgG4	5,4	1,4	2,5	4,5	2,1	1,3
100 mg/ml hlgG4	6,4	2,3	3	32,6	2,9	1,4
10 mg/ml 4H1	6,2	1,8	2,4	4,1	2,8	1,6
100 mg/ml 4H1	11,8	2	2,6	3,5	2,6	1,7
10 mg/ml 5C4 IgG1	4,2	1,6	2,3	3,9	2,5	1,3
100 mg/ml 5C4 IgG1	0	1,4	2,2	3,6	2,1	1,2
10 mg/ml 5C4 IgG4	8,3	2,5	1,9	4,8	1,6	1,5
100 mg/ml 5C4 IgG4	3,6	1,7	2,4	3,9	2,3	1,5

Tabla 3b. Producción de citoquinas después de 24 horas de incubación

Ab	IFN-gamma (pg/ml)	TNF-alfa (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)
Sin Ab	11,2	2	6,1	5,9	2,6	1,7
10 mg/ml anti-CD3	5000	565,9	432	5000	64,5	1265,3
100 mg/ml anti-CD3	5000	535	461	5000	73,8	1334,9
10 mg/ml hlgG1	0	0	0	0	0	0
100 mg/ml hlgG1	11,5	1,7	7,9	60,8	2,9	1,5
10 mg/ml hlgG4	24,6	3,1	8,3	63,4	3,1	2,3

(continuación)

Ab	IFN-gamma (pg/ml)	TNF-alfa (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)
100 mg/ml hlgG4	11,2	1,8	8	27,7	3,1	2,4
10 mg/ml 4H1	27,3	2,9	8	13,9	5,3	2,6
100 mg/ml 4H1	17,5	2,5	4,4	7	4	2,1
10 mg/ml 5C4 IgG1	9,1	2	7,6	68,5	3,5	1,8
100 mg/ml 5C4 IgG1	12,9	1,9	6,1	25,3	2,9	1,7
10 mg/ml 5C4 IgG4	14	1,9	4,4	3,3	2,6	1,9
100 mg/ml 5C4 IgG4	0	0	0	0	0	0

Ejemplo 8: Efecto de los anticuerpos dirigidos contra PD-1 sobre la apoptosis de linfocitos T

5 El efecto de los anticuerpos dirigidos contra PD-1 sobre la inducción de la apoptosis de linfocitos T se midió usando un ensayo de tinción con anexina V.

10 Los linfocitos T se cultivaron en una reacción de linfocitos mixtos, como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 5. El anticuerpo dirigido contra PD-1 5C4 se añadió al tubo a una concentración de 25 µg/ml. Como control se usó un anticuerpo no específico. Se añadieron anexina V y yoduro de propidio de acuerdo con un protocolo normalizado (BD Biosciences). La mezcla se incubó durante 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente y posteriormente se analizó usando un citómetro de flujo FACSscan (Becton Dickinson, San Jose, CA). En la Figura 18 se muestran los resultados. El anticuerpo dirigido contra PD-1 5C4 no tuvo efectos sobre la apoptosis de linfocitos T.

Ejemplo 9: Efecto de los anticuerpos dirigidos contra PD-1 sobre la secreción de citoquinas por células PBMC estimuladas de forma vírica con un donante positivo para virus

20 En este ejemplo, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) procedentes de un donante positivo para el CMV se aislaron y se expusieron a un lisado de CMV en presencia o ausencia de anticuerpos dirigidos contra PD-1 para estudiar el efecto de los anticuerpos sobre la secreción de citoquinas estimulada por antígeno.

25 2x10⁵ PMBC humanas procedentes de un donante positivo para CMV se cultivaron en un volumen total de 200 µl y se añadieron a cada pocillo junto con un lisado de células infectadas por CMV. El HuMAb anti-PD-1 5C4 se añadió a cada pocillo en diferentes concentraciones durante 4 días. Después del día 4, 100 µl de medio se tomaron de cada cultivo para la medición de citoquinas. El nivel de IFN-gamma se midió con kits OptEIA ELISA (BD Biosciences). Las células se marcaron con ³H-timidina, se cultivaron durante 18 horas más, y se analizaron para determinar la proliferación celular. La proliferación celular se analizó usando el reactivo Cell Titer-Glo (Promega). En la Figura 19 se muestran los resultados. El HuMAb anti-PD-1 5C4 aumentó la secreción de IFN-gamma de una manera dependiente de la concentración. Estos resultados muestran que los HuMAb anti-PD-1 pueden estimular la liberación de IFN-gamma, en una respuesta de los linfocitos T de memoria desde células PBMC previamente estimuladas contra un antígeno.

Ejemplo 10: Efecto del anticuerpo dirigido contra PD-1 sobre la respuesta secundaria de anticuerpos al antígeno

35 Los ratones se inmunizaron y se volvieron a estimular con un TI-antígeno (DNP-Ficoll) y también se trataron con un anticuerpo de rata dirigido contra PD-1 de ratón, o un anticuerpos de control, para estudiar el efecto del anticuerpo dirigido contra PD-1 sobre los títulos de anticuerpos.

40 Ratones C57BL6 hembra se dividieron en dos grupos, con 6 ratones/grupo. Un grupo se trató con una IgG de rata del control y el otro con un anticuerpo de rata dirigido contra PD-1 de ratón. Los ratones se inmunizaron con 5 µg de DNP-Ficoll (un TI-antígeno) en 50 µl de CFA por i.p el día 0. Uno del anticuerpo IgG de rata del control o el

anticuerpo de rata dirigido contra PD-1 (200 µg/ratón) se administraron i.p. los días -1, 0 y 2. Cuatro semanas después, los ratones se volvieron a estimular con 5 µg de DNP-Ficoll en 50 µl IFA por i.p el día 0. El anticuerpo de rata dirigido contra mPD-1 o el anticuerpo de control (200 µg/ratón) se administraron i.p. los días 0 y 1. Los títulos de anticuerpos se midieron mediante un ensayo ELISA convencional el día 7 después del refuerzo. Los resultados se muestran en la Tabla 4 siguiente. En los ratones tratados con el anticuerpo dirigido contra mPD-1, ambos isotipos IgM e IgG3 mostraron el mayor aumento en los títulos tras el estímulo con el T1-antígeno, en comparación con los ratones tratados con un anticuerpo de control. Estos resultados demuestran que el tratamiento con anti-PD-1 puede aumentar los títulos de anticuerpos en respuesta al T1-antígeno.

10 Tabla 4. Respuesta secundaria en murino después del tratamiento con el anticuerpo dirigido contra PD-1

Isotipo de anticuerpos	Grupo de control	Anticuerpo de rata dirigido contra PD-1 de ratón	Valor P
IgM	606	1200	0,026
IgG	9	15,55	0,18
IgG1	1,2	1,1	0,83
IgG2b	5,05	9,26	0,18
IgG3	21,9	81,2	0,03

* Los resultados se muestran como concentración promedio del isotipo de anticuerpos (µg/ml)

Ejemplo 11: Tratamiento de un modelo de tumor *in vivo* usando anticuerpos dirigidos contra PD-1

15 Los ratones con implante de tumor canceroso se trataron *in vivo* con anticuerpos dirigidos contra PD-1 para estudiar el efecto *in vivo* de los anticuerpos sobre el crecimiento tumoral. Como control positivo, se usó un anticuerpo anti-CTLA-4, ya que estos anticuerpos han mostrado inhiben el crecimiento tumoral *in vivo*.

20 En este experimento, el anticuerpo dirigido contra PD-1 usado fue un anticuerpo quimérico de rata dirigido contra PD-1 de ratón generado utilizando técnicas bien conocidas de laboratorio. Para generar el anticuerpo de rata dirigido contra PD-1 de ratón, las ratas se inmunizaron con células de ratón transfectadas para expresar una proteína de fusión PD-1 de ratón recombinante (R&D Systems N.º de catálogo 1021-PD) y los anticuerpos monoclonales se cribaron para determinar la unión al antígeno PD-1 de ratón mediante un ensayo ELISA. A continuación, las regiones V del anticuerpo de rata dirigido contra PD-1 se unieron de forma recombinante a la región constante de IgG1 de murino usando técnicas convencionales en biología molecular, y se volvieron a cribar según la unión a la PD-1 de ratón mediante ELISA y FACS. El anticuerpo quimérico de rata dirigido contra PD-1 de ratón utilizado en el presente documento se denomina como 4H2.

30 Para los estudios con tumores, ratones AJ hembra entre 6-8 semanas de edad (Harlan Laboratories) se aleatorizaron en 6 grupos según el peso. Los ratones recibieron un implante subcutáneo en el flanco derecho de 2 x 10⁶ células de fibrosarcoma SA1/N disueltas en 200 µl de medio DMEM el día 0. Los ratones se trataron con vehículo de PBS, o con anticuerpos a 10 mg/kg. Los animales recibieron una dosis mediante inyección intraperitoneal de aproximadamente 200 µl de PBS que contenía anticuerpo o vehículo los días 1, 4, 8 y 11. Cada grupo contenía 10 animales, y los grupos estaban compuestos por: (i) un grupo de vehículo, (ii) IgG de ratón del control, (iii) IgG de hámster del control, (iv) anticuerpo de hámster dirigido contra CTLA-4 de ratón (v) el anticuerpo quimérico dirigido contra PD-1 4H2. Los ratones se controlaron dos veces a la semana para determinar el crecimiento tumoral durante aproximadamente 6 semanas. Usando un calibre electrónico, los tumores se midieron tridimensionalmente (alto x ancho x largo) y se calculó el volumen tumoral. Los ratones se sometieron a eutanasia cuando los tumores alcanzaron el criterio de valoración tumoral (1500 mm³) o mostraron más del 15 % de pérdida de peso. En la Figura 20 se muestran los resultados. El anticuerpo dirigido contra PD-1 extendió el tiempo medio para alcanzar el volumen del criterio de valoración tumoral (1500 mm³) de ~25 días en los grupos del control hasta ~40 días. Por tanto, el tratamiento con un anticuerpo dirigido contra PD-1 tiene un efecto inhibitor *in vivo* directo sobre el crecimiento tumoral.

Ejemplo 12: Generación del anticuerpo quimérico (rata-ratón) dirigido contra PD-1, 4H2

45 Se generaron anticuerpos monoclonales de rata contra anticuerpos de PD-1 de ratón (anti-mPD-1 de rata) a partir de ratas inmunizadas con la proteína de fusión mPD-1-hFc usando métodos de producción de hibridomas convencionales (véanse Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495; y Harlow y Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Nueva York). Se subclonaron ocho hibridomas, y los anticuerpos se aislaron y se cribaron para determinar su capacidad para bloquear la unión de PD-L2 de ratón (mPD-L2) a mPD-1. Se identificaron varios anticuerpos dirigidos contra mPD-1 capaces de bloquear la unión de mPD-L2 a mPD-1 (véase, por ejemplo, actividad de 4H2, Figura 41) y la afinidad de unión de varios de estos anticuerpos a la proteína de fusión mPD-1-Fc se determinó mediante ELISA (Figura 42).

El anticuerpo 4H2.B3 se caracterizó adicionalmente, que se cita en el presente documento de forma indistinta como "4H2". Células CHO que expresan PD-1 de ratón se construyeron y se incubaron con el anticuerpo dirigido contra mPD-1, 4H2, a una concentración comprendida de 200 µg/ml a 0,012 µg/ml para determinar la afinidad de unión de 4H2 a PD-1. La unión del anticuerpo dirigido contra mPD-1 a las células CHO que expresan PD-1 se detectó mediante incubación con un anticuerpo de burro dirigido contra IgG de rata, conjugado con FITC, y medición con FACS. El anticuerpo anti-mPD-1 tuvo una CE₅₀ (50 % de la concentración eficaz) de aproximadamente 0,38 µg (Figura 43) y una K_D de 4,7 x 10⁻⁹ M. Para estudiar la inhibición de la unión de PD-L1 a PD-1, se llevó a cabo el mismo ensayo salvo que las células también se incubaron con 0.16 µg de proteína de fusión mPD-L1-hFc, después se detectó la unión de PD-L1 a las células CHO que expresaban PD-1 mediante incubación con un anticuerpo de cabra dirigido contra IgG humana (específico de Fc), conjugado con FITC, y medición de la señal de unión mediante FACS (MFI, intensidad de fluorescencia promedio). El anticuerpo anti-mPD-1 tuvo una CE₅₀ de aproximadamente 0,72 µg (Figura 44).

Para su uso en los modelos de tumor de ratón, el anti-mPD-1 de rata, 4H2, tuvo que modificarse para que el sistema inmunitario del ratón no neutralizara el anticuerpo inmunoterapéutico (es decir, para que el anticuerpo tuviera mejor farmacocinética) y para evitar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) mediante la reducción de las interacciones con el receptor de Fc (es decir, para que el bloqueo del anti-PD-1 pudiera evaluarse sin estar comprometido por los efectos ADCC). Se determinó que el anticuerpo anti-mPD-1 de rata original, 4H2, era un isotipo IgG2a de rata. Así, la porción Fc del anticuerpo 4H2 se sustituyó por una porción Fc de un isotipo IgG1 de ratón. Usando el ensayo anteriormente descrito, se encontró que la afinidad de unión del anticuerpo quimérico de rata-ratón, 4H2, a mPD-1 era comparable a la del anti-mPD-1 de rata, 4H2.B3 (Figura 45). Análogamente, la inhibición de la unión de PD-L1 a PD-1 era comparable para ambos anticuerpos (Figura 46). Por lo tanto, el anticuerpo quimérico de rata-ratón contra mPD-1, 4H2, se usó para examinar la eficacia terapéutica del anticuerpo dirigido contra PD-1 junto con el anticuerpo dirigido contra CTLA-4.

Ejemplo 13: Eficacia de un tratamiento combinado *in Vivo* (anticuerpos anti-CTLA-4 y anti-PD-1) sobre el establecimiento y el crecimiento del tumor

Células de cáncer colorrectal MC38 (PD-L1⁺) (disponibles del Dr. N. Restifo, National Cancer Institute, Bethesda, MD; o Jeffrey Schlom, National Institutes of Health, Bethesda, MD) se implantaron en ratones C57BL/6 (2 x 10⁶ células/ratón). El día 0 (es decir, el día en que las células MC38 se implantaron en los ratones), cada uno de los cuatro grupos de 10 ratones cada uno recibieron una inyección intraperitoneal (IP) de uno de los siguientes: (1) IgG de ratón (control), (2) el anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 9D9 (anticuerpo de ratón dirigido contra CTLA-4 de ratón obtenido de J. Allison, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Nueva York, NY), (3) anticuerpo monoclonal anti-PD-1 4H2 (anticuerpo quimérico en el que un anticuerpo de rata dirigido contra PD-1 de ratón se modificó con una región Fc de ratón, como se describe en el Ejemplo 6), o (4) anticuerpo dirigido contra CTLA-4 9D9 y anticuerpo dirigido contra PD-1 4H2. Las inyecciones de anticuerpos se administraron posteriormente los días 3, 6 y 10. Los tratamientos con los anticuerpos individuales se dosificaron a 10 mg/kg, y la combinación de anticuerpo dirigido contra CTLA-4 y anticuerpo dirigido contra PD-1 se dosificó a 5 mg/kg de cada anticuerpo (es decir, 10 mg/kg de anticuerpo total). Usando un calibre electrónico, los tumores se midieron tridimensionalmente (alto x ancho x largo) y se calculó el volumen tumoral. Los ratones se sometieron a eutanasia cuando los tumores alcanzaron un criterio de valoración determinado. Los resultados se muestran en la Tabla 5 y en la Figura 21.

Tabla 5. Porcentaje de ratones sin tumor después del tratamiento con anti-PD-1 y/o anti-CTLA-4

Tratamiento	Ratones totales estudiados	Ratones sin tumor (%)
mIgG1	10	0
anti-CTLA-4	10	1 (10)
anti-PD-1	10	3 (30)
anti-CTLA-4 + anti-PD-1	10	6 (60)

Ocho ratones en el grupo de la IgG alcanzaron el criterio de valoración del tumor aproximadamente en el día 30 y dos ratones (86066 y 87260) del grupo de la IgG tuvieron tumores ulcerados (Figura 21 A). En el grupo del anticuerpo dirigido contra CTLA-4 en solitario, siete ratones alcanzaron el criterio de valoración del tumor aproximadamente en el día 60, un ratón tuvo un tumor ulcerado (84952), un ratón tuvo un tumor con un volumen menor de 1500 mm³ (85246), y un ratón quedó sin tumor (86057) (Figura 21B). En el grupo del anticuerpo dirigido contra PD-1 en solitario, seis ratones alcanzaron el criterio de valoración del tumor aproximadamente en el día 60, un ratón tuvo un tumor ulcerado (86055), y tres ratones quedaron sin tumor (84955, 85239 y 86750) (Figura 21C). En el grupo de combinación con anticuerpo dirigido contra CTLA-4 y anticuerpo dirigido contra PD-1, cuatro ratones alcanzaron el criterio de valoración del tumor aproximadamente en el día 40, y seis ratones quedaron sin tumor (84596, 85240, 86056, 86071, 86082 y 86761) (Figura 21D).

La Figura 22 muestra que el volumen tumoral medio medido el día 21 fue de aproximadamente 2955 mm³ para el grupo de control de IgG; aproximadamente 655 mm³ para el grupo con el anticuerpo de CTLA-4 en solitario, aproximadamente 510 mm³ para el grupo con el anticuerpo de PD-1 en solitario, y aproximadamente 280 mm³ para el grupo de combinación con anticuerpo dirigido contra CTLA-4 y anticuerpo dirigido contra PD-1. La Figura 23 muestra que la mediana del volumen tumoral medido el día 21 fue de aproximadamente 2715 mm³ para el grupo de IgG; aproximadamente 625 mm³ para el grupo con el anticuerpo de CTLA-4 en solitario; aproximadamente 525 mm³ para el grupo con el anticuerpo de PD-1 en solitario; y aproximadamente 10 mm³ para el grupo de combinación con anticuerpo dirigido contra CTLA-4 y anticuerpo dirigido contra PD-1 (y de hasta 0 mm³ en el día 32).

Este estudio indica que, en un modelo de tumor murino, el tratamiento con el anticuerpo de CTLA-4 en solitario y el tratamiento con el anticuerpo de PD-1 en solitario tuvieron un efecto modesto sobre el crecimiento tumoral, y que el tratamiento de combinación con anticuerpo dirigido contra CTLA-4 y anticuerpo dirigido contra PD-1 tuvo un efecto significativamente mayor sobre el crecimiento tumoral. Es interesante resaltar que el tratamiento de combinación con anticuerpo dirigido contra CTLA-4 y anticuerpo dirigido contra PD-1 tuvo un efecto más significativo sobre el crecimiento tumoral a una dosis de 5 mg/kg de cada anticuerpo, en comparación con el efecto de cualquiera de los anticuerpos en solitario, cuando cada uno se administró a una dosis mayor de 10 mg/kg.

Ejemplo 14: Eficacia de un tratamiento combinado *in Vivo* (anticuerpos anti-CTLA-4 y anti-PD-1) sobre el crecimiento del tumor establecido

Células de cáncer colorrectal MC38 (PD-L1⁺) se implantaron en ratones C57BL/6 (2 x 10⁶ células/ratón) durante un tiempo suficiente (aproximadamente de 6 a 7 días) para permitir la formación de tumores. En el día 6 después del implante (día -1), se realizaron mediciones del tumor, y los ratones se aleatorizaron en función del volumen tumoral medio (aproximadamente 250 mm³) en 11 grupos para la posterior terapia con anticuerpos. El día 0 (es decir, una semana después de implantar las células MC38), los ratones recibieron por inyección IP (1) IgG de ratón (control), (2) anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 9D9, (3) anticuerpo monoclonal anti-PD-1 4H2, o (4) anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 9D9 y anticuerpo monoclonal anti-PD-1 4H2, a una concentración de 10 mg/kg por ratón. Las inyecciones de anticuerpos también se administraron los días 3, 6 y 10. Las composiciones de anticuerpos monoclonales usados tuvieron bajos niveles de endotoxina y no se agregaron significativamente. Usando un calibre electrónico, los tumores se midieron tridimensionalmente (alto x ancho x longitud) y se calculó el volumen tumoral. Las mediciones de los tumores se tomaron el día 0 (los tumores al principio del tratamiento tuvieron un volumen de aproximadamente 125 mm³), y los días 3, 6, 10, 13, 17 y 20 después de la inyección del anticuerpo. Los ratones se sometieron a eutanasia cuando los ratones alcanzaron un criterio de valoración del tumor determinado (un volumen del tumor en particular de 1500 mm³ y/o cuando los ratones mostraron una pérdida de peso superior a aproximadamente un 15 %).

Los once ratones en el grupo de la IgG alcanzaron el criterio de valoración del tumor aproximadamente en el día 17 (Figura 24A). En el grupo del anticuerpo dirigido contra CTLA-4 en solitario, siete de los once ratones alcanzaron el criterio de valoración del tumor aproximadamente en el día 12 (Figura 24B). En el grupo del anticuerpo dirigido contra PD-1 en solitario, cuatro ratones alcanzaron el criterio de valoración del tumor aproximadamente en el día 13 y dos ratones quedaron sin tumor (Figura 24C). En el grupo de combinación con anticuerpo dirigido contra CTLA-4 y anticuerpo dirigido contra PD-1, un ratón alcanzó el criterio de valoración del tumor aproximadamente en el día 17, un ratón alcanzó el criterio de valoración del tumor aproximadamente en el día 45 y nueve ratones quedaron sin tumor en el día 45 (Figura 24D).

