

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 777 603**

51 Int. Cl.:

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.08.2016 PCT/US2016/047528**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.03.2017 WO17034916**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2016 E 16757470 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020 EP 3341020**

54 Título: **Anticuerpos PD-L1 ("ligando de muerte programada 1")**

30 Prioridad:

**24.08.2015 US 201562209056 P**

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

**05.08.2020**

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)  
Lilly Corporate Center  
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**LI, YIWEN;  
LUDWIG, DALE LINCOLN;  
MOLKENTHIN, VERA;  
SHEN, JUQUN y  
SNAVELY, MARSHALL DAVENPORT**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 777 603 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 PD-L1 ("ligando de muerte programada 1")

La presente invención se refiere al campo de la medicina. Más particularmente, la presente invención se refiere a anticuerpos que se unen al ligando 1 de muerte celular programada 1 (PD-L1) humano, y puede ser útil para el tratamiento de tumores sólidos y hematológicos solos y en combinación con la quimioterapia y otras terapias contra el cáncer.

Las células tumorales escapan a la detección y eliminación por parte del sistema inmunológico a través de múltiples mecanismos. Las rutas de puntos de control inmunológico se utilizan para mantener la autotolerancia y controlar la activación de linfocitos T, pero las células cancerosas pueden usar las rutas para suprimir la respuesta antitumoral y evitar su destrucción.

La ruta PD-L1 / muerte celular programada 1 (PD-1) humana es uno de esos puntos de control inmunológico. La PD-1 humana se encuentra en los linfocitos T, y la unión de PD-L1 a PD-1 inhibe la proliferación de linfocitos T y la producción de citocinas. Los tumores han subyugado al eje inhibidor PD-1/PD-L1 como parte del proceso selectivo natural que conforma la evolución tumoral en el contexto de una respuesta inmunológica antitumoral. PD-L1 también se une a B7-1 (CD80); B7-1 es otro regulador negativo de la activación de los linfocitos T. Por tanto, una variedad de tipos de tumores expresa PD-L1 de forma aberrante, y se ha descubierto que el aumento de la expresión de PD-L1 en las células tumorales está correlacionado con un peor pronóstico en muchos cánceres. La expresión de PD-L1 también está regulada positivamente en el microambiente tumoral en las células inmunitarias y en otras células como resultado de la activación inmunológica y de la producción de citocinas proinflamatorias, contribuyendo además al establecimiento de un entorno inmunosupresor de linfocitos T. Bloquear a PD-L1 puede facilitar la reactivación de los linfocitos T que reaccionan al tumor, restaurando su capacidad de detectar y eliminar eficazmente las células tumorales.

Se ha demostrado que un anticuerpo IgG1 humano contra el PD-L1 humano, MPDL3280A, bloquea la unión a PD-1 y a B7-1, y se ha probado en ensayos clínicos con humanos (Herbst y col. *Nature* (2014) 515:563; Cha y col., *Seminars in Oncology* (2015) 42(3):484; y la solicitud de patente estadounidense 2010/0203056). Se ha demostrado que un anticuerpo IgG1 humano contra el PD-L1 humano, MEDI4736, bloquea la unión a PD-1 y B7-1, y se ha probado en ensayos clínicos con humanos (Ibrahim y col. *Seminars in Oncology* (2015) 42(3):474; y la solicitud de patente estadounidense 2013/0034559).

Sigue siendo necesario proporcionar anticuerpos alternativos que se unan al PD-L1 humano y neutralicen las interacciones de PD-L1 con PD-1 y B7-1. En particular, sigue siendo necesario proporcionar anticuerpos PD-L1 que se unan con características más ventajosas, tales como mejores tasas de asociación. Una asociación más rápida con la diana puede traducirse en una mejor actividad *in vivo* para un anticuerpo terapéutico. También, sigue siendo necesario proporcionar anticuerpos PD-L1 que mejoren aún más la respuesta de los linfocitos T a un tumor, medida por la influencia en el tamaño del tumor, por el nivel de infiltración de linfocitos T CD3-positivos, y por el porcentaje de linfocitos T que son CD8-positivos en modelos *in vivo*.

Ciertos anticuerpos de la presente invención median una mayor respuesta de los linfocitos T a un tumor, medida por el tamaño del tumor en comparación con ciertos anticuerpos de la técnica anterior en modelos de tumores establecidos y no establecidos. Ciertos anticuerpos de la presente invención median una respuesta mejorada de los linfocitos T a un tumor, medida por la infiltración de linfocitos T CD3-positivos en comparación con ciertos anticuerpos de la técnica anterior en un modelo.

Por tanto, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une al PD-L1 humano (SEQ ID NO: 1), que comprende una cadena ligera (LC) y una cadena pesada (HC), en el que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (HCVR), y en el que la LCVR comprende las regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera L1CDR1, L1CDR2 y L1CDR3 que consisten en las secuencias de aminoácidos SGSSSNIGSNTVN (SEQ ID NO: 5), YGNSNRPS (SEQ ID NO: 6) y QSYDSSLGSGV (SEQ ID NO: 7), respectivamente, y en las que la HCVR comprende regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada H1CDR1, H1CDR2 y H1CDR3 que consisten en las secuencias de aminoácidos KASGGTFSSYAIS (SEQ ID NO: 2), GIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 3) y ARSPDYSYYGMDV (SEQ ID NO: 4), respectivamente.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un anticuerpo, que comprende una cadena ligera (LC) y una cadena pesada (HC), en el que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (HCVR), en el que la LCVR tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEQ ID NO: 9 y la HCVR tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEQ ID NO: 8.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un anticuerpo, en el que la LC tiene la secuencia de aminoácidos dada en SEQ ID NO: 11 y la HC tiene la secuencia de aminoácidos dada en SEQ ID NO: 10.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo, que comprende dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, en el que cada cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEQ ID NO: 11 y cada

cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEQ ID NO: 10.