La Figura 25 muestra que el volumen tumoral medio medido el día 10 fue de aproximadamente 1485 mm³ para el grupo de control de IgG; aproximadamente 1010 mm³ para el grupo con el anticuerpo de CTLA-4 en solitario; aproximadamente 695 mm³ para el grupo con el anticuerpo de PD-1 en solitario; y aproximadamente 80 mm³ para el grupo de combinación con anticuerpo dirigido contra CTLA-4 y anticuerpo dirigido contra PD-1. La Figura 26 muestra que la mediana del volumen tumoral medido el día 10 fue de aproximadamente 1365 mm³ para el grupo de IgG; aproximadamente 1060 mm³ para el grupo con el anticuerpo dirigido contra CTLA-4 en solitario; aproximadamente 480 mm³ para el grupo con el anticuerpo dirigido contra PD-1 en solitario; y aproximadamente 15 mm³ para el grupo de combinación con anticuerpo dirigido contra CTLA-4 y anticuerpo dirigido contra PD-1 (y de hasta 0 mm³ en el día 17).

Este estudio indica que, en un modelo de tumor murino, el tratamiento con la combinación de anticuerpo de CTLA-4 y anticuerpo de PD-1 tuvo un efecto significativamente mayor sobre el crecimiento tumoral que cualquiera de los anticuerpos en solitario, incluso cuando el tumor ya estaba bien establecido.

Ejemplo 15: Escalado de la dosis de un tratamiento combinado *in Vivo* (anticuerpos anti-CTLA-4 y anti-PD-1) sobre el crecimiento del tumor establecido

Células de cáncer colorrectal MC38 (PD-L1⁺) se implantaron en ratones C57BL/6 (2 x 10⁶ células/ratón) durante un tiempo suficiente (aproximadamente de 6 a 7 días) para permitir la formación de tumores, como se describe en el Ejemplo 3. Grupos de 10 ratones recibieron inyecciones IP los días 0, 3, 6 y 10 de la siguiente forma: Grupo (A) IgG de ratón (control, 20 mg/kg), Grupo (B) anticuerpo monoclonal anti-PD-1 4H2 (10 mg/kg) e IgG de ratón (10 mg/kg),

Grupo (C) anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 9D9 (10 mg/kg) e IgG de ratón (10 mg/kg), Grupo (D) anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 9D9 (10 mg/kg) y anticuerpo monoclonal anti-PD-1 4H2 (10 mg/kg), Grupo (E) anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 9D9 (3 mg/kg) y anticuerpo monoclonal anti-PD-1 4H2 (3 mg/kg), o Grupo (F) anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 9D9 (1 mg/kg) y anticuerpo monoclonal anti-PD-1 4H2 (1 mg/kg). Usando un calibre electrónico, los tumores se midieron tridimensionalmente (alto x ancho x largo) y se calculó el volumen tumoral. Se tomaron mediciones del tumor al principio del tratamiento (es decir, en el día 0, los tumores tenían un volumen medio de aproximadamente 90 mm³), y los días 3, 6, 10, 13, 17 y 20 después del tratamiento con anticuerpo. Los ratones se sometieron a eutanasia cuando los ratones alcanzaron un criterio de valoración del tumor determinado (un volumen del tumor en particular de 1500 mm³ y/o cuando los ratones mostraron una pérdida de peso superior a aproximadamente un 15 %).

La Figura 27A muestra que los 10 ratones del control alcanzaron un criterio de valoración del tumor. La Figura 27B muestra que el grupo tratado con 10 mg/kg de anticuerpo dirigido contra PD-1 (Grupo B) tuvo 6 ratones que alcanzaron el criterio de valoración del tumor y 4 ratones con tumores que tenían un volumen de aproximadamente 750 mm³ o menos. La Figura 27C muestra que el grupo tratado con 10 mg/kg de anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (Grupo C) tuvo 3 ratones que alcanzaron el criterio de valoración del tumor y 7 ratones con tumores que tenían un volumen de aproximadamente 1000 mm³ o menos. La Figura 27D muestra que el grupo tratado con una combinación de 10 mg/kg de anticuerpo dirigido contra PD-1 con 10 mg/kg de anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (Grupo D) tuvo dos ratones con tumores que tenían un volumen de aproximadamente 1000 mm³ o menos, y 8 ratones que quedaron sin tumor. La Figura 27E muestra que el grupo tratado con una combinación de 3 mg/kg de anticuerpo dirigido contra PD-1 con 3 mg/kg de anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (Grupo E) tuvo un ratón que alcanzó el criterio de valoración del tumor, 7 ratones que tenían un volumen de aproximadamente 500 mm³ o menos, y 2 ratones que quedaron sin tumor. La Figura 27F muestra que el grupo tratado con una combinación de 1 mg/kg de anticuerpo dirigido contra PD-1 con 1 mg/kg de anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (Grupo F) tuvo 4 ratones que alcanzaron el criterio de valoración del tumor, 5 ratones que tenían un volumen de aproximadamente 1100 mm³ o menos, y un ratón que quedó sin tumor.

Las Figuras 27G y 27H muestra los volúmenes de tumor en ratones tratados secuencialmente con anticuerpo dirigido contra PD-1 primero y anticuerpo dirigido contra CTLA-4 después, y viceversa. Los ratones de la Figura 27G recibieron primero 10 mg/kg de anti-CTLA-4 cada uno de los días 0 y 3, y después recibieron 10 mg/kg de anticuerpo dirigido contra PD-1 en cada uno de los días 6 y 10. Los ratones de la Figura 27H recibieron primero 10 mg/kg de anticuerpo dirigido contra PD-1 cada uno de los días 0 y 3, y después recibieron 10 mg/kg de anticuerpo dirigido contra CTLA-4 en cada uno de los días 6 y 10. Para el grupo G en el día 27, 8 ratones alcanzaron el criterio de valoración del tumor, un ratón tuvo un tumor muy pequeño (que, después de un retraso significativo, eventualmente dejó de crecer) y un ratón quedó sin tumor. Para el grupo H en el día 27, 8 ratones alcanzaron el criterio de valoración del tumor y 2 quedaron sin tumor.

La Figura 28 muestra que el volumen tumoral medio medido el día 10 fue de aproximadamente 1250 mm³ para el grupo de control de IgG; aproximadamente 470 mm³ para el grupo con el anticuerpo de PD-1 con la IgG del control; aproximadamente 290 mm³ para el grupo con el anticuerpo de CTLA-4 con la IgG del control (medido el día 6); aproximadamente 40 mm³ para el grupo de combinación del anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (10 mg/kg) y anticuerpo dirigido contra PD-1 (10 mg/kg); aproximadamente 165 mm³ para el grupo de combinación del anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (3 mg/kg) y anticuerpo dirigido contra PD-1 (3 mg/kg); y aproximadamente 400 mm³ para el grupo de combinación del anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (1 mg/kg) y anticuerpo dirigido contra PD-1 (1 mg/kg). La Figura 29 muestra que la mediana del volumen tumoral medido el día 13 fue de aproximadamente 1680 mm³ para el grupo de la IgG del control; aproximadamente 400 mm³ para el grupo con el anticuerpo de PD-1 con la IgG del control; aproximadamente 660 mm³ para el grupo con el anticuerpo de CTLA-4 con la IgG del control; 0 mm³ para el grupo de combinación del anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (10 mg/kg) y anticuerpo dirigido contra PD-1 (10 mg/kg); aproximadamente 90 mm³ para el grupo de combinación del anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (3 mg/kg) y anticuerpo dirigido contra PD-1 (3 mg/kg); y aproximadamente 650 mm³ para el grupo de combinación del anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (1 mg/kg) y anticuerpo dirigido contra PD-1 (1 mg/kg). Para el grupo de combinación del anticuerpo dirigido contra PD-1 con el anticuerpo dirigido contra CTLA-4, el número de ratones por grupo que quedaron sin tumor en el día 27 del estudio fue 8/10 (10 mg/kg), 2/10 (3 mg/kg) y 1/10 (1 mg/kg) (no se muestran los datos).

Este estudio indica que, en un modelo de tumor murino, el tratamiento con la combinación del anticuerpo de CTLA-4 y el anticuerpo de PD-1 funciona de una forma dependiente de la dosis y tiene un efecto significativamente mayor sobre el crecimiento tumoral que cualquiera de los anticuerpos en solitario, incluso a una dosis menor e incluso cuando el tumor ya estaba bien establecido. Además, los anticuerpos se pueden administrar secuencialmente (anticuerpo dirigido contra CTLA-4 primero y anticuerpo dirigido contra PD-1 después, o viceversa) y la combinación sigue siendo superior a las monoterapias con anticuerpo.

Ejemplo 16: Eficacia de un tratamiento combinado *in vivo* (anticuerpos anti-CTLA-4 y anti-PD-1) sobre el establecimiento y el crecimiento del fibrosarcoma

Células de fibrosarcoma SA1/N (PD-1F) (Leach *et al.* (1996) *Science* 271:1734-1736) se implantaron por vía

subcutánea en ratones A/J (2×10^6 células/ratón) el día 0. Los días 1, 4, 7 y 11 después del implante, los ratones se inyectaron EP de la siguiente forma: Grupo (A) PBS en solitario (denominado como el “vehículo”); Grupo (B) IgG de ratón (control, 10 mg/kg por ratón), Grupo (C) anticuerpo monoclonal anti-PD-1 4H2 (10 mg/kg por ratón), Grupo (D) anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 9D9 (10 mg/kg o 0,2 mg/kg por ratón), y Grupo (E) anticuerpo monoclonal anti-PD-1 4H2 (10 mg/kg por ratón) combinado con el anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 9D9 (0,2 mg/kg por ratón). El estudio duró 41 días, y las mediciones del tumor se tomaron en varios días durante el ciclo del estudio (véase la Figura 29). El volumen se calculó midiendo los tumores en tres dimensiones (alto x ancho x largo) usando un calibre electrónico. Los ratones se sometieron a eutanasia cuando los ratones alcanzaron un criterio de valoración del tumor determinado -un volumen de 1500 mm^3 y/o un tumor ulcerado.

Las Figuras 30A y 30B muestran que 19 de 20 ratones del control (9/10 en el Grupo A y 10/10 en el Grupo B) bien habían alcanzado un criterio de valoración del tumor o habían desarrollado tumores ulcerados. La Figura 30C muestra que el grupo tratado con 10 mg/kg de anticuerpo dirigido contra PD-1 (Grupo C) tuvo 6 ratones que alcanzaron un criterio de valoración del tumor (2 con un volumen mayor de 1500 mm^3 y 4 con un tumor ulcerado) and 4 ratones que quedaron sin tumor. La Figura 30D muestra que el grupo tratado con 10 mg/kg de anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (Grupo D) tuvo 5 ratones que alcanzaron un criterio de valoración del tumor (2 con un volumen mayor de 1500 mm^3 y 3 con un tumor ulcerado), un ratón con un tumor pequeño (volumen de aproximadamente 70 mm^3) y 4 ratones que quedaron sin tumor. La Figura 30E muestra que el grupo tratado con 0,2 mg/kg de anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (Grupo E) tuvo 10 ratones que alcanzaron un criterio de valoración del tumor (6 con un volumen mayor de 1500 mm^3 y 4 con un tumor ulcerado). La Figura 30F muestra que el grupo tratado con una combinación de 10 mg/kg de anticuerpo dirigido contra PD-1 con 0,2 mg/kg de anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (Grupo F) tuvo 2 ratones que alcanzaron un criterio de valoración del tumor (uno con un volumen mayor de 1500 mm^3 y uno con un tumor ulcerado) y 8 ratones que quedaron sin tumor.

Las Figuras 31 y 32 muestran la media y la mediana del volumen tumoral, respectivamente, que se desarrollaron en ratones tratados y no tratados durante el curso de este estudio. La inhibición del crecimiento tumoral en los ratones tratados con estos anticuerpos, en comparación con los ratones tratados con el anticuerpo de IgG de ratón del control, se resume en la Tabla 6.

Tabla 6. Inhibición del crecimiento tumoral y ratones sin tumor después del tratamiento con anti-PD-1 y/o anti-CTLA-

4

Grupo [†]	Mediana del volumen tumoral - mm^3 (Día 15)	TGI* (%) (Día 15)	Mediana del volumen tumoral - mm^3 (Día 19)	TGI (%) (Día 19)	N.º de ratones sin tumor (Día 41)
A	985	-	1140	-	0/10
B	635	-	1060	-	0/10
C	465	27	310	71	4/10
D	235	63	90	91	4/10
E	600	6	805	24	0/10
F	330	48	90	92	8/10

* TGI = inhibición del crecimiento tumoral; la mediana solo se pudo calcular cuando menos del 50 % de los ratones alcanzó el criterio de valoración del tumor.

[†] Los Grupos son como se han definido en la Figura 30. A = vehículo (PBS); B = IgG de ratón; C = anti-PD-1, 10 mg/kg; D = anti-CTLA-4, 10 mg/kg; E = anti-CTLA-4, 0,2 mg/kg; y F = anti-PD-1, 10 mg/kg con anti-CTLA-4, 0,2 mg/kg.

Estos datos indican además que el tratamiento combinado que comprende anticuerpos contra PD-1 y contra CTLA-4 es sustancialmente más eficaz que el tratamiento con cualquiera de los anticuerpos en solitario. De hecho, la combinación sigue siendo más eficaz que los tratamientos con los anticuerpos individuales incluso cuando el tratamiento combinado contenga una dosis subterapéutica del anticuerpo dirigido contra CTLA-4. Estos datos también indican que, sorprendentemente, la presencia o ausencia de PD-L1 en el tumor puede no tener efectos sobre la eficacia del tratamiento con esta combinación de anticuerpos, aunque la presencia de PD-L1 puede alterar el efecto de las monoterapias con anticuerpo ya que la expresión de PD-L1 en el tumor puede también llevar a la inhibición de las respuestas de los linfocitos T antitumorales (véase la Figura 40).

Ejemplo 17: Eficacia y escalado de dosis de un tratamiento combinado *in vivo* (anticuerpos anti-CTLA-4 y anti-PD-1) sobre el crecimiento de fibrosarcoma PD-L1

Células de fibrosarcoma SA1/N (PD-1) se implantaron por vía subcutánea en ratones A/J (2×10^6 células/ratón) el día 0 durante un tiempo suficiente (aproximadamente 7 días) para permitir el establecimiento del tumor. Los días 7, 10, 13 y 16 después del implante, diez grupos de 8 ratones que tenían un volumen tumoral promedio de 110 mm^3 recibieron una inyección IP de la siguiente forma: Grupo (A) PBS en solitario (denominado como el

“vehículo”); Grupo (B) IgG de ratón (control, 10 mg/kg por ratón); Grupo (C) anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 9D9 (0,25 mg/kg); Grupo (D) anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 9D9 (0,5 mg/kg por ratón); Grupo (E) anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 9D9 (5 mg/kg); Grupo (F) anticuerpo monoclonal anti-PD-1 4H2 (3 mg/kg por ratón); Grupo (G) anticuerpo monoclonal anti-PD-1 4H2 (10 mg/kg por ratón); Grupo (H) anticuerpo monoclonal anti-PD-1 4H2 (10 mg/kg por ratón) en combinación con anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 9D9 (0,25 mg/kg por ratón); Grupo (I) anticuerpo monoclonal anti-PD-1 4H2 (10 mg/kg por ratón) en combinación con anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 9D9 (0,5 mg/kg por ratón); y Grupo (J) anticuerpo monoclonal anti-PD-1 4H2 (3 mg/kg por ratón) en combinación con anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 9D9 (0,5 mg/kg por ratón).

Los días 10, 13, 16 y 19 después del implante, dos grupos de 6 ratones que tenían un volumen tumoral promedio de 255 mm³ recibieron una inyección IP de la siguiente forma: Grupo (K) IgG de ratón (control, 10 mg/kg por ratón); y Grupo (L) anticuerpo monoclonal anti-PD-1 4H2 (10 mg/kg por ratón) en combinación con anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 9D9 (1 mg/kg por ratón). El estudio duró 51 días, y las mediciones del tumor se tomaron en varios días durante el ciclo del estudio (véanse las Figuras 33-38). El volumen se calculó midiendo los tumores en tres dimensiones (alto x ancho x largo) usando un calibre electrónico. Los ratones se sometieron a eutanasia cuando los ratones alcanzaron un criterio de valoración del tumor determinado -un volumen de 1500 mm³ y/o un tumor ulcerado.

La Figura 33 muestra la respuesta al tratamiento con anticuerpo estimulador en ratones con tumores que tienen un volumen inicial de aproximadamente 110 mm³ (es decir, en el momento del tratamiento con el primer anticuerpo. Las Figuras 33 A y 33B muestran que los 16 ratones del control (Grupos A y B) alcanzaron un criterio de valoración del tumor (15 con un volumen del tumor mayor de 1500 mm³ y 1 con un tumor ulcerado). Las figuras 33C-33E muestran que los ratones que tienen tumores respondieron al tratamiento con el anticuerpo dirigido contra CTLA-4 de una manera dependiente de la dosis (por ejemplo, el Grupo C que recibe 0,25 mg/kg tuvieron 7/8 ratones que alcanzaron un criterio de valoración del tumor con un volumen tumoral menor de 200 mm³, mientras que el Grupo E que recibe 5 mg/kg tuvo 6/8 ratones que alcanzaron el criterio de valoración del tumor y dos ratones quedaron sin tumor). Las Figuras 33F y 33G muestran que los ratones respondieron aproximadamente igual independientemente de la dosis del anticuerpo dirigido contra PD-1 (el Grupo F recibió 3 mg/kg y el Grupo G recibió 10 mg/kg). Por el contrario, los ratones que recibieron un tratamiento combinado de 10 o 3 mg/kg de anticuerpo dirigido contra PD-1 con 0,25 o 0,5 mg/kg de anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (Grupos H, I y J) mostró una reducción significativa en el crecimiento tumoral. Por ejemplo, La Figura 33J muestra que el grupo tratado con una combinación de 3 mg/kg de anticuerpo dirigido contra PD-1 con 0,5 mg/kg de anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (Grupo J) tuvo 2 ratones que tuvieron tumores ulcerados, 2 ratones con un volumen tumoral menor de 500 mm³, y 4 ratones que quedaron sin tumor. El inesperado efecto sinérgico de un anticuerpo dirigido contra PD-1 combinado con un anticuerpo dirigido contra CTLA-4, junto con la sorprendente eficacia de los niveles subterapéuticos del anticuerpo dirigido contra CTLA-4 en la combinación, se muestran en las Figuras 34 (volumen tumoral medio) y 35 (mediana del volumen tumoral).

La Figura 36 muestra la respuesta al tratamiento con anticuerpo inmunoestimulador en ratones con tumores más grandes, aquellos que tienen un volumen inicial de aproximadamente 250 mm³ (es decir, en el momento del tratamiento con el primer anticuerpo). La Figura 36A muestra que los 6 ratones del control (Grupo K) alcanzaron un criterio de valoración del tumor (4 con un volumen tumoral mayor de 1500 mm³ y 2 con un tumor ulcerado). La Figura 36B muestra que el grupo tratado con una combinación de 10 mg/kg de anticuerpo dirigido contra PD-1 con 1 mg/kg de anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (Grupo L) tuvo un ratón con un tumor ulcerado, 4 ratones con un volumen tumoral mayor de 1500 mm³, y un ratón quedó sin tumor. La media y la mediana de los volúmenes tumorales se muestran en las Figuras 37 y 38.

La inhibición del crecimiento tumoral en los ratones tratados con estos anticuerpos, en comparación con los ratones tratados con el anticuerpo de IgG de ratón del control, se resume en la Tabla 7 y la Figura 39.

Tabla 7. Inhibición del crecimiento tumoral después del tratamiento con anti-PD-1 y/o anti-CTLA-4

Grupo	Volumen tumoral medio - mm ³ (Día 23)	TGI* (Media)	Mediana del volumen tumoral - mm ³ (Día 23)	TGI (Mediana)	Ratones sin tumor (Día 51)	N.º de ratones en el criterio de valoración tumoral
A	700	-	1.380	-	-	-
B	1.710	-	1.360	-	-	-
C	1.050	39 %	925	32	-	-
D	770	55 %	505	63	-	-
E	155	91 %	100	93	2/8	6/8
F	1.050	39 %	675	50	-	7/8
G	1.070	37 %	1.145	16	-	6/8

50

(continuación)

Grupo	Volumen tumoral medio - mm ³ (Día 23)	TGI* (Media)	Mediana del volumen tumoral - mm ³ (Día 23)	TGI (Mediana)	Ratones sin tumor (Día 51)	N.º de ratones en el criterio de valoración tumoral
H	85	95 %	25	98	4/8	3/8
I	75	96 %	60	95	4/8	1/8
J	80	95 %	5	99	4/8	0/8
K	1.900	-	2.125	-	-	-
L	1.115	41	1.090	49	1/6	-

* TGI = inhibición del crecimiento tumoral; la mediana solo se pudo calcular cuando menos del 50 % de los ratones alcanzó el criterio de valoración del tumor.

† Los Grupos son como se han definido en las Figuras 33 y 36. Para un tumor inicial más pequeño: A = vehículo (PBS); B = IgG de ratón, 10 mg/kg; C = anti-CTLA-4, 0,25 mg/kg; D = anti-CTLA-4, 0,5 mg/kg; E = anti-CTLA-4, 5 mg/kg; F = anti-PD-1, 3 mg/kg; G = anti-PD-1, 10 mg/kg; H = anti-PD-1, 10 mg/kg con anti-CTLA-4, 0,25 mg/kg; I = anti-PD-1, 10 mg/kg con anti-CTLA-4, 0,5 mg/kg; y J = anti-PD-1, 3 mg/kg con anti-CTLA-4, 0,5 mg/kg. Para un tumor inicial más grande: K = IgG de ratón, 10 mg/kg; y L = anti-PD-1, 10 mg/kg con anti-CTLA-4, 0,25 mg/kg.

En su conjunto, estos datos indican que el tratamiento combinado que comprende anticuerpos contra PD-1 y contra CTLA-4 es sustancialmente más eficaz que el tratamiento con cualquiera de los anticuerpos en solitario. Además, sorprendentemente, la dosis de cada anticuerpo se puede reducir sin afectar la eficacia sinérgica de esta combinación de anticuerpos terapéuticos inmunoestimuladores. La terapia de combinación parece seguir siendo eficaz incluso cuando la masa tumoral es más madura (es decir, más grande).

Ejemplo 18: Inmunidad tumoral en ratones después del tratamiento con anticuerpo dirigido contra PD-1 y reestimulación con células de fibrosarcoma PD-L1⁺

Los ratones que sobrevivieron sin tumores a un estímulo con células tumorales y al tratamiento con el anticuerpo dirigido contra PD-1 (es decir, un tratamiento similar a los estudios de eficacia descritos en los Ejemplos 5 y 6) se volvieron a estimular después con células tumorales para investigar la inmunidad a la formación de tumores después de un tratamiento de ese tipo. En resumen, en el estímulo inicial, células de fibrosarcoma SA1/N (PD-L1⁺) se implantaron por vía subcutánea en ratones A/J (1×10^6 células/ratón) el día 0. Los días 1, 4, 7, 10, 14, 17 y 20 después del implante, grupos de ratones recibieron una inyección IB con uno de IgG de ratón (control, 10 mg/kg por ratón) o con una de las varias dosis del anticuerpo monoclonal anti-PD-1 4H2 (30, 10, 3, 1 y 0,3 mg/kg por ratón). La formación y el volumen de los tumores se comprobó con un calibre electrónico de precisión dos veces a la semana hasta completar el estudio. Un grupo de 8 ratones quedaron sin tumor después del tratamiento con el anticuerpo dirigido contra PD1 (4 que se trataron con 30 mg/kg, 2 con 3 mg/kg, uno con 1 mg/kg, y uno con 0,3 mg/kg).

Los ocho ratones A/J tratados sin tumores se volvieron a estimular mediante implante subcutáneo de 1×10^6 células de fibrosarcoma SA1/N por ratón. Como control, nueve ratones no expuestos a tratamiento recibieron un implante subcutáneo de 1×10^6 células de fibrosarcoma SA1/N por ratón. La formación y el volumen de los tumores se comprobó con un calibre electrónico de precisión dos veces a la semana hasta el día 62 después del implante. Todos los ratones no expuestos al tratamiento (control) alcanzaron el criterio de valoración del tumor en el día 22 después del implante de las células de fibrosarcoma. Por el contrario, los ocho ratones sin tumor vueltos a estimular con células de fibrosarcoma no desarrollaron tumores hasta 62 días después del implante. La Figura 47 muestra el volumen tumoral medio de los ratones sin tratar y reestimulados. Estos resultados demuestran que el tratamiento con un anticuerpo inmunoestimulador, tal como el anti-PD-1, proporciona a los sujetos tratados inmunidad contra la formación de tumores adicionales, incluso en presencia de células capaces de formar un tumor.

Ejemplo 19: Inmunidad tumoral en ratones después de un tratamiento con un único anticuerpo (anti-PD-1) o el tratamiento combinado de anticuerpos (anti-CTLA-4 y anti-PD-1) reestimulados con células de cáncer colorrectal PD-L1⁺

Los ratones que sobrevivieron sin tumores a un estímulo con células tumorales y al tratamiento con uno cualquiera de anticuerpo dirigido contra PD-1 en solitario o anticuerpo dirigido contra PD-1 combinado con anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (es decir, un tratamiento similar a los estudios de eficacia descritos en los Ejemplos 2-4) se volvieron a estimular después con células tumorales para investigar la inmunidad a la formación de tumores después de dichos tratamientos. En resumen, en el estímulo inicial, célula de cáncer colorrectal MC38 (PD-L1⁺) se implantaron en ratones C57BL/6 (2×10^6 células/ratón) el día 0. Los días 0, 3, 6 y 10 después del implante, los grupos de ratones recibieron una inyección IP con uno de los siguientes tratamientos: (1) IgG de ratón (control, 10 mg/kg por ratón), anticuerpo monoclonal anti-PD-1 4H2, o (3) anticuerpo monoclonal anti-PD-1 4H2 en combinación con anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 9D9. El crecimiento del tumor se controló con un calibre electrónico de precisión como se

describe en el Ejemplo 15. Un grupo de 11 ratones quedaron sin tumor después del tratamiento con el anticuerpo dirigido contra PD1 (2 total) o la combinación de anticuerpo anti-PD1/anti-CTLA-4 (9 total).

5 Los 11 ratones C57BL/6 tratados sin tumores se volvieron a estimular por implante de 2×10^7 células de cáncer colorrectal MC38 por ratón (es decir, una dosis de células 10 x mayor que el estímulo inicial). Como control, siete ratones no expuestos a tratamiento recibieron un implante con 2×10^7 células de cáncer colorrectal MC38 por ratón. La formación y el volumen tumoral se controló con un calibre electrónico de precisión para la duración del experimento de reestímulo (al menos 20 días). La Figura 48 muestra que los siete ratones no expuestos a tratamiento (control) desarrollaron un tumor y alcanzaron el criterio de valoración del tumor en el día 18 posterior al implante de las células de cáncer colorrectal. Por el contrario, los 11 ratones sin tumor vueltos a estimular con células de cáncer colorrectal no desarrollaron tumores hasta 18 días después del implante.

10 La Figura 49 muestra el volumen tumoral medio de los ratones sin tratar y reestimulados. Estos datos indican que, análogamente a la monoterapia con anticuerpos, el tratamiento combinado con anticuerpos que produce el bloqueo de PD-1 y CTLA-4 produce una inmunidad persistente a la recidiva del tumor.

Ejemplo 20: Eficacia de un tratamiento combinado *in Vivo* (anticuerpos anti-CTLA-4 y anti-PD-1) sobre el crecimiento del tumor establecido

20 Células de cáncer colorrectal CT26 se implantaron en ratones BALB/C (2×10^6 células/ratón) durante un tiempo suficiente (aproximadamente 10 días) para permitir la formación de tumores. En el día 10 después del implante, se realizaron mediciones del tumor, y los ratones se aleatorizados en función del volumen tumoral medio (aproximadamente 250 mm^3) en 5 grupos para la posterior terapia con anticuerpos. El día 0 (es decir, 10 días después de implantar las células CT26), los ratones recibieron por inyección IP (1) IgG de ratón (control), (2) anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 9D9, (3) anticuerpo monoclonal anti-PD-1 4H2, o (4) anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 9D9 y anticuerpo monoclonal anti-PD-1 4H2, a una concentración de 10 mg/kg por ratón. Las inyecciones de anticuerpos también se administraron los días 3, 6 y 10. Las composiciones de anticuerpos monoclonales usados tuvieron bajos niveles de endotoxina y no se agregaron significativamente. Usando un calibre electrónico, los tumores se midieron tridimensionalmente (alto x ancho x longitud) y se calculó el volumen tumoral. Las mediciones del tumor se tomaron el día 0 (los tumores al principio del tratamiento tuvieron un volumen de aproximadamente 125 mm^3), y los días 3, 6, 10, 13, 17 y 20 después de la inyección del anticuerpo. Los ratones se sometieron a eutanasia cuando los ratones alcanzaron un criterio de valoración del tumor determinado (un volumen del tumor en particular de 1500 mm^3 y/o cuando los ratones mostraron una pérdida de peso superior a aproximadamente un 15 %). En la Figura 50 se muestran los resultados. Este estudio indica que, en un modelo de tumor murino, el tratamiento con la combinación de anticuerpo de CTLA-4 y anticuerpo de PD-1 tuvo un efecto significativamente mayor sobre el crecimiento tumoral que cualquiera de los anticuerpos en solitario, incluso cuando el tumor ya estaba bien establecido.

Ejemplo 21: Efecto del anticuerpo dirigido contra PD-1 humana sobre la función de los linfocitos T reguladores

40 Los linfocitos T reguladores son linfocitos que suprimen la respuesta inmunitaria. En este ejemplo, Los linfocitos T reguladores se ensayaron para su función inhibitora sobre la proliferación y la secreción de IFN-gamma sobre los linfocitos T CD4+CD25 en presencia o ausencia de un anticuerpo monoclonal humano dirigido contra PD-1.

45 Los linfocitos T reguladores se purificaron a partir de PBMC utilizando el kit de aislamiento de linfocitos T reguladores CD4+CD25+ (Miltenyi Biotec). Se añadieron linfocitos T reguladores a una reacción de linfocitos mixtos (véase anteriormente) que contenía linfocitos T CD4+CD25- y células dendríticas alogénicas en una relación 2:1 de CD4+CD25- a linfocitos T reguladores. Se añadió el anticuerpo monoclonal dirigido contra PD-1 5C4 a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$. Como control negativo, se usó bien nada de anticuerpo, o un anticuerpos control de isotipo. Se recogieron los sobrenadantes del cultivo en el día 5 para la medición de las citoquinas utilizando un sistema de detección de citoquinas Beadlyte (Upstate). Las células se marcaron con ^3H -timidina, se cultivaron durante 18 horas más, y se analizaron para determinar la proliferación celular. Los resultados se muestran en las Figuras 51A (proliferación de linfocitos T) y 51B (secreción de IFN-gamma). La adición de anticuerpo monoclonal humano dirigido contra PD-1 5C4 liberó parcialmente la inhibición impuesta por los linfocitos Treg sobre la proliferación y secreción de IFN-gamma de linfocitos T CD4+CD25-, lo que indica que los anticuerpo dirigidos contra PD-1 tienen un efecto sobre los linfocitos T reguladores.

Ejemplo 22: Efecto de anticuerpo humano dirigido contra PD-1 sobre la activación de los linfocitos T

60 En este ejemplo, se examinó el efecto del bloqueo de la ruta PD-1 por el anticuerpo 5C4 dirigido contra PD-1 sobre la activación de los linfocitos T. Los linfocitos T CD4+ humanos purificados (kit de purificación de linfocitos T CD4 Dynal) se activaron con 1 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo soluble dirigido contra CD3 (BD) en presencia de monocitos autólogos o células dendríticas derivadas de monocitos (DC). Se purificaron los monocitos usando el kit de purificación de monocitos CD14 de Milteni, y se generaron DC *in vitro* después del cultivo de monocitos con GM-CSF e IL-4 (PeproTech) durante 7 días. Después de tres días de activación en presencia o ausencia de anticuerpo dirigido

contra PD-1 o mAAb del control de isotipo irrelevante, se recogieron los sobrenadantes del cultivo para el análisis ELISA de la secreción de IFN γ a la vez que se añadió timidina tritiada durante las 18 horas finales del ensayo para medir la proliferación de linfocitos T. Los resultados que se muestran en las Figuras 52A y 52B demuestran que el bloqueo de PD-1 por el anticuerpo dirigido contra PD-1 dio como resultado una proliferación de linfocitos T y secreción de IFN- γ potenciadas. Se observó también el efecto sinérgico por el anticuerpo dirigido contra PD-1 y el anticuerpo dirigido contra CTLA-4 sobre la activación de linfocitos T (específicamente, sobre la secreción de IFN- γ) en presencia de monocitos.

Ejemplo 23: Evaluación de la actividad ADCC de los anticuerpos dirigidos contra PD-1

En este ejemplo, se llevó a cabo un ensayo de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) para evaluar si el anticuerpo dirigido contra PD-1 podría inducir ADCC en las células dianas. Dos versiones de 5C4, una con una región Fc de IgG1 humana (5C4IgG1) y la otra con una región Fc de la IgG4 humana (5C4-IgG4), se ensayaron en la evaluación. Se usó el Kit de citotoxicidad celular Delfia de Perkin Elmer para el ensayo. En resumen, los linfocitos T CD4 humanos purificados (kit de purificación de linfocitos T CD4 Dynal) se activaron mediante anticuerpos dirigidos contra CD3 unidos a placa (BD) para inducir la expresión de PD-1. Los linfocitos T CD4 activados diana se marcaron a continuación con reactivo BATDA. Los linfocitos T CD4 marcados se añadieron a las placa de 96 pocillos de fondo en V, seguido por la adición de PBMC humana (un efector para la relación de la célula diana (ER/T) de 50:1) y un anticuerpo diseñado. Tras la incubación durante 1 hora a 37 °C, la placa se centrifugó. El sobrenadante se transfirió a una placa de 96 pocillos de fondo plano y se leyó la placa usando un lector de placas RubyStar. Los resultados mostraron que 5C4-IgG4 no mediaba ADCC en los linfocitos T CD4 activados, mientras que 5C4IgG1 media ADCC en los linfocitos T CD4 activados (Figura 53) indicando que la actividad de ADCC está relacionada con su región Fc del anticuerpo dirigido contra PD-1.

Ejemplo 24: Evaluación de la citotoxicidad dependiente del complemento del anticuerpo dirigido contra PD-1

En este ejemplo, se examinó la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo dirigido contra PD-1. Dos versiones de 5C4, una con una región Fc de IgG1 humana (5C4IgG1) y la otra con una región Fc de la IgG4 humana (5C4-IgG4), se ensayaron en la evaluación. En resumen, los linfocitos T CD4 humanos purificados (kit de purificación de linfocitos T CD4 Dynal) se activaron mediante anticuerpos dirigidos contra CD3 unidos a placa (BD) para inducir la expresión de PD-1. Se sometieron a ensayo diluciones en serie del anticuerpo contra PD-1 (5C4) y anticuerpos del control desde 50 μ g/ml a 640 pg/ml para CDC en presencia del complemento humano (Quidel-A113). Se usó azul Alamar (Biosource International) para medir la citotoxicidad. La placa se leyó en un lector de placas fluorescente (EX530 EM590). Los recuentos de células viables son proporcionales a las unidades fluorescentes. Los resultados mostraron que ni 5C4-IgG1 ni 5C4-IgG4 mediaban CDC en los linfocitos T CD4 activados, mientras que el anticuerpo del control positivo sí (anticuerpo dirigido contra HLA-ABC (Figura 54).

Ejemplo 25: Evaluación de la expresión de PD-1 en linfocitos T humanos

En este ejemplo, se examinaron PBMC humanas procedentes de diferentes donantes para la expresión de PD-1 en diversos subconjuntos de células mediante FACS. Se usó en esta evaluación anticuerpo dirigido contra PD-1 biotinilado, que ha presentado una sensibilidad mucho mayor que el anticuerpo dirigido contra PD-1 comercialmente disponible en la detección de moléculas de PD-1 sobre la superficie celular. El anticuerpo unido se detectó usando una estreptavidina conjugada con PE. Los análisis de citometría de flujo se realizaron con un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson) y el programa informático Flowjo (Tree Star). Se detectó la expresión de PD-1 en algunos linfocitos T periféricos humanos, pero no en linfocitos B o monocitos. El examen adicional de los subconjuntos de linfocitos T indica que PD-1 se expresa en linfocitos T CD4 y en linfocitos T CD8 con memoria y en linfocitos T efectoras, pero está ausente en linfocitos T CD4 o CD8 no expuestos anteriormente a tratamiento.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Medarex, Inc.

<110> Ono Pharmaceutical Co., LTD.

<120> ANTICUERPOS MONOCLONALES HUMANOS CONTRA MUERTE PROGRAMADA 1 (PD-1) Y MÉTODOS PARA TRATAR EL CÁNCER USANDO ANTICUERPOS DIRIGIDOS CONTRA PD-1 SOLOS O JUNTO CON OTRAS SUSTANCIAS INMUNOTERAPÉUTICAS

<130> GE0P-50

<150> US 60/679.466

<151> 09/05/2005

<150> US 60/738.434

<151> 21/11/2005

ES 2 720 160 T3

<150> US 60/748.919
<151> 08/12/2005

<160> 74

5

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1
<211> 113
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 1

```

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

15

<210> 2
<211> 113
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 2

```

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

25

<210> 3
<211> 113
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30

<400> 3

ES 2 720 160 T3

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

5 <210> 4
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 4

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

15 <210> 5
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

ES 2 720 160 T3

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

<210> 6
 <211> 113
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 6

Gln 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 Thr Thr Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Phe His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asp 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
 Val Thr Gly Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser

10
 <210> 7
 <211> 121
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 7

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

20

ES 2 720 160 T3

```

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

```

5 <210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

```

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

```

10 <210> 9
 <211> 107
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

```

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

```

ES 2 720 160 T3

<210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 10

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

10 <210> 11
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 11

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

20 <210> 12
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 12

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

ES 2 720 160 T3

35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Arg 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 Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 13
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

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

10 <210> 14
 <211> 107
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

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 Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser 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 Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

20 <210> 15
 <211> 5

ES 2 720 160 T3

	<212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>		
5	<400> 15	Asn Tyr Gly Met His	1 5
10	<210> 16 <211> 5 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 16	Asn Tyr Gly Phe His	1 5
15			
20	<210> 17 <211> 5 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 17	Asn Tyr Gly Met His	1 5
25			
30	<210> 18 <211> 5 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 18	Asn Ser Gly Met His	1 5
35			
40	<210> 19 <211> 7 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 19	Arg Ser Ser Phe Phe Trp Gly	1 5
45			
50	<210> 20 <211> 5 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 20	Ser Tyr Gly Phe His	1 5
55			
	<210> 21 <211> 7 <212> PRT		

ES 2 720 160 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 21

5 Arg Ser Ser Tyr Phe Trp Gly
1 5

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 22

15 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 23

25 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 24

35 Leu Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 25

40 <211> 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 25

45 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 26

50 <211> 16

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 26

ES 2 720 160 T3

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

5 <210> 27
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 27

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

10
 15 <210> 28
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 28

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

20
 25 <210> 29
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 29

Asn Asp Asp Tyr
 1

30 <210> 30
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 30

Gly Asp Asp Tyr
 1

40 <210> 31
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 31

Asn Val Asp His
 1

50 <210> 32
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 720 160 T3

<400> 32

Asn Asp Asp Tyr
1

5 <210> 33
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 33

Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asp Glu Asp Tyr
1 5 10

15 <210> 34
<211> 4
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 34

Gly Asp Asp Tyr
1

25 <210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 35

30 Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asp Glu Asp Tyr
1 5 10

35 <210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 36

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

40 <210> 37
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 37

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

50 <210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 720 160 T3

<400> 38

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

5 <210> 39
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 39

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

15 <210> 40
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 40

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

25 <210> 41
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 41

30 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

35 <210> 42
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 42

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

40 <210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 43

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

50 <210> 44
<211> 7
<212> PRT

ES 2 720 160 T3

	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 44	
5		Asp Thr Ser Asn Arg Ala Thr 1 5
	<210> 45	
	<211> 7	
10	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 45	
15		Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr 1 5
	<210> 46	
	<211> 7	
	<212> PRT	
20	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 46	
25		Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr 1 5
	<210> 47	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 47	
35		Ala Ala Ser Asn Leu Arg Ser 1 5
	<210> 48	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 48	
45		Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr 1 5
	<210> 49	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 49	
50		Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser 1 5
	<210> 50	
	<211> 9	
	<212> PRT	
55	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 720 160 T3

<400> 50

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

5 <210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 51

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

15 <210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 52

Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg Thr
1 5

25 <210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 53

Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg Thr
1 5

30 <210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 54

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg Thr
1 5

40 <210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 55

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

50 <210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 720 160 T3

<400> 56

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg Thr
 1 5

5 <210> 57
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (339)

15 <400> 57

cag gtc cag ctg gtc gag tct ggg gga gac gtc gtc cag cct ggg ggg	48
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Val Val Gln Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
tcc ctg aga ctc tcc tgt gca ggc tct gga gtc gcc ttc agt aac tat	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ala Phe Ser Asn Tyr	
20 25 30	
ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct ccc ggc aag ggg ctg gag tgg gtc	144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
gca gtt atc tgg tat gat gga agt aat aaa tac tat gca gac tcc gtc	192
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	
aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac atg ctc tat	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Met Leu Tyr	
65 70 75 80	
ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct atg tat tac tgt	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gcg agg aac gat gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc	336
Ala Arg Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser	
100 105 110	
tca	339
Ser	

20 <210> 58
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

25 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (339)

30 <400> 58

ES 2 720 160 T3

cag gtc cag ctg gtg gaa tct ggg gga gac gtg gtc cag cct ggg agg	48
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Val Val Gln Pro Gly Arg	
1 5 10 15	
tcc ctg aga ctc tcc tgt gca ggc tct gga tta acc ttc act aac tat	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Thr Asn Tyr	
20 25 30	
ggc ttc cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg	144
Gly Phe His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
gct gtt ata tgg tat gat gga agt aag aaa tat tat gca gac tcc gtg	192
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	
aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
65 70 75 80	
ctg caa atg aac aac ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt	288
Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gcg act ggg gat gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc	336
Ala Thr Gly Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser	
100 105 110	
tca	339
Ser	

5 <210> 59
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (339)

<400> 59

ES 2 720 160 T3

cag gtg tac ttg gta gag tot ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg	48
Gln Val Tyr Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
1 5 10 15	
tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tot gga ttc acc ttc agt aac tat	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr	
20 25 30	
ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg	144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
gca ctt ata tgg tat gat gga agt aat aaa tac tat gca gac tcc gtg	192
Ala Leu Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	
aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
65 70 75 80	
ctg caa atg acc agt ctg aga gtc gag gac acg gct gtg tat tat tgt	288
Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gcg agc aac gtt gac cat tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc	336
Ala Ser Asn Val Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser	
100 105 110	
tca	339
Ser	

<210> 60
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (339)

10

<400> 60

cag gtg cag ctg gtg gag tot ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg	48
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
1 5 10 15	
tcc ctg aga ctc gac tgt aaa gcg tot gga atc acc ttc agt aac tct	96
Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser	
20 25 30	
ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg	144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	

15

ES 2 720 160 T3

gca gtt att tgg tat gat gga agt aaa aga tac tat gca gac tcc gtg 192
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg ttt 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg aca aac gac gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc 336
 Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

tca 339
 Ser

<210> 61
 <211> 363
 5 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1).. (363)

<400> 61

cag ctg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg gag 48
 Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc ctc agc agg agt 96
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser
 20 25 30

agt ttc ttc tgg ggc tgg atc cgt cag ccc cca ggg aag gga ctg gag 144
 Ser Phe Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

tgg att ggg agt atc tat tat agt ggg agc acc tac tac aac ccg tcc 192
 Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

ctc aag agt cga gtc acc ata tcc gta gac acg tcc aag aac cag ttc 240
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gcc gca gac acg gct gtg tat tac 288
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

tgt gtg aga gat tac gat att ttg act ggc gac gag gac tac tgg ggc 336
 Cys Val Arg Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asp Glu Asp Tyr Trp Gly

ES 2 720 160 T3

	100	105	110	
	cag gga acc ctg gtc acc gtg tcc tca			363
	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115	120		
5	<210> 62 <211> 339 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>			
10	<220> <221> CDS <222> (1).. (339)			
	<400> 62			
	cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg			48
	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg			
	1 5 10 15			
	tcc ctg aga ctc tcc tgt aca acg tct gga atc acc ttc agt agc tat			96
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ser Tyr			
	20 25 30			
	ggc ttt cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg			144
	Gly Phe His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35 40 45			
	gca gtg ata tgg tat gat gga agt aaa aaa tac tat gca gac tcc gtg			192
	Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
	50 55 60			
	aag ggc cga ttc acc ctc tcc aga gac gat tcc aag aac acg ctg tat			240
	Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
	65 70 75 80			
	ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt			288
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85 90 95			
	gtt act ggg gat gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc			336
	Val Thr Gly Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser			
	100 105 110			
15	tca Ser			339
20	<210> 63 <211> 363 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>			
25	<220> <221> CDS <222> (1).. (363)			
	<400> 63			

ES 2 720 160 T3

cag ctg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg gag 48
 Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

acc ctg tcc ctc acc tgc tct gtc tct ggt ggc tcc ctc agc agg agt 96
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser
 20 25 30

agt tac ttc tgg ggc tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag ggg ctg gag 144
 Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

tgg att gcg agt atc ttt tat agt ggg gaa acc tac ttc aat ccg tcc 192
 Trp Ile Ala Ser Ile Phe Tyr Ser Gly Glu Thr Tyr Phe Asn Pro Ser
 50 55 60

ctc aag agt cga gtc acc ata tcc gta gac acg tcc agg aac cag ttc 240
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Arg Asn Gln Phe
 65 70 75 80

tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gcc gca gac acg gct gtg tat tac 288
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

tgt gcg aga gat tac gat att ttg act ggc gac gag gac tac tgg ggc 336
 Cys Ala Arg Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asp Glu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca 363
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 64
 <211> 321
 5 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1).. (321)

<400> 64

gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc atc atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Ile Ile
 35 40 45

ES 2 720 160 T3

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg cct ctc 288
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
 85 90 95

act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 321
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 65
 <211> 321
 5 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1).. (321)

<400> 65

gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctg tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

tat gat aca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192
 Tyr Asp Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg cct ctc 288
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
 85 90 95

act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 321
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

15 <210> 66

ES 2 720 160 T3

<211> 324
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (321)

<400> 66

10 gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agt agt tac 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag agt agc aac tgg cct cgg 288
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
 85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 321
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

15 <210> 67
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (321)

<400> 67

ES 2 720 160 T3

gaa att gtg ttg aca cag tot cca gcc acc ctg tot ttg tot cca ggg 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

 gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agt agt tac 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

 tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144

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

 tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

 agt ggg tot ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

 gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag agt agc aac tgg cct ogg 288
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
 85 90 95

 acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 321
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 68
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (321)

15 <400> 68

ES 2 720 160 T3

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gtg gga	48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
1 5 10 15	
gac aga gtc tcc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg	96
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp	
20 25 30	
tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc	144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile	
35 40 45	
tat gct gca tcc aat tta cga agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc	192
Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct	240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
65 70 75 80	
gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat tat agt tac cct agg	288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg	
85 90 95	
acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa	321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
100 105	

5 <210> 69
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (321)

<400> 69

ES 2 720 160 T3

gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct gcc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

tat gat gca tcc aac agg gcc act gcc atc cca gcc agg ttc agt gcc 192
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg cct ctc 288
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
 85 90 95

act ttc gcc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 321
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 70
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (321)

<400> 70

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

15

ES 2 720 160 T3

	20	25	30	
tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc				144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile	35	40	45	
tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc				192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	50	55	60	
agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct				240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	65	70	75	80
gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat tat agt tac cct agg				288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg	85	90	95	
acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa				321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	100	105		

<210> 71
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 71

Gln 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
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser 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
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys																			
				85															90
Ala Arg																			95

10

<210> 72
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 72

ES 2 720 160 T3

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

50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro
 85 90 95

5 <210> 73
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 73

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

15 <210> 74
 <211> 95
 <212> PRT

20 <400> 74

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 Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser 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 Tyr Asn Ser Tyr Pro
 85 90 95

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a la proteína Muerte programada 1 (PD-1) humana y comprende una región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO:4 y una región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos que tienen la secuencia definida en la SEQ ID NO: 11; para su uso en un método para tratar un cáncer en un sujeto junto con un anticuerpo monoclonal, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a CTLA-4 humano.
2. El anticuerpo monoclonal dirigido contra PD-1 o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo monoclonal dirigido contra PD-1 o la porción de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo humano o una porción de unión a antígeno del mismo.
3. El anticuerpo monoclonal dirigido contra PD-1 o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un isotipo IgG1 o IgG4.
4. El anticuerpo monoclonal dirigido contra PD-1 o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde la porción de unión a antígeno se selecciona de un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fv o un fragmentos scFv.
5. El anticuerpo monoclonal dirigido contra PD-1 o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cáncer se selecciona de melanoma, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de pulmón.
6. El anticuerpo monoclonal dirigido contra PD-1 o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el cáncer se selecciona de cáncer óseo, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de testículo, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de la uretra, cáncer del pene, leucemias crónicas o agudas, incluyendo leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o del uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma hipofisario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de linfocitos T, cánceres inducidos ambientalmente incluyendo aquellos inducidos por amianto, y combinaciones de dichos cánceres.
7. El anticuerpo monoclonal dirigido contra PD-1 o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo dirigido contra PD-1 o la porción de unión a antígeno del mismo y/o el anticuerpo dirigido contra CTLA-4 o la porción de unión a antígeno del mismo, se administran a una dosis subterapéutica.
8. El anticuerpo monoclonal dirigido contra PD-1 o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo dirigido contra PD-1 o la porción de unión a antígeno del mismo y el anticuerpo dirigido contra CTLA-4 o la porción de unión a antígeno del mismo, se administran secuencialmente.
9. El anticuerpo monoclonal dirigido contra PD-1 o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde:
- (a) el anticuerpo dirigido contra PD-1 o la porción de unión a antígeno del mismo se administra antes del anticuerpo dirigido contra CTLA-4 o la porción de unión a antígeno del mismo; o
- (b) el anticuerpo dirigido contra CTLA-4 o la porción de unión a antígeno del mismo se administra antes del anticuerpo dirigido contra PD-1 o la porción de unión a antígeno del mismo.
10. El anticuerpo monoclonal dirigido contra PD-1 o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el anticuerpo dirigido contra PD-1 o la porción de unión a antígeno del mismo y el anticuerpo dirigido contra CTLA-4 o la porción de unión a antígeno del mismo se administran simultáneamente como composiciones independientes, con cada anticuerpo en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. El anticuerpo monoclonal dirigido contra PD-1 o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el anticuerpo dirigido contra PD-1 o la porción de unión a antígeno del mismo y el anticuerpo dirigido contra CTLA-4 o la porción de unión a antígeno del mismo se administran

simultáneamente en una única composición en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 5 12. El anticuerpo monoclonal dirigido contra PD-1 o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el sujeto es un ser humano.
- 10 13. El anticuerpo monoclonal dirigido contra PD-1 o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo monoclonal dirigido contra CTLA-4 o la porción de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo humano o una porción de unión a antígeno del mismo.
- 15 14. El anticuerpo monoclonal dirigido contra PD-1 o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el anticuerpo dirigido contra CTLA-4 o la porción de unión a antígeno del mismo es el anticuerpo monoclonal contra CTLA-4 humano 10D1.
- 20 15. Un anticuerpo monoclonal, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a CTLA-4 humano para su uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto en combinación con un anticuerpo monoclonal dirigido contra PD-1 humana o una porción de unión a antígeno del mismo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
16. El anticuerpo monoclonal dirigido contra PD-1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que es un isotipo IgG4.

Anti-PD1 17D8 VH

segmento V: 3-33
 segmento D: desconocido
 segmento J: JH4b

```

      Q V Q L V E S G G D V V Q P G G S L
1  CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GAC GTG GTC CAG CCT GGG GGG TCC CTG

                                     CDR1
      R L S C A A S G V A F S N Y G M H W
55 AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA GTC GCC TTC AGT AAC TAT GGC ATG CAC TGG

                                     CDR2
      V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D
109 GTC CGC CAG GCT CCC GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATC TGG TAT GAT

      CDR2
      G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R
163 GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC AGA

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

      CDR3
      T A M Y Y C A R N D D Y W G Q G T L
271 ACG GCT ATG TAT TAC TGT GCG AGG AAC GAT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG

      L → JH4b

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

Figura 1A

Anti-PD1 17D8 VK

segmento V: L6
segmento J: JK4

```

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

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

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

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

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

   CDR3
-----
271 R S N W P L T F G G G T K V E I K
   CGT AGC AAC TGG CCT CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

```



Figura 1B

Anti-PD-1 2D3 VH

segmento V: 3-33

segmento D: 7-27

segmento J: JH4b

```

1   Q V Q L V E S G G D V V Q P G R S L
   CAG GTG CAG CTG GTG GAA TCT GGG GGA GAC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                     CDR1
55  R L S C A A S G L T F T N Y G F H W
   AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTA ACC TTC ACT AAC TAT GGC TTC CAC TGG

                                     CDR2
109 V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D
   GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCT GTT ATA TGG TAT GAT

                                     CDR2
163 G S K K Y Y A D S V K G R F T I S R
   GGA AGT AAG AAA TAT TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

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

                                     CDR3
271 T A V Y Y C A T G D D Y W G Q G T L
   ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG ACT GGG GAT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG

325 V T V S S
   GTC ACC GTC TCC TCA

```

Figura 2A

Anti-PD-1 2D3 VK

segmento V: L6

segmento J: JK4

```

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

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

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

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

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

    CDR3
-----
271 R S N W P L T F G G G T K V E I K
    CGT AGC AAC TGG CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

```

Figura 2B

Anti-PD-1 4H1 VH

segmento V: 3-33
 segmento D: indeterminado
 segmento J: JH4b

```

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

                                     CDR1
                                     -----
55  R L S C A A S G F T F S N Y G M H W
   AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TAT GGC ATG CAC TGG

                                     CDR2
                                     -----
109 V R Q A P G K G L E W V A L I W Y D
   GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA CTT ATA TGG TAT GAT

                                     CDR2
                                     -----
163 G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R
   GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

                                     CDR2
                                     -----
217 D N S K N T L Y L Q M T S L R V E D
   GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG ACC AGT CTG AGA GTC GAG GAC

                                     CDR3
                                     -----
271 T A V Y Y C A S N V D H W G Q G T L
   ACG GCT GTG TAT TAT TGT GCG AGC AAC GTT GAC CAT TGG GGC CAG GGA ACC CTG

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

Figura 3A

Anti-PD-1 4H1 VK

segmento V: L6

segmento J: JK1

```

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

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

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

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

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

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

Figura 3B

Anti-PD1 5C4 VK

segmento V: L6
 segmento J: JK1

```

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

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

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

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

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

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



Figura 4B

Anti-PD-1 4A11 VH

segmento V: 4-39

segmento D: 3-9

segmento J: JH4b

```

1      Q L Q L Q E S G P G L V K P S E T L
      CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

                                         CDR1
                                         -----
55     S L T C T V S G G S L S R S S F F W
      TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC CTC AGC AGG AGT AGT TTC TTC TGG

      CDR1                                     CDR2
      -----                                     -----
109    G W I R Q P P G K G L E W I G S I Y
      GGC TGG ATC CGT CAG CCC CCA GGG AAG GGA CTG GAG TGG ATT GGG AGT ATC TAT

                                         CDR2
                                         -----
163    Y S G S T Y Y N P S L K S R V T I S
      TAT AGT GGG AGC ACC TAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCC

217    V D T S K N Q F S L K L S S V T A A
      GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCA

                                         CDR3
                                         -----
271    D T A V Y Y C V R D Y D I L T G D E
      GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GTG AGA GAT TAC GAT ATT TTG ACT GGC GAC GAG

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

Figura 5A

Anti-PD-1 4A11 VK

segmento V: L15

segmento J: JK1

```

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

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

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

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

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

      CDR3
      -----
271    Y Y S Y P R T F G Q G T K V E I K
      TAT TAT AGT TAC CCT AGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
  
```

Figura 5B

Anti-PD-1 7D3 VH

segmento V: 3-33
 segmento D: 7-27
 segmento J: JH4b

```

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

                                     CDR1
-----
55     R L S C T T S G I T F S S Y G F H W
      AGA CTC TCC TGT ACA ACG TCT GGA ATC ACC TTC AGT AGC TAT GGC TTT CAC TGG

                                     CDR2
-----
109    V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D
      GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTG ATA TGG TAT GAT

      CDR2
-----
163    G S K K Y Y A D S V K G R F T L S R
      GGA AGT AAA AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC CTC TCC AGA

217    D D S K N T L Y L Q M N S L R A E D
      GAC GAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

                                     CDR3
-----
271    T A V Y Y C V T G D D Y W G Q G T L
      ACG GCT GTG TAT TAC TGT GTT ACT GGG GAT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG

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

Figura 6A

Anti-PD-1 7D3 VK

segmento V: L6
segmento J: JK4

```

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

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

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

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

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

      CDR3
      -----
271    R S N W P L T F G G G T K V E I K
      CGT AGC AAC TGG CCT CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
  
```

Figura 6B

Anti-PD-1 5F4 VH

segmento V: 4-39
 segmento D: 3-9
 segmento J: JH4b

```

1      Q L Q L Q E S G P G L V K P S E T L
      CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

                                CDR1
                                -----
55     S L T C S V S G G S L S R S S Y F W
      TCC CTC ACC TGC TCT GTC TCT GGT GGC TCC CTC AGC AGG AGT AGT TAC TTC TGG

      CDR1                                CDR2
      ---                                -----
109    G W I R Q P P G K G L E W I A S I F
      GGC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GCG AGT ATC TTT

                                CDR2
                                -----
163    Y S G E T Y F N P S L K S R V T I S
      TAT AGT GGG GAA ACC TAC TTC AAT CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCC

                                CDR3
                                -----
217    V D T S R N Q F S L K L S S V T A A
      GTA GAC ACG TCC AGG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCA

                                CDR3
                                -----
271    D T A V Y Y C A R D Y D I L T G D E
      GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TAC GAT ATT TTG ACT GGC GAC GAG

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

Figura 7A

Anti-PD-1 5F4 VK

segmento V: L15

segmento J: JK1

```

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

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

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

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

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

      CDR3
      -----
271    Y Y S Y P R T F G Q G T K V E I K
      TAT TAT AGT TAC CCT AGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
  
```

Figura 7B

Región VK de anti-PD1 17D8, 2D3, y 7D3

L6 Línea germinal:	E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A	CDR1
17D8 VK:	- - - - -	- - - - -
2D3 VK:	- - - - -	- - - - -
7D3 VK:	- - - - -	- - - - -
L6 Línea germinal:	W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G S G	CDR2
17D8 VK:	- - - - -	- - - - -
2D3 VK:	- - - - -	- - - - -
7D3 VK:	- - - - -	- - - - -
L6 Línea germinal:	T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N W P	CDR3
JK4 Línea germinal:	- - - - -	L T F G G G T
17D8 VK:	- - - - -	- - - - -
2D3 VK:	- - - - -	- - - - -
7D3 VK:	- - - - -	- - - - -
JK4 Línea germinal:	K V E I K	- - - - -
17D8 VK:	- - - - -	(JK4)
2C3 VK:	- - - - -	(JK4)
7D3 VK:	- - - - -	(JK4)

Figura 9

Región VK de anti-PD1 4A11 y 5F4

L15 Línea germinal: D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S
 4A11 VK: - - - - -
 5F4 VK1: - - - - -

CDR1

L15 Línea germinal: W L A W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L Q S G V P S R F
 4A11 VK: - - - - -
 5F4 VK1: - - - - -

CDR2

L15 Línea germinal: S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N S
 4A11 VK: - - - - -
 5F4 VK1: - - - - -

CDR3

L15 Línea germinal
 JK1 Línea germinal
 4A11 VK: - - R - - - - - (JK1)
 5F4 VK1: - - R - - - - - (JK1)

Y P

Figura 12

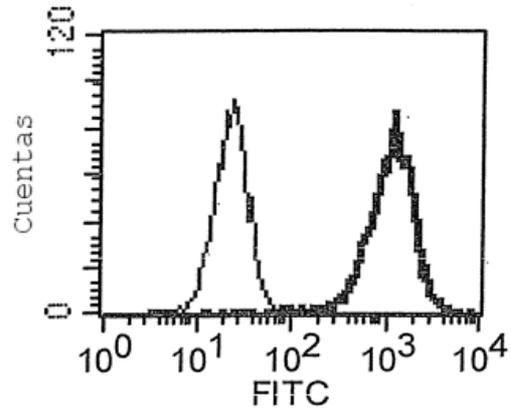


Figura 13A

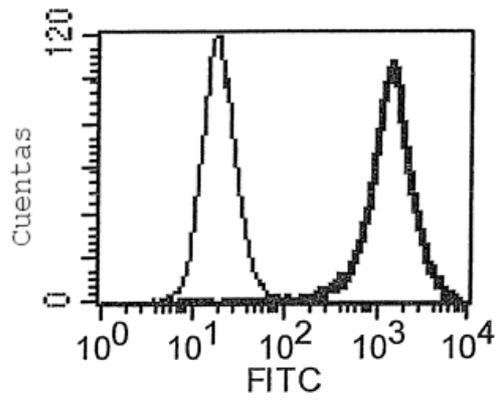


Figura 13B

Especificidad de unión de los anticuerpos HuMab anti-PD-1 a PD-1, ICOS, CTLA-4 y CD28

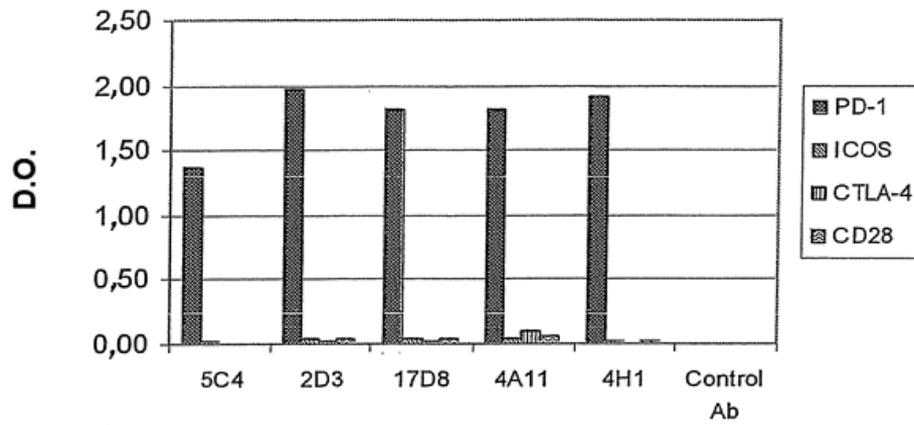


Figura 14

Unión de los Ab HuMab anti-hPD-1 a linfocitos T humanos activados

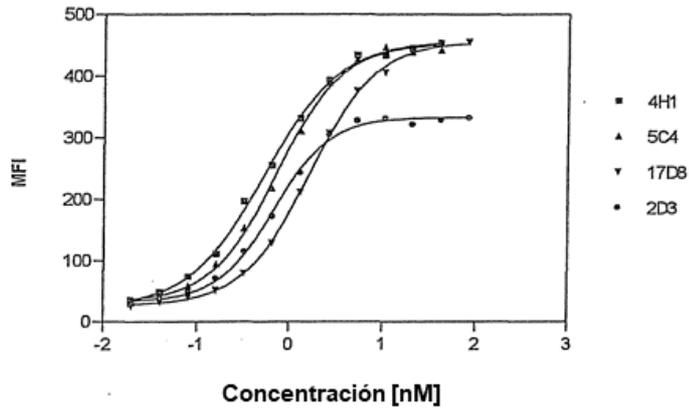


Figura 15A

Unión de los Ab HuMab anti-hPD-1 a PBMC de macaco activados

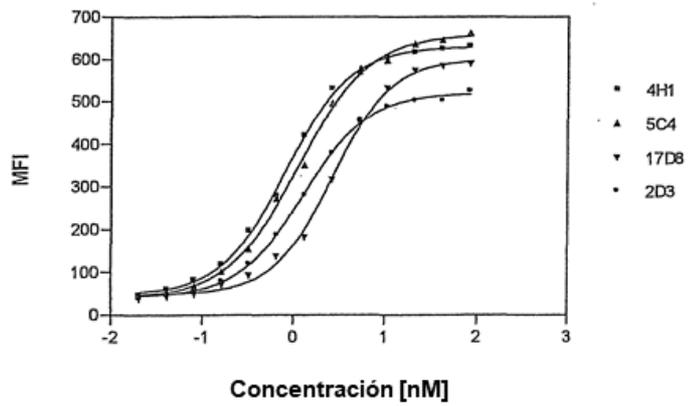


Figura 15B

Unión de los Ab HuMab anti-hPD-1 a células CHO que expresan PD-1

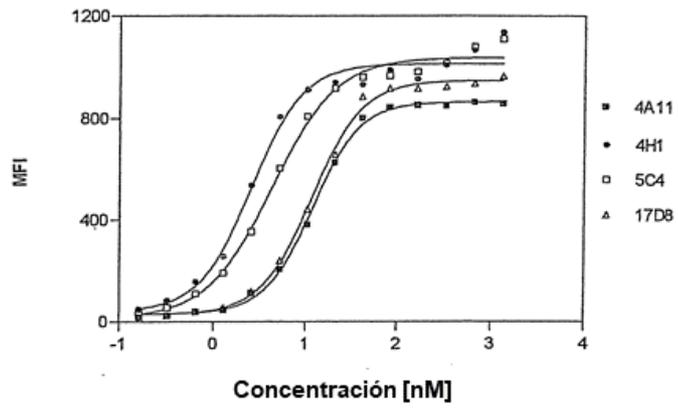


Figura 15C

Ab anti-PD-1 estimulan la proliferación de linfocitos T en MLR

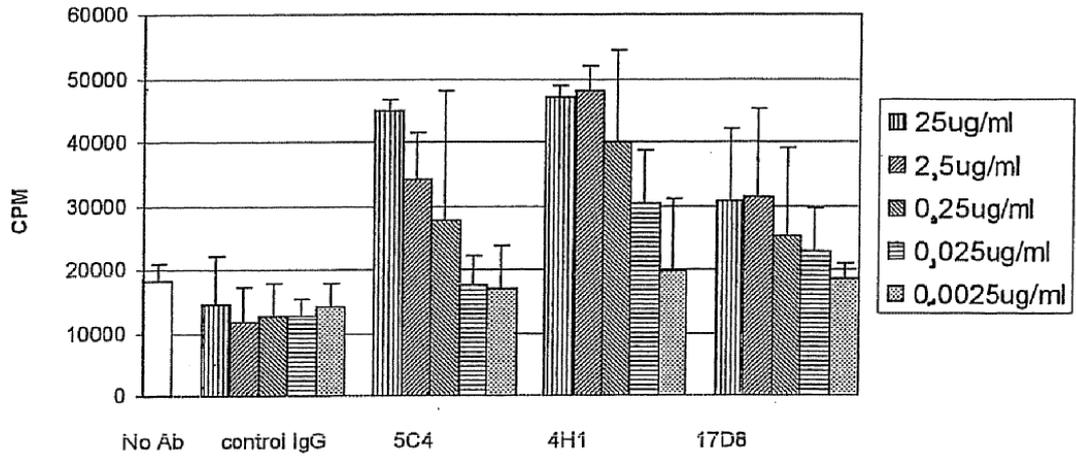


Figura 16A

Abs anti-PD-1 sobre la secreción de IFN-0 en MLR

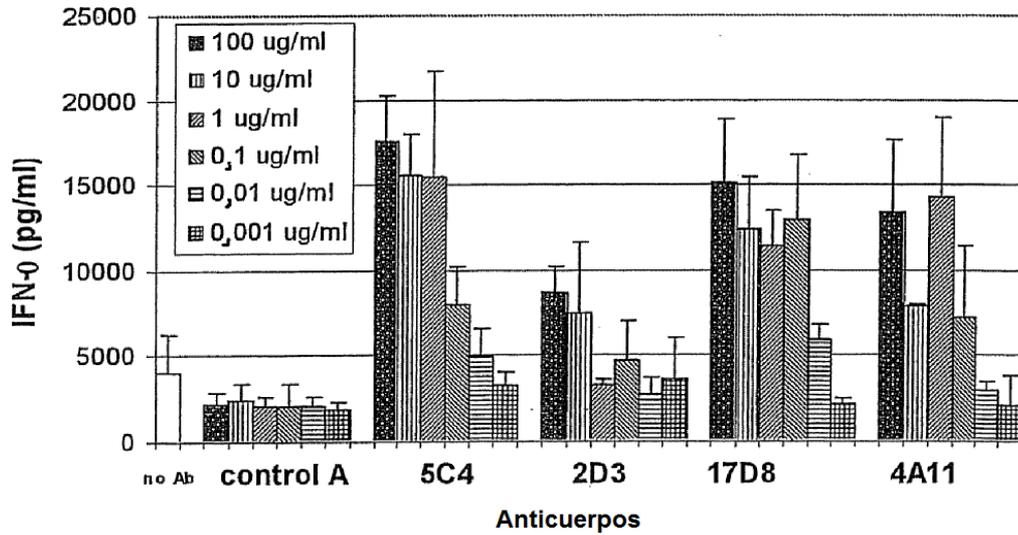


Figura 16B

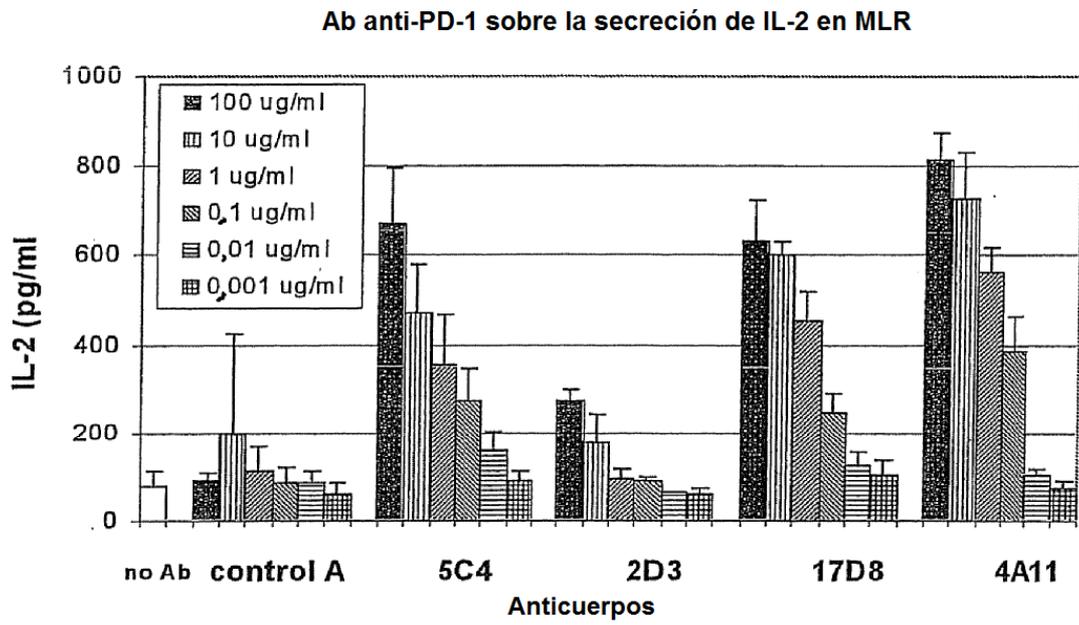


Figura 16C

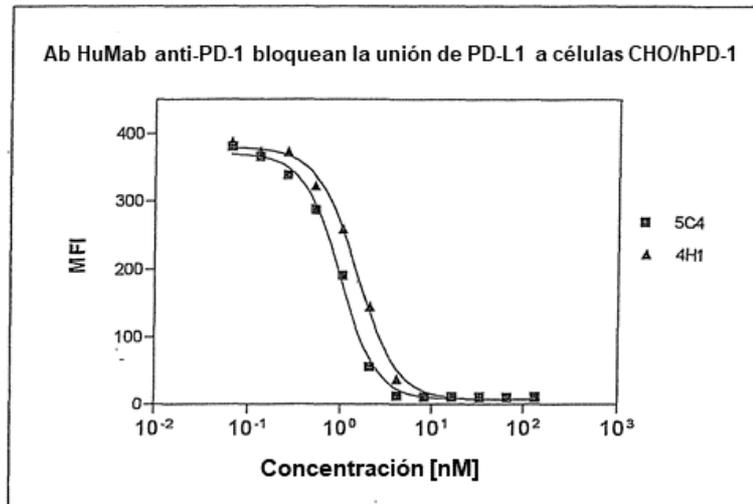


Figura 17A

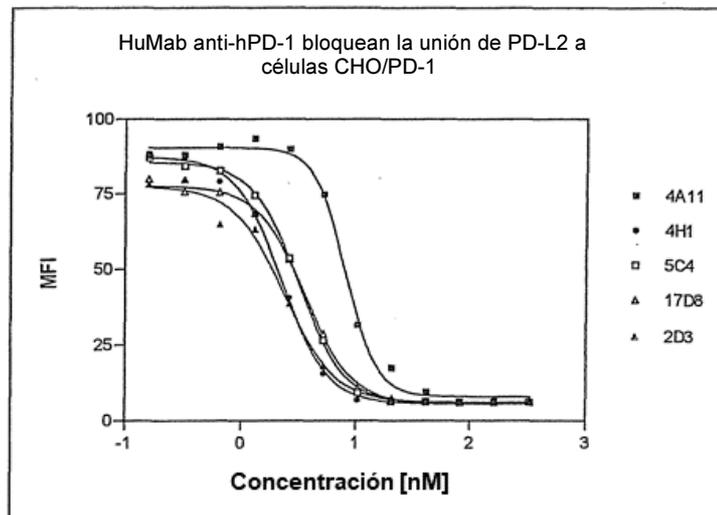


Figura 17B

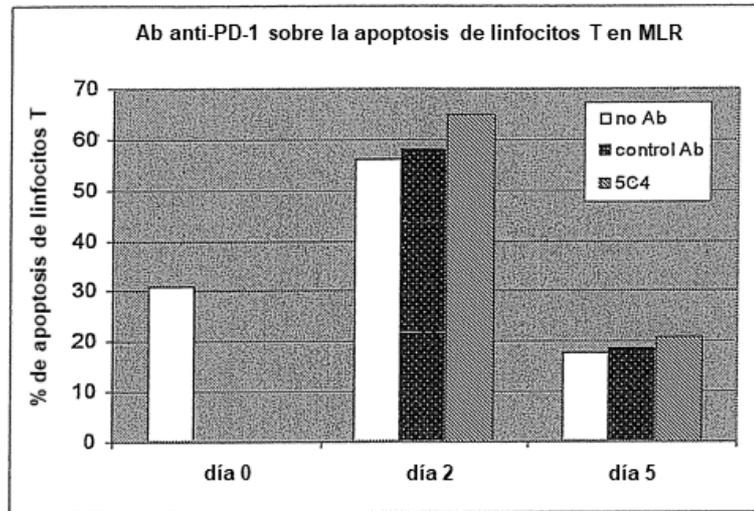


Figura 18

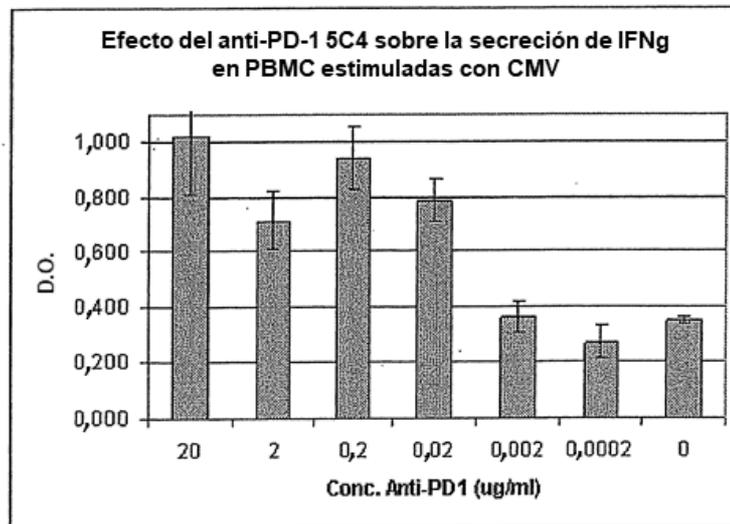


Figura 19

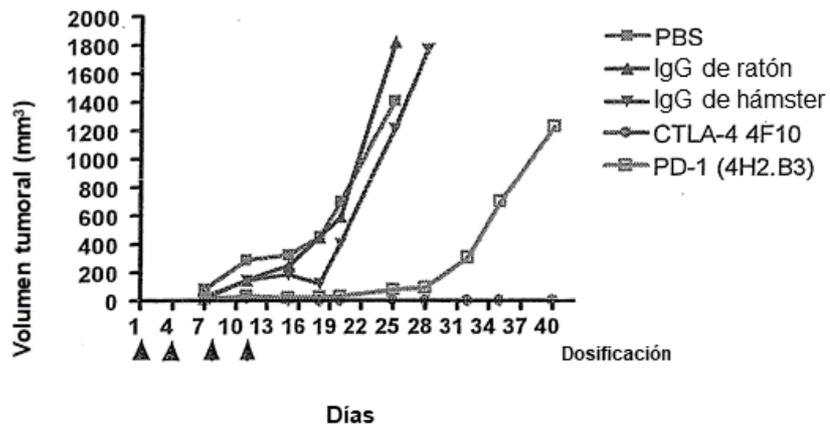


Figura 20

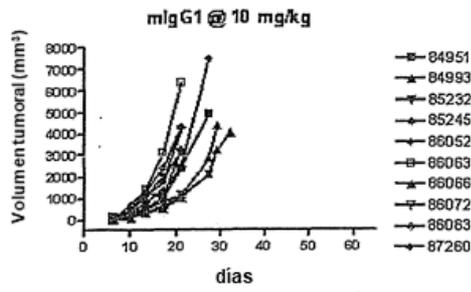


Figura 21A

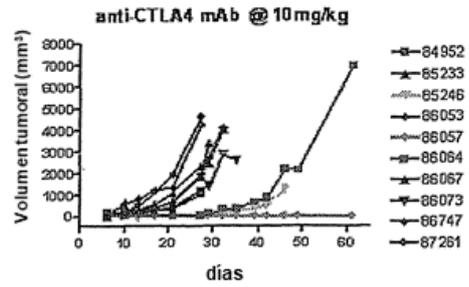


Figura 21B

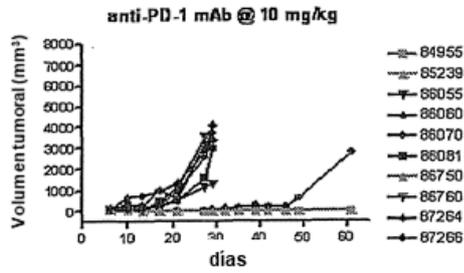


Figura 21C

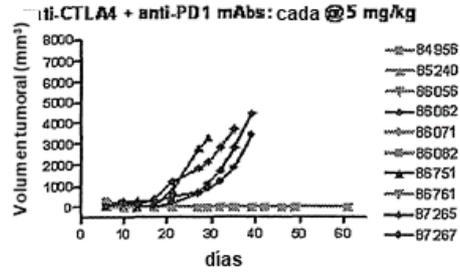


Figura 21D

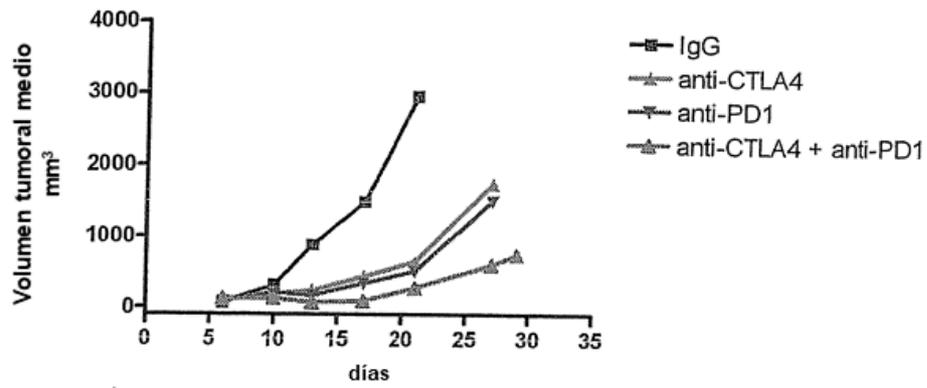


Figura 22

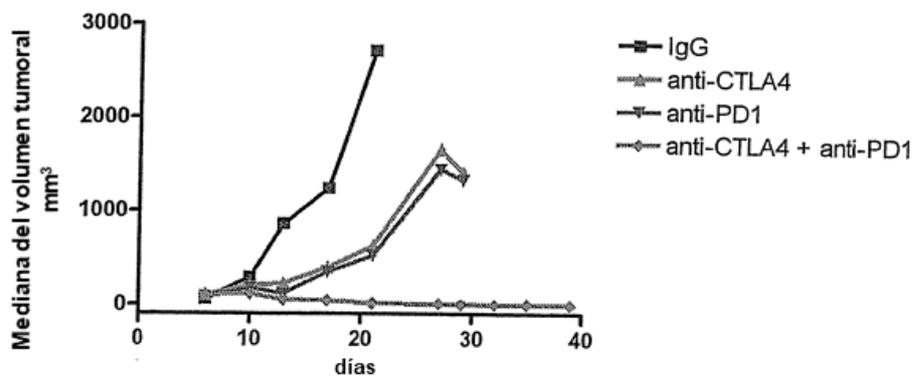


Figura 22

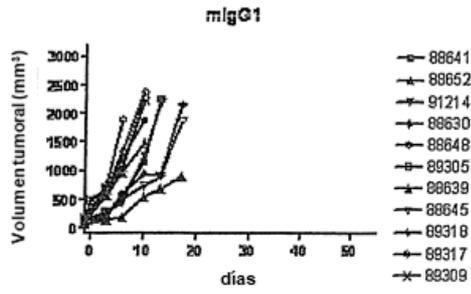


Figura 24A

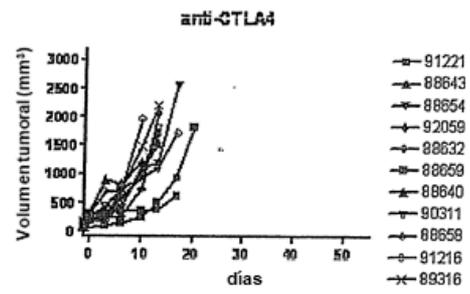


Figura 24B

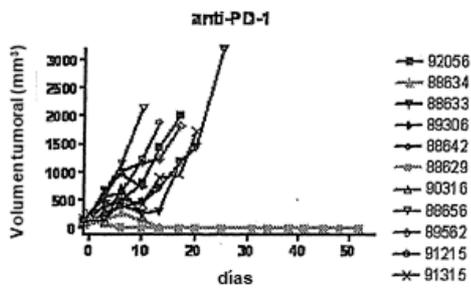


Figura 24C

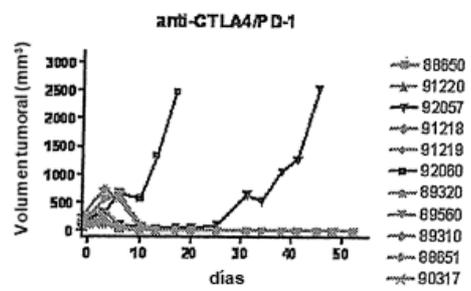


Figura 24D

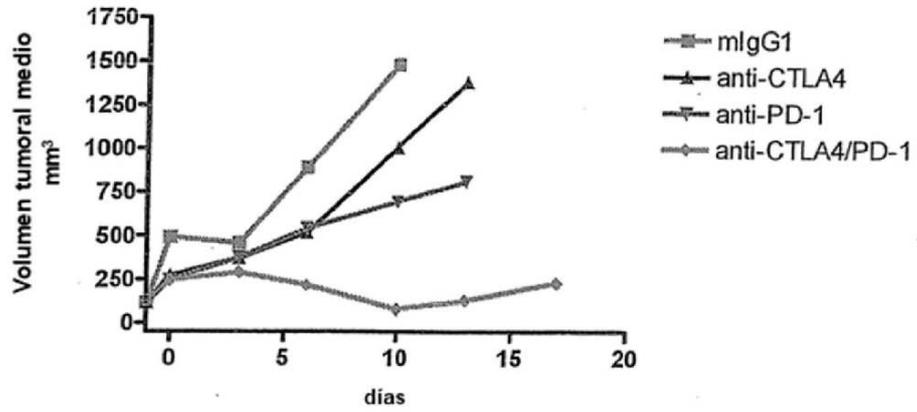


Figura 25

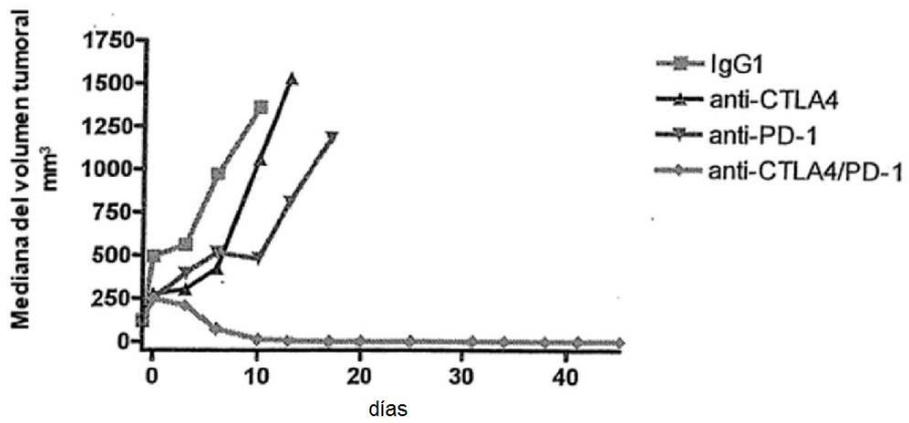


Figura 26

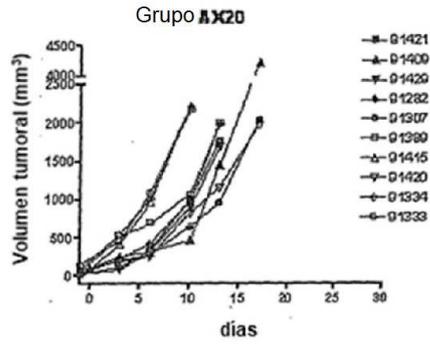


Figura 27A

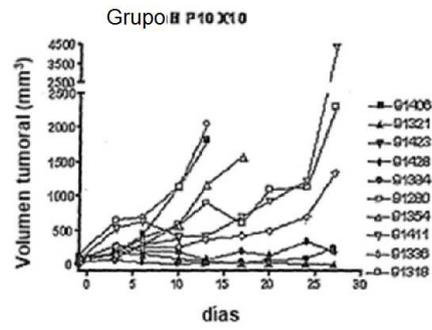


Figura 27B

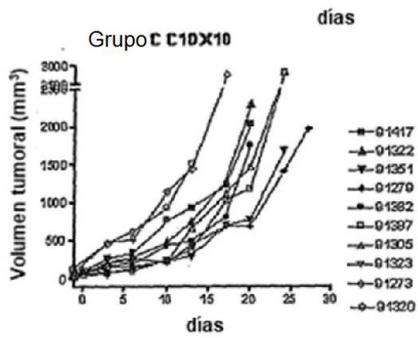


Figura 27C

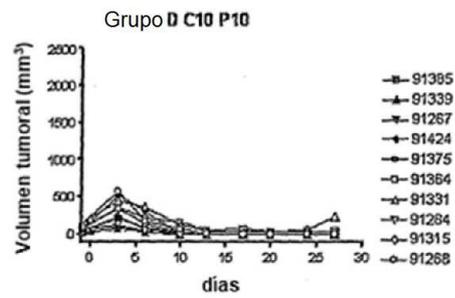


Figura 27D

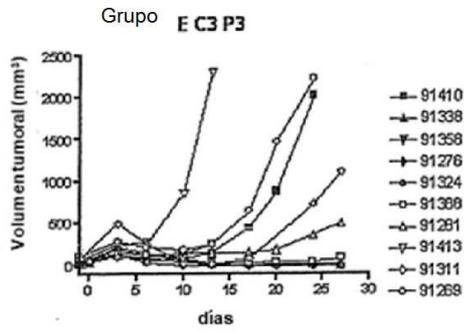


Figura 27E

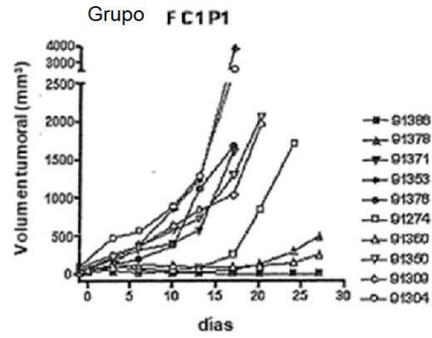


Figura 27F

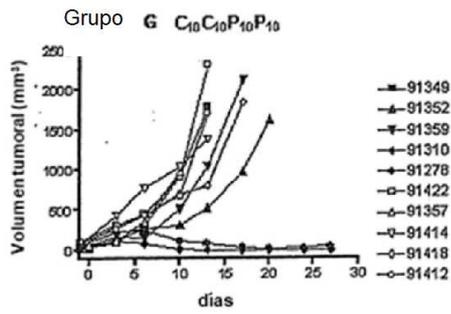


Figura 27G

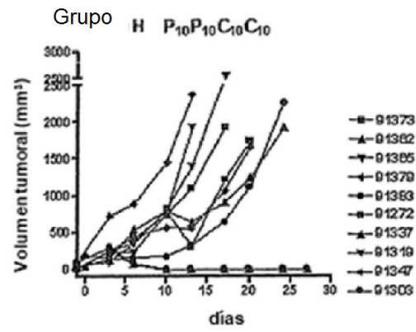


Figura 27H

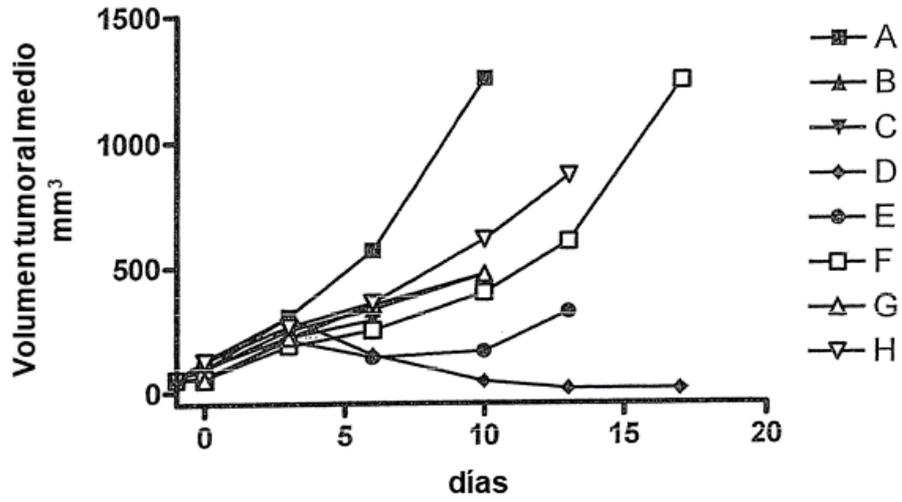


Figura 28

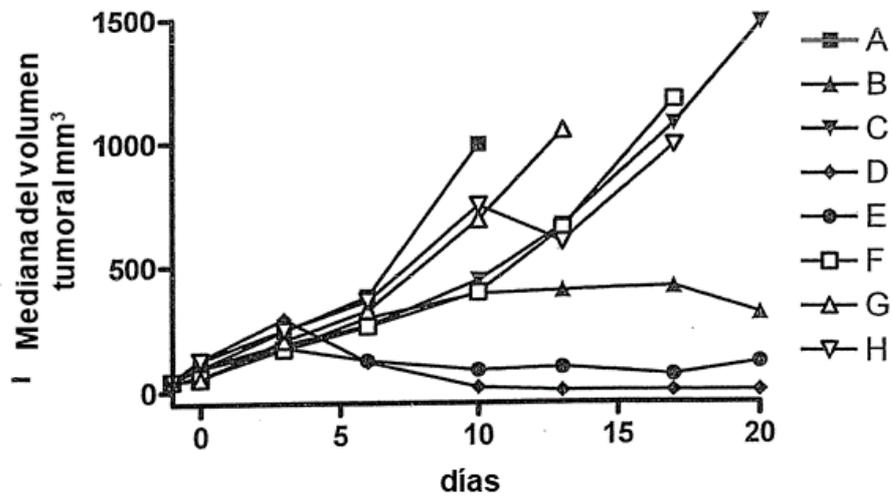


Figura 29

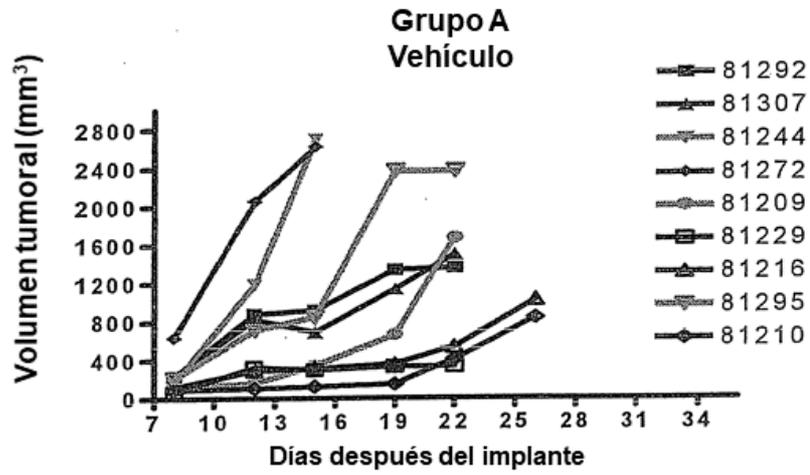


Figura 30A

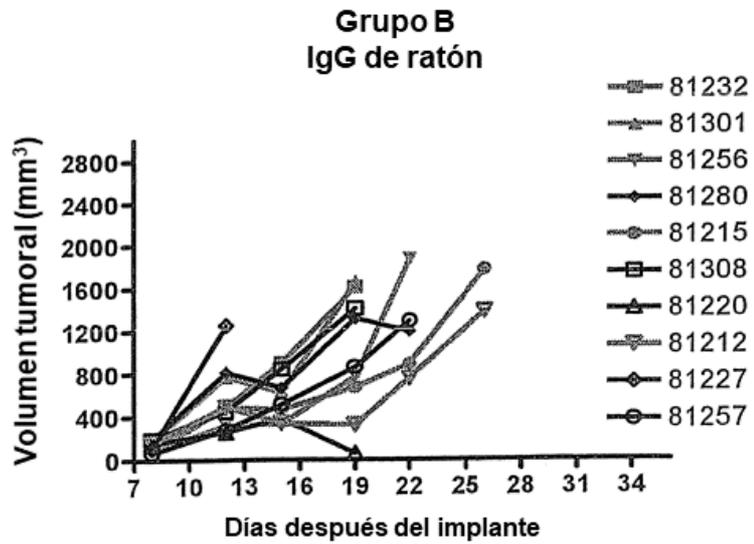


Figura 30B

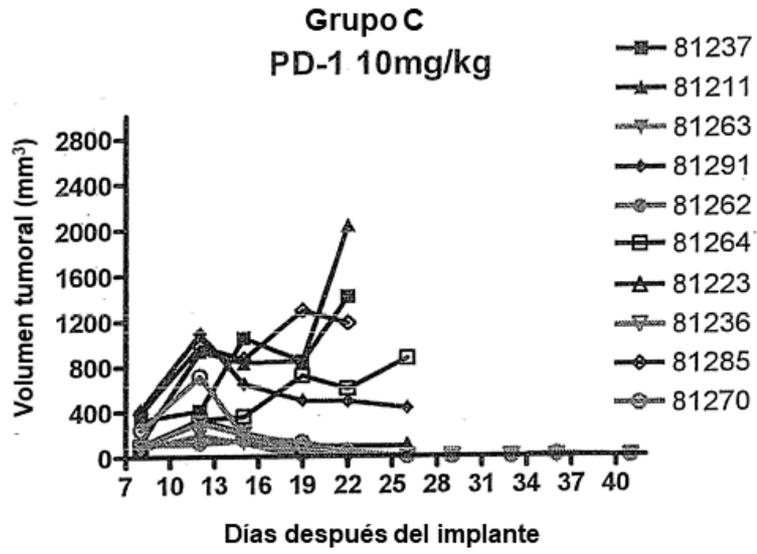


Figura 30C

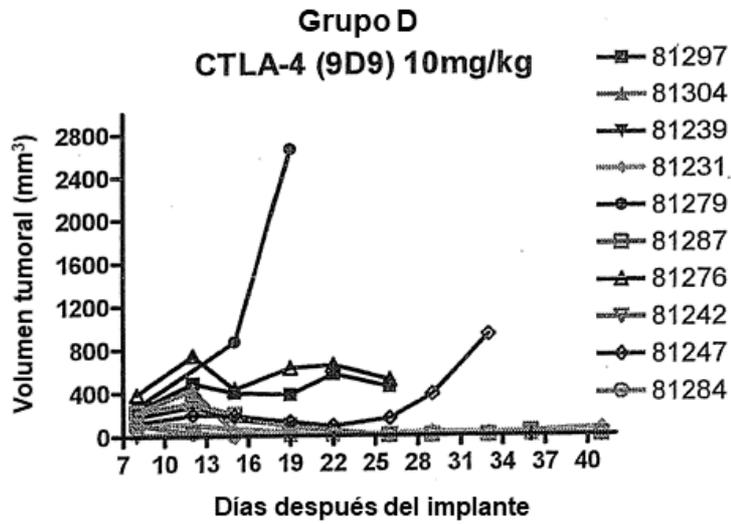


Figura 30D

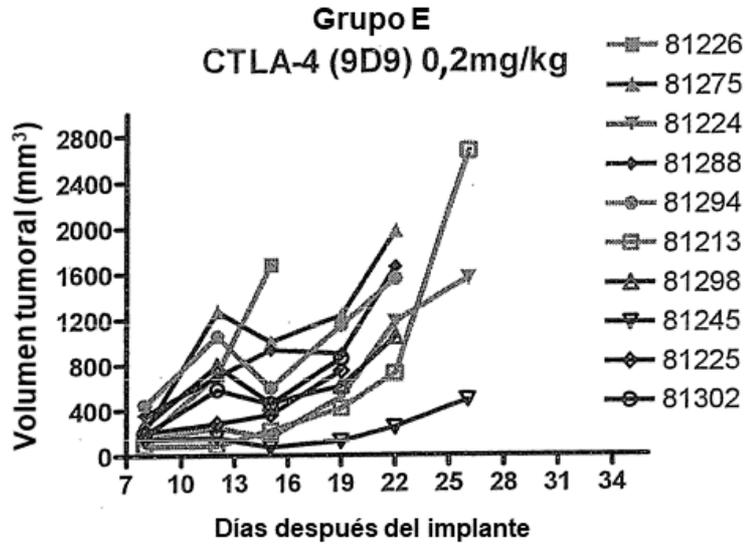


Figura 30E

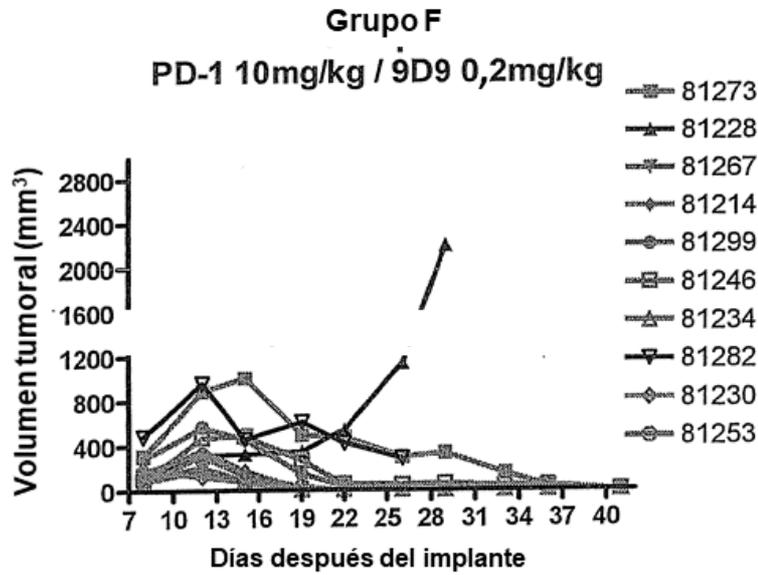


Figura 30F

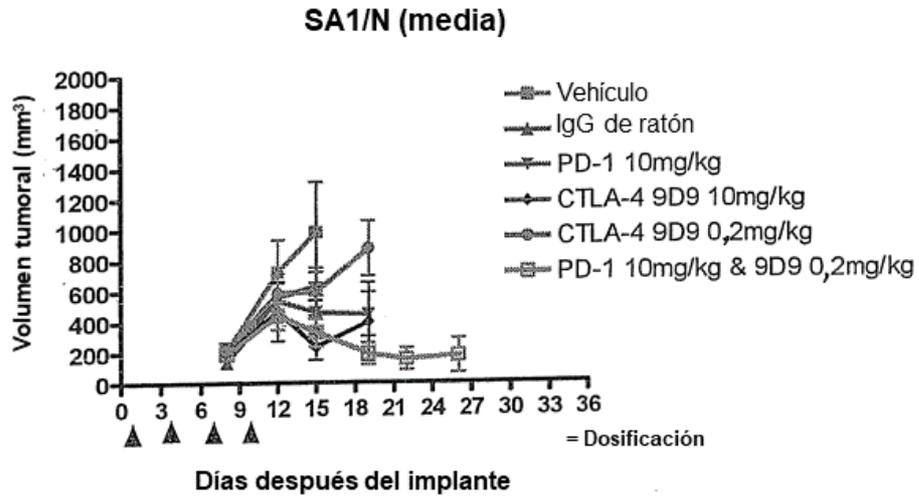


Figura 31

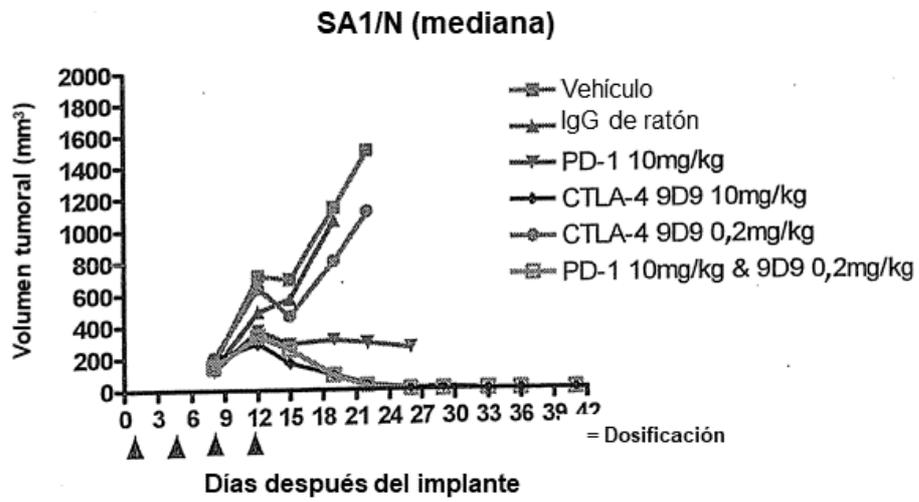


Figura 32

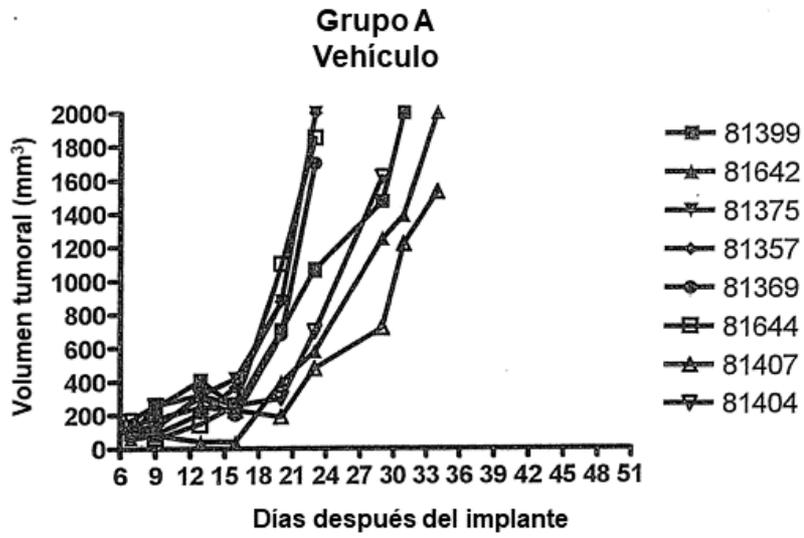


Figura 33A

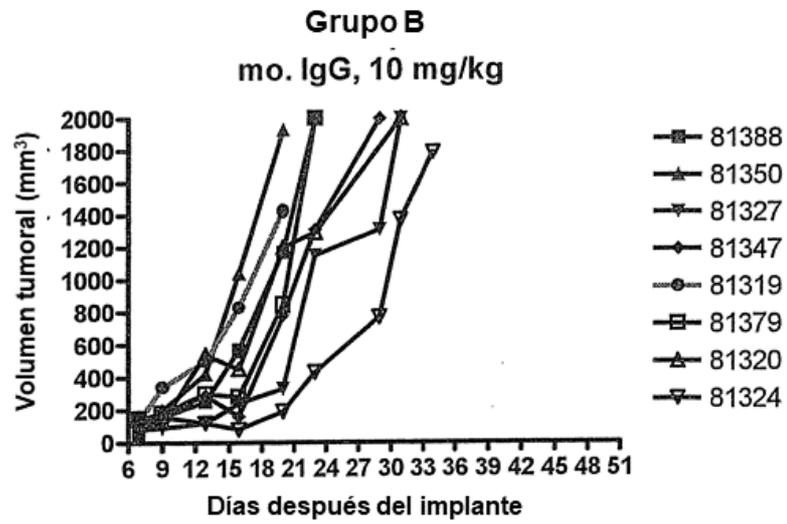


Figura 33B

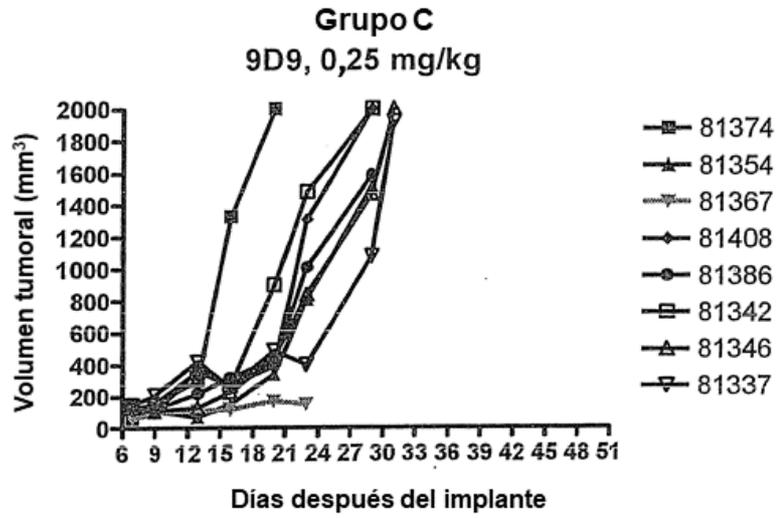


Figura 33C

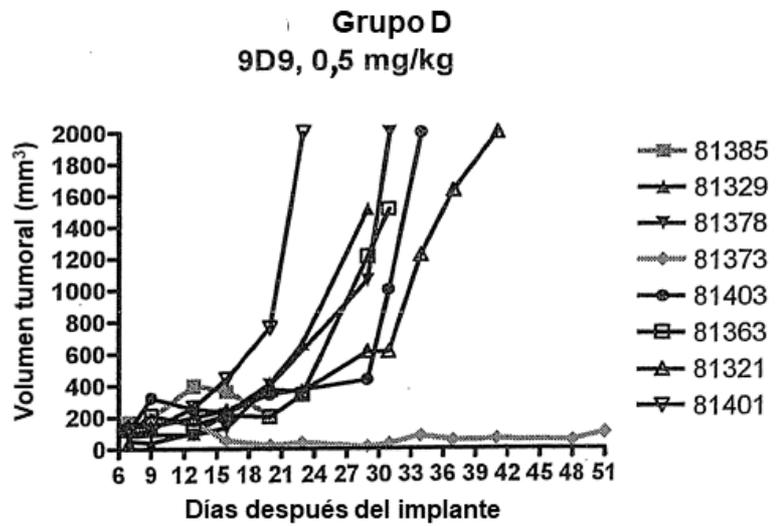


Figura 33D

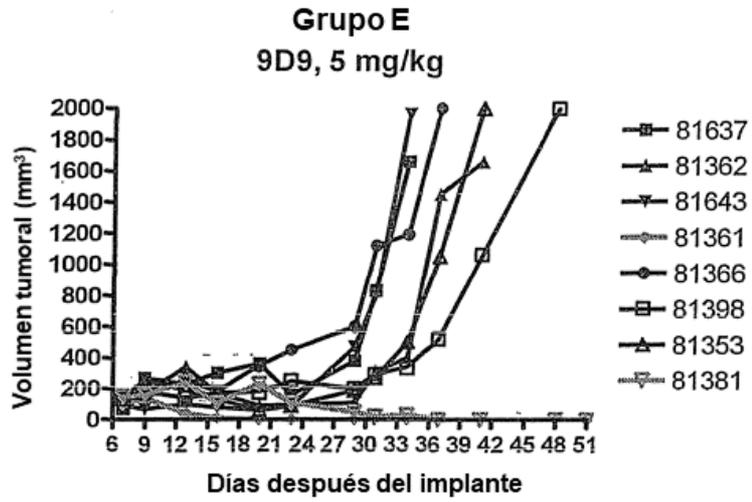


Figura 33E

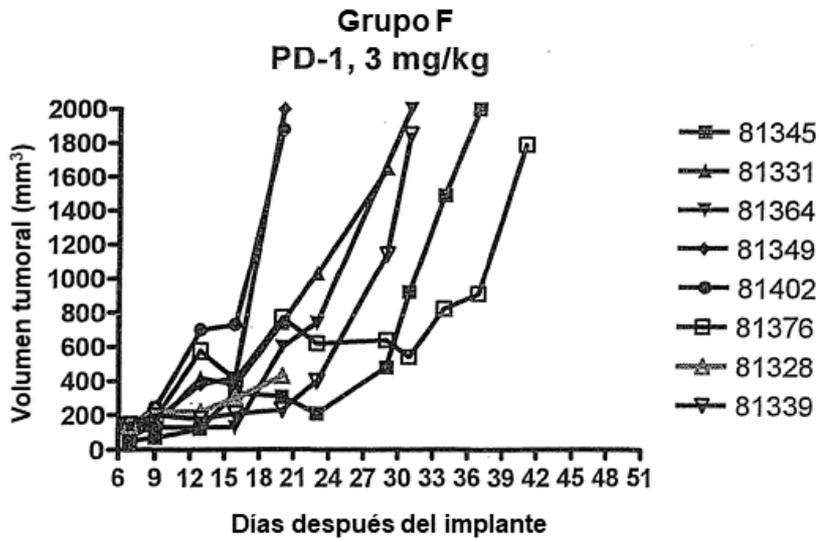


Figura 33F

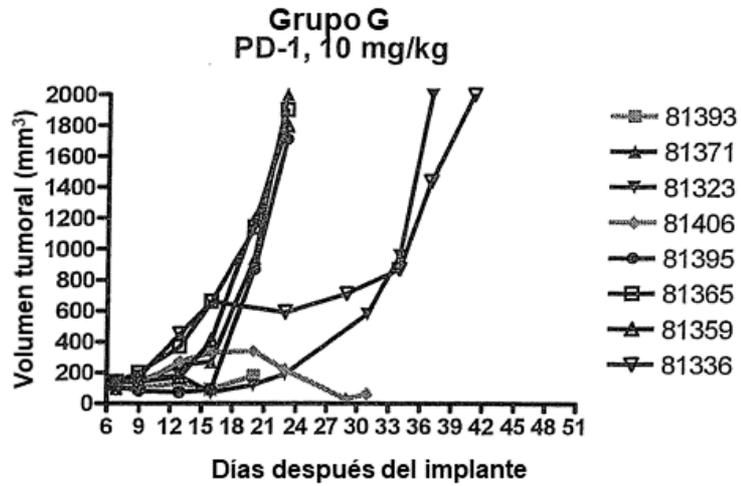


Figura 33G

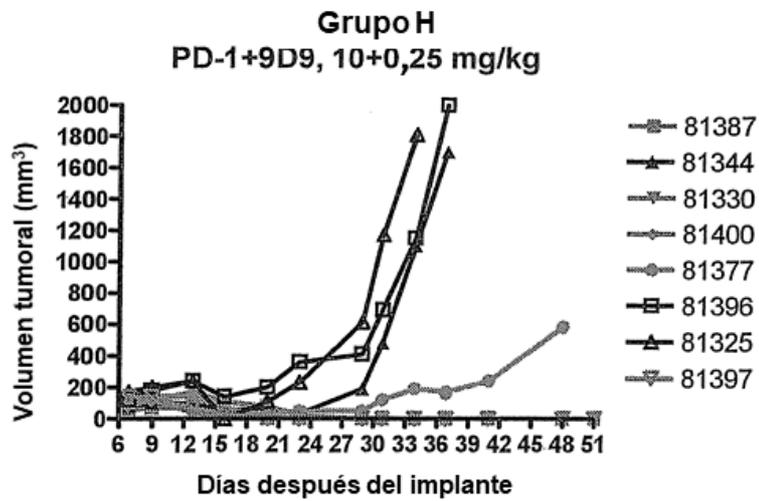


Figura 33H

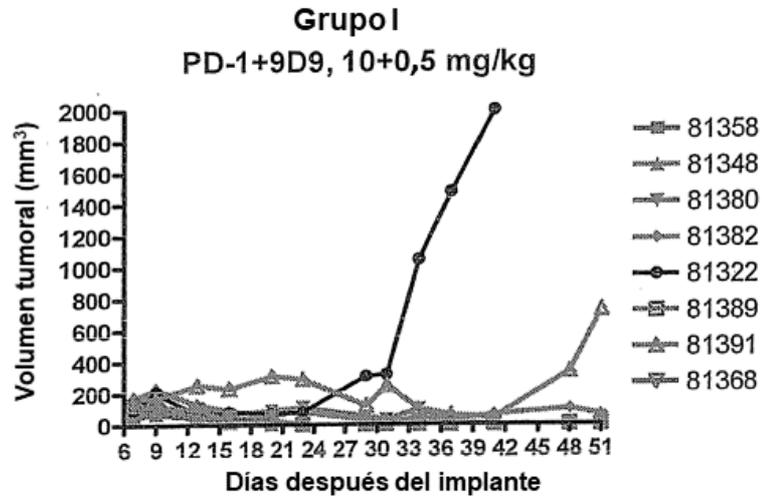


Figura 33I

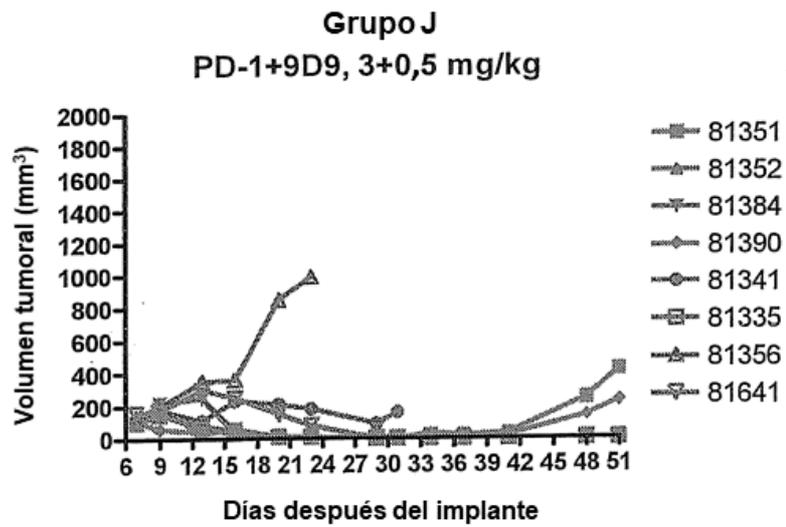


Figura 33J

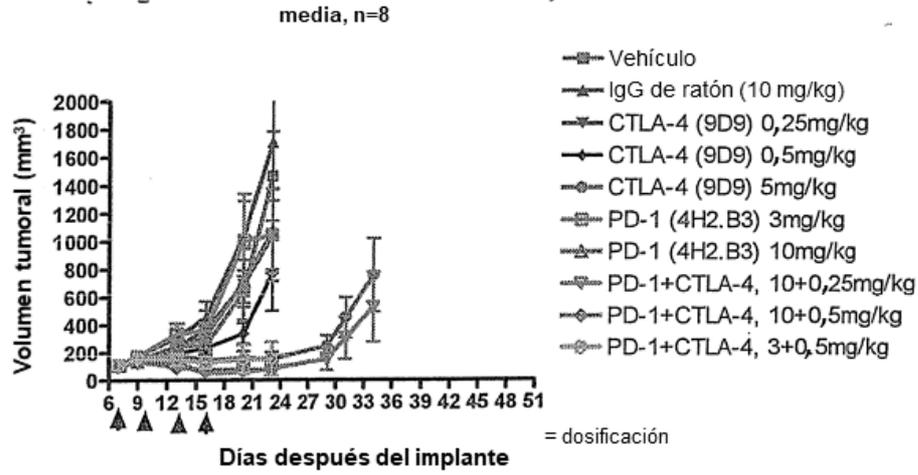


Figura 34

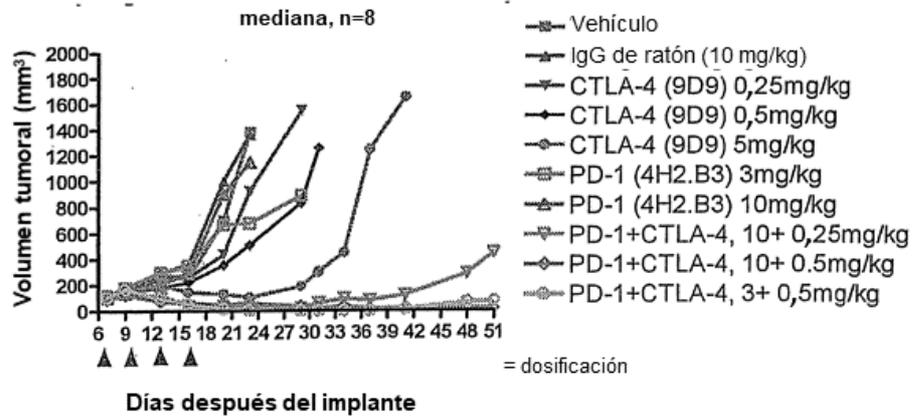


Figura 35

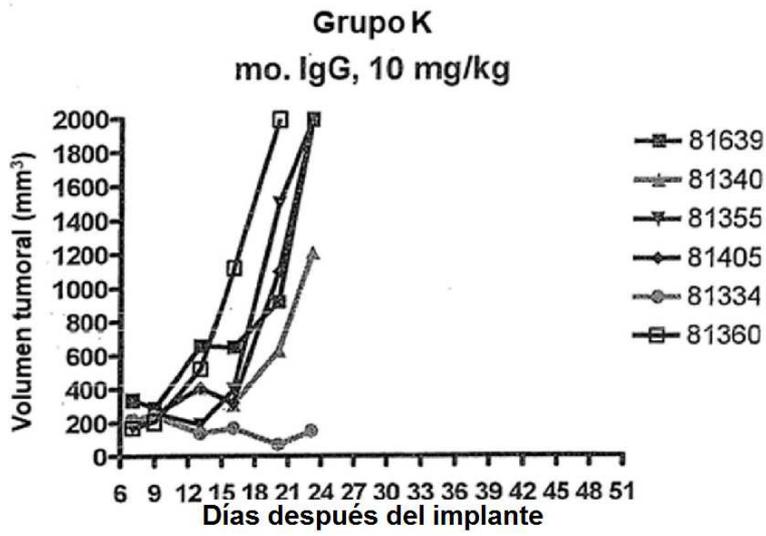


Figura 36A

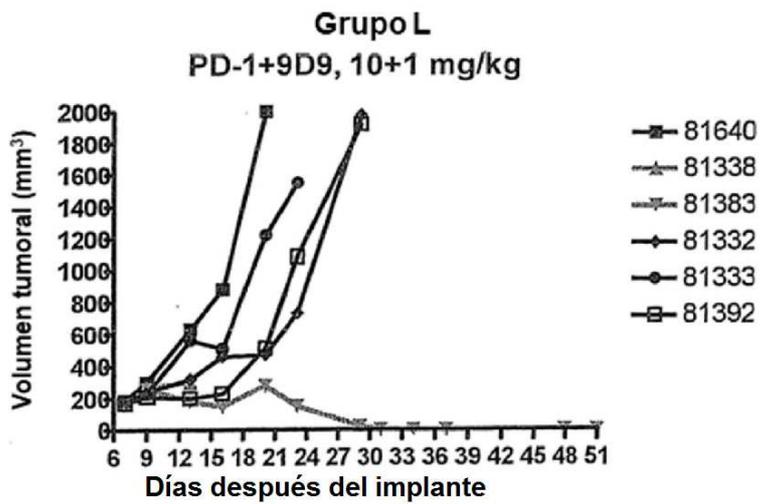


Figura 36B

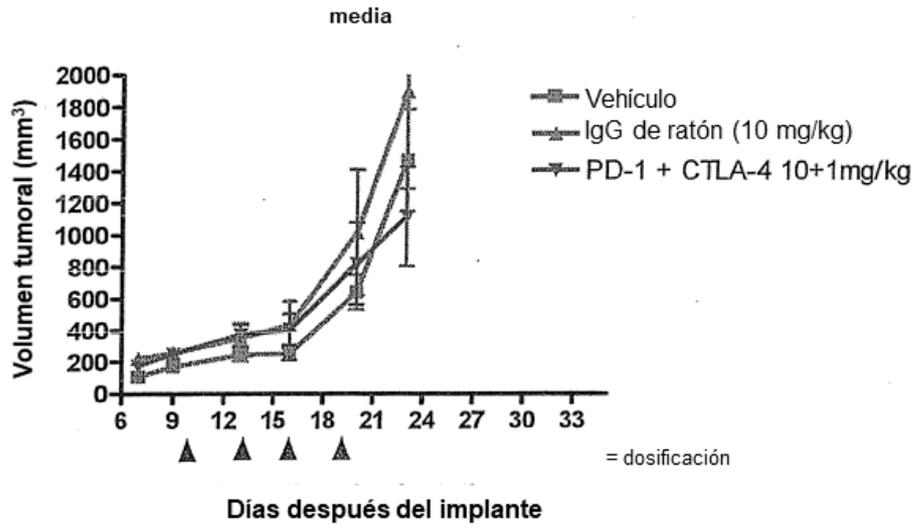


Figura 37

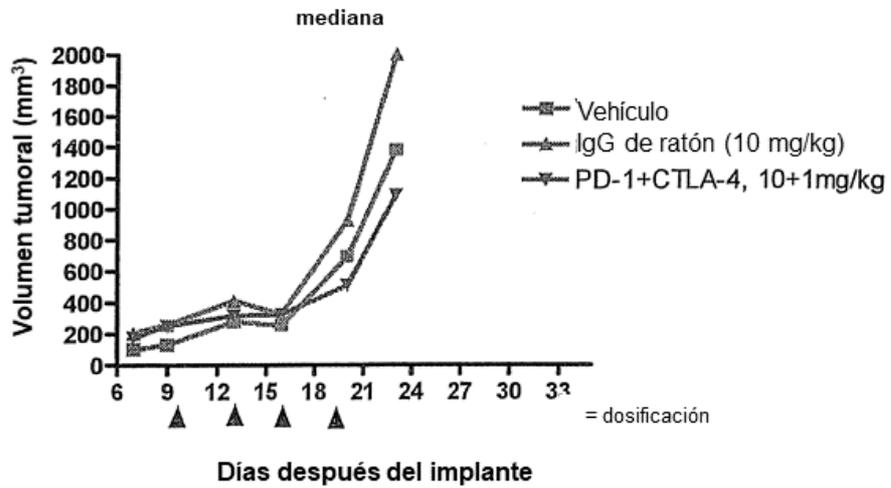


Figura 38

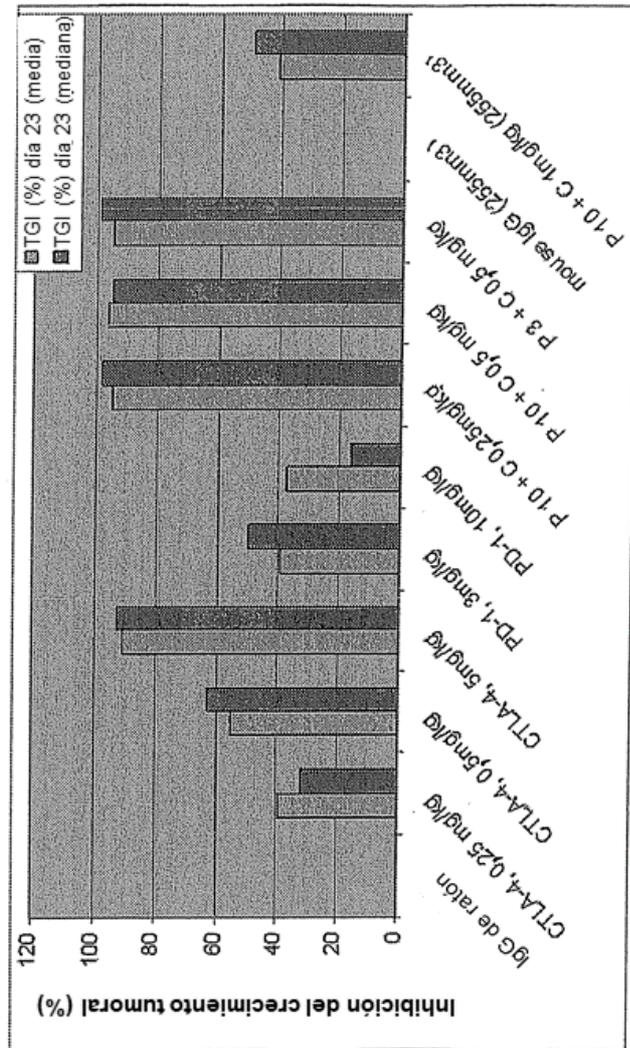


Figura 39

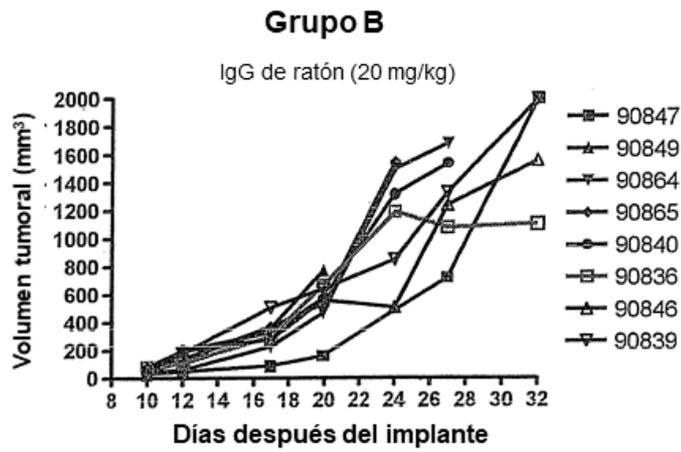


Figura 40A

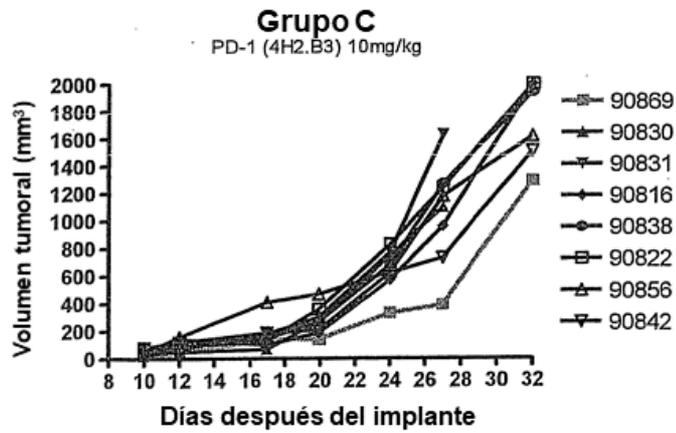


Figura 40B

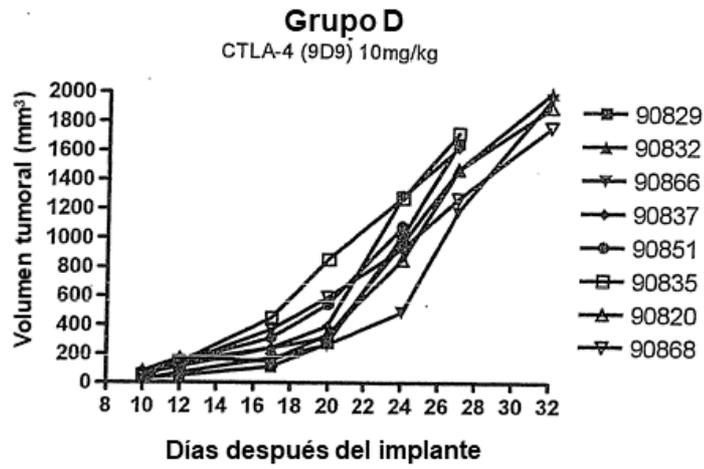


Figura 40C

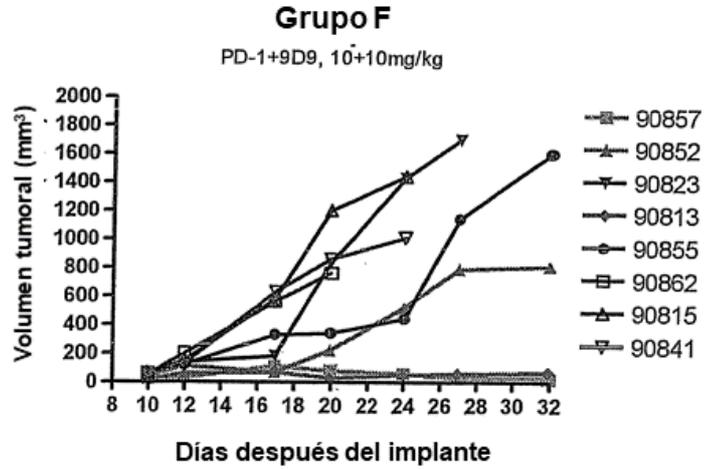


Figura 40D

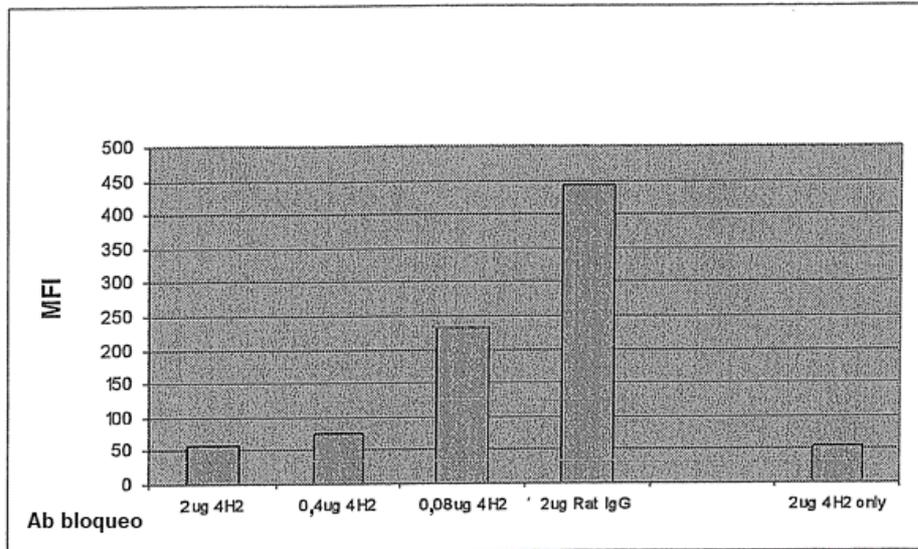


Figura 41

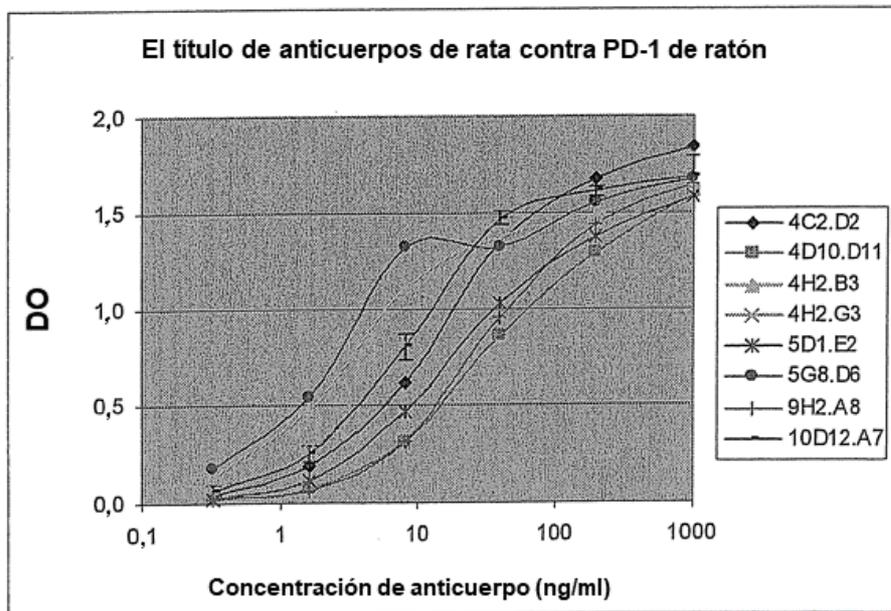


Figura 42

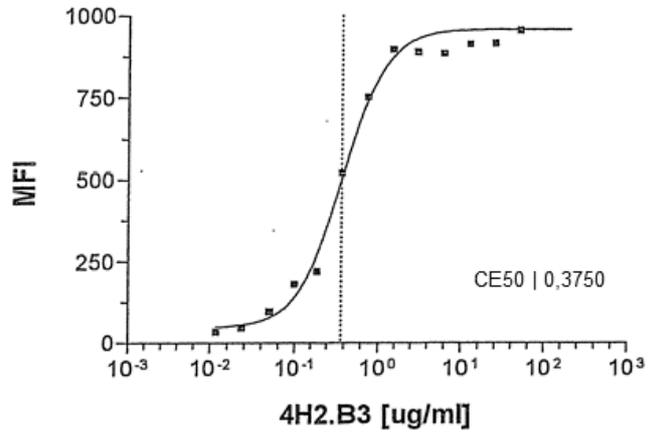


Figura 43

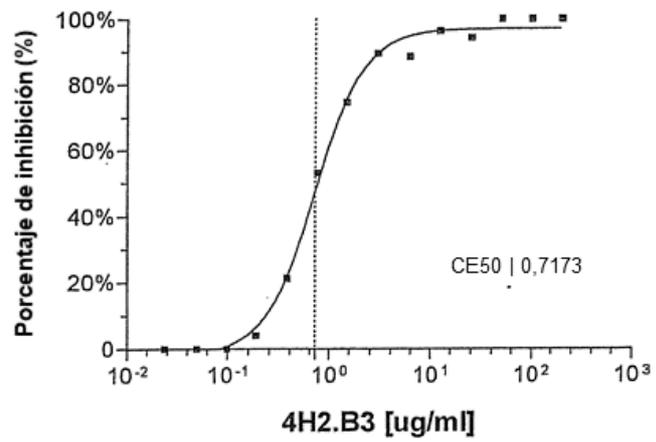


Figura 44

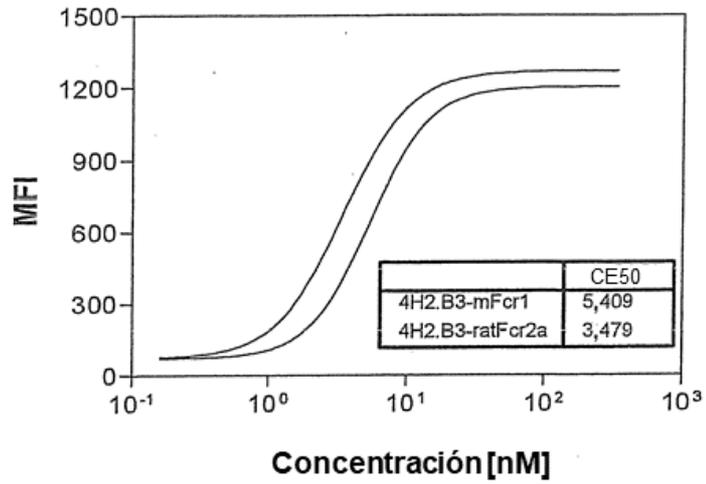


Figura 45

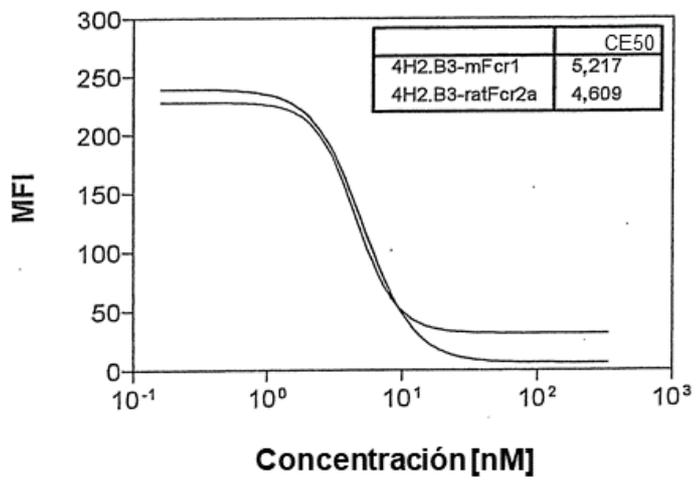


Figura 46

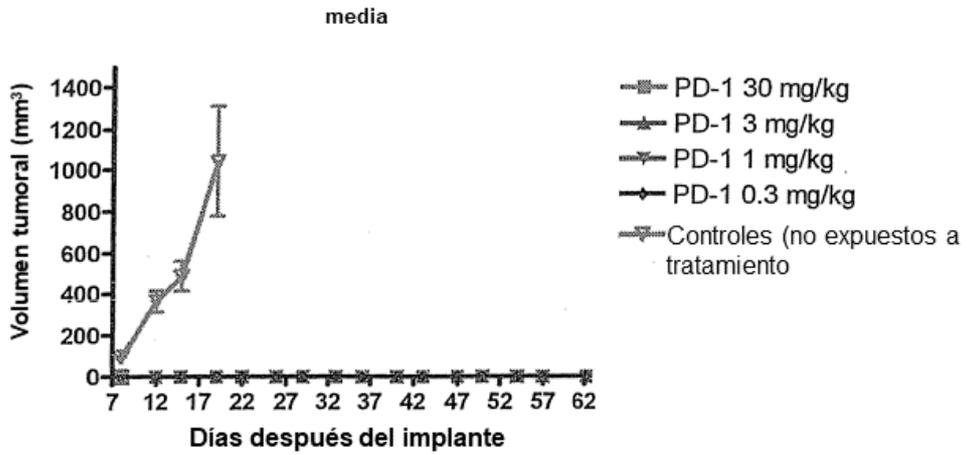


Figura 47

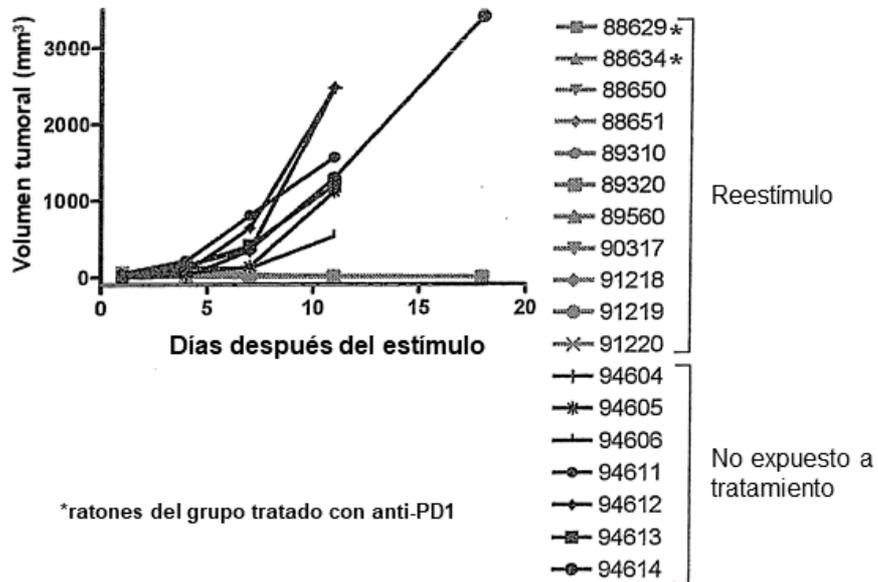


Figura 48

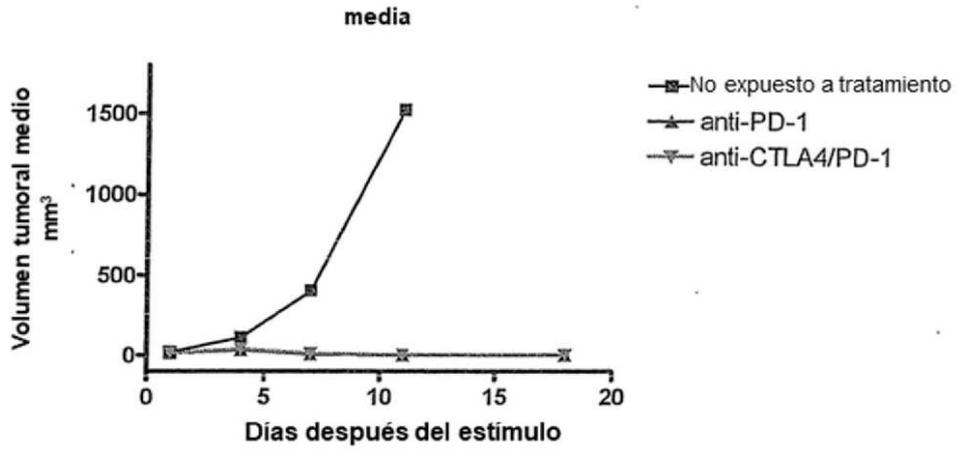


Figura 49

Estudio de eficacia en CT26, ratones Balb/C
(mediana, n=10)

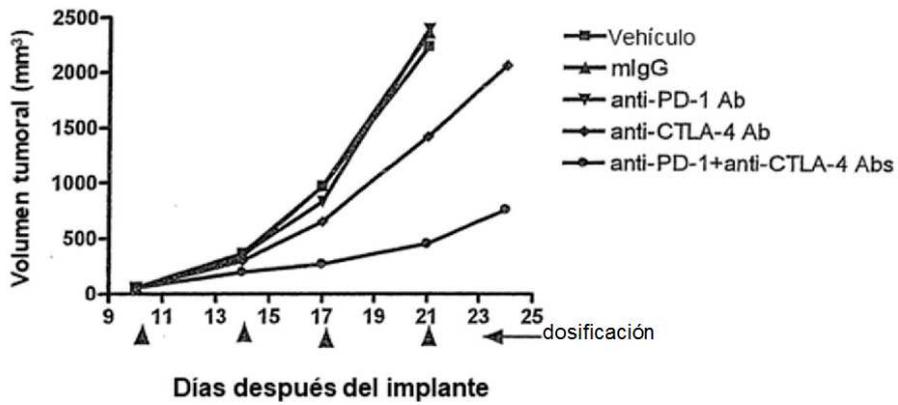


Figura 50

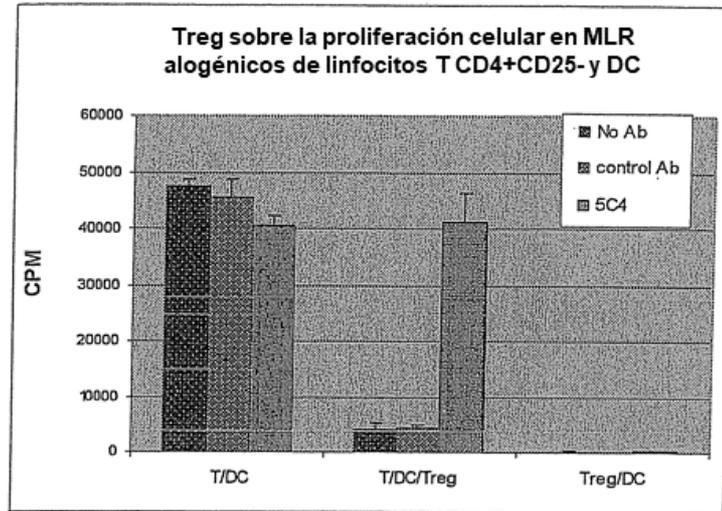


Figura 51A

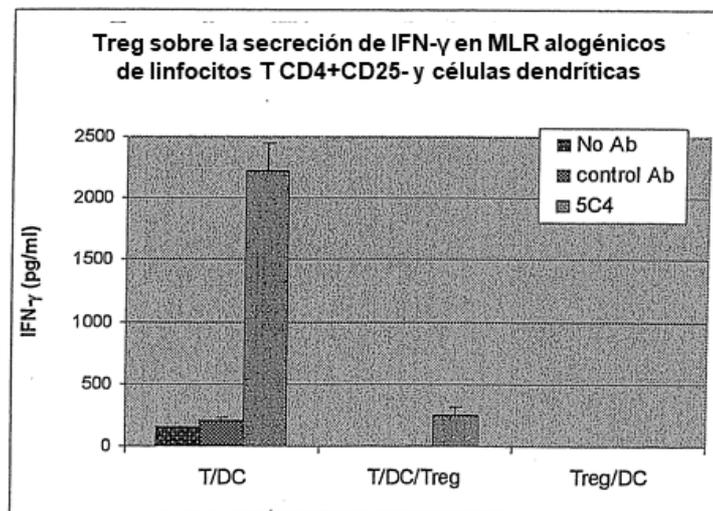


Figura 51B

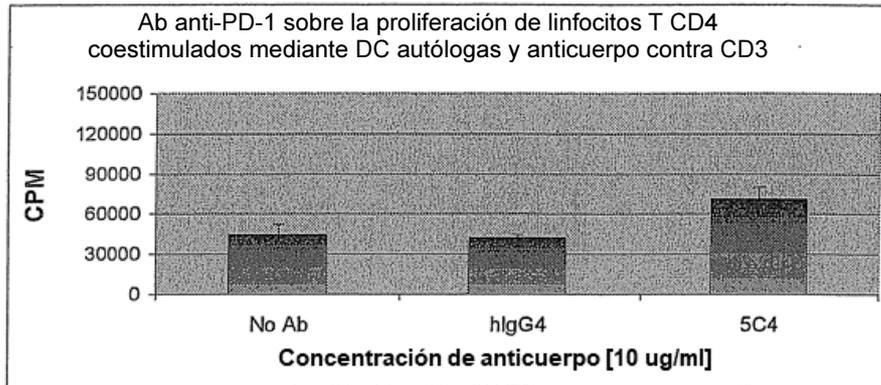


Figura 52A

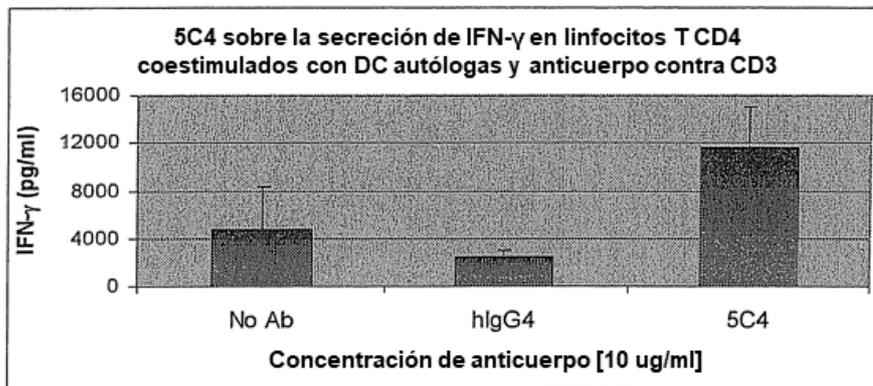


Figura 52B

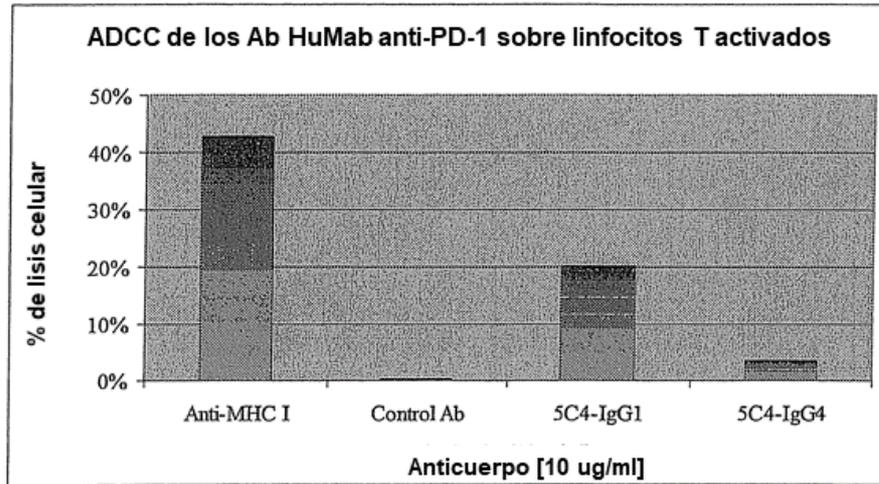


Figura 53

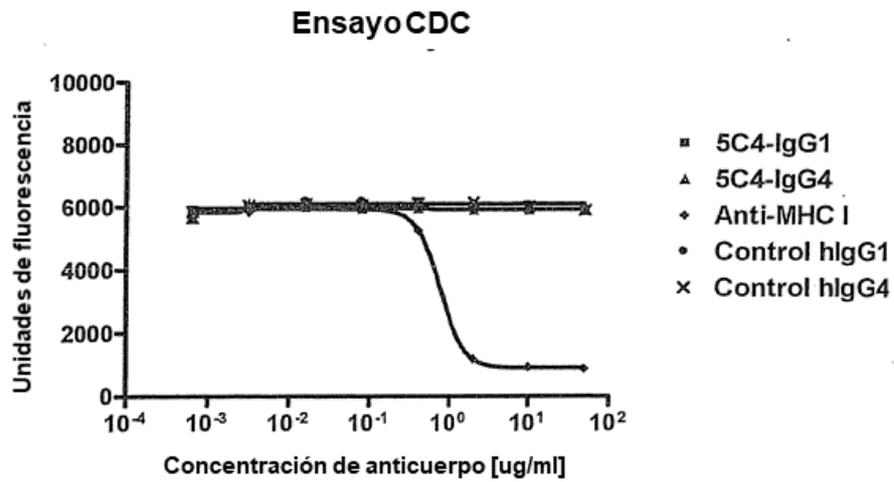


Figura 54