5 En una realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo, en el que una de las cadenas pesadas forma un puente disulfuro intercatenario con una de las cadenas ligeras, y la otra cadena pesada forma un puente disulfuro intercatenario con la otra cadena ligera, y una de las cadenas pesadas forma dos puentes disulfuro intercatenarios con la otra cadena pesada.

En una realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo, en el que el anticuerpo está glicosilado.

10 En una realización, la presente invención proporciona una célula de mamífero, que comprende una molécula de ADN que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 y una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, en la que la célula es capaz de expresar un anticuerpo que comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10.

15 En una realización adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo, que comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, que comprende cultivar una célula de mamífero de la presente invención bajo condiciones tales que el anticuerpo se exprese, y recuperar el anticuerpo expresado.

En una realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo producido por un procedimiento de la presente invención.

20 En una realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica, que comprende un anticuerpo de la presente invención, y un vehículo, diluyente o excipiente aceptable.

25 En el presente documento se desvela un procedimiento para tratar el cáncer, que comprende la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo de la presente invención a un paciente que lo necesite. En el presente documento se desvela además un procedimiento para tratar el cáncer, que comprende la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo de la presente invención a un paciente que lo necesite, en el que el cáncer es un melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de esófago, sarcoma de tejidos blandos o carcinoma hepatocelular.

30 En el presente documento se desvela además un procedimiento para tratar el cáncer, en el que el cáncer es un melanoma. En el presente documento se desvela además un procedimiento para tratar el cáncer, en el que el cáncer es cáncer de pulmón. En el presente documento se desvela además un procedimiento para tratar el cáncer, en el que el cáncer es cáncer de cabeza y cuello. En el presente documento se desvela además un procedimiento para tratar el cáncer, en el que el cáncer es cáncer colorrectal. En el presente documento se desvela además un procedimiento para tratar el cáncer, en el que el cáncer es cáncer de páncreas. En una realización adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar el cáncer, en el que el cáncer es cáncer gástrico. En el presente documento se desvela además un procedimiento para tratar el cáncer, en el que el cáncer es cáncer de riñón. En el presente documento se desvela además un procedimiento para tratar el cáncer, en el que el cáncer es cáncer de vejiga. En el presente documento se desvela además un procedimiento para tratar el cáncer, en el que el cáncer es cáncer de próstata. En el presente documento se desvela además un procedimiento para tratar el cáncer, en el que el cáncer es cáncer de mama. En el presente documento se desvela además un procedimiento para tratar el cáncer, en el que el cáncer es cáncer ovárico. En el presente documento se desvela además un procedimiento para tratar el cáncer, en el que el cáncer es cáncer de esófago. En el presente documento se desvela además un procedimiento para tratar el cáncer, en el que el cáncer es un sarcoma de tejidos blandos. En el presente documento se desvela además un procedimiento para tratar el cáncer, en el que el cáncer es un carcinoma hepatocelular.

45 Como se desvela en el presente documento, estos procedimientos comprenden la administración de una cantidad eficaz del anticuerpo de la presente invención simultáneamente, por separado o en combinación secuencial con uno o más agentes antitumorales. Los ejemplos no limitantes de agentes antitumorales incluyen el ramucirumab, necitumumab, olaratumab, galunisertib, abemaciclib, cisplatino, carboplatino, dacarbazina, doxorubicina liposomal, docetaxel, ciclofosfamida y doxorubicina, navelbina, eribulina, paclitaxel, partículas de paclitaxel unido a proteínas para una suspensión inyectable, ixabepilona, capecitabina, FOLFOX (leucovorina, fluorouracilo y oxaliplatino), FOLFIRI (leucovorina, fluorouracilo e irinotecán), y cetuximab.

50 Como se desvela en el presente documento, estos procedimientos comprenden la administración de una cantidad eficaz del compuesto de la presente invención simultáneamente, por separado o en combinación secuencial con uno o más agentes inmuno-oncológicos. Los ejemplos no limitantes de agentes inmuno-oncológicos incluyen el nivolumab, ipilimumab, pidlizumab, pembrolizumab, tremelimumab, urelumab, lirilumab, atezolizumab y durvalumab.

55 En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención, para su uso en terapia. En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención, para su uso en el tratamiento del cáncer. En una realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente

invención, para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que el cáncer es un melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de esófago, sarcoma de tejidos blandos o carcinoma hepatocelular.

5 En una realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención, para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que el cáncer es un melanoma. En una realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención, para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que el cáncer es cáncer de pulmón. En una realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención, para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que el cáncer es cáncer de cabeza y cuello. En una  
10 realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención, para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que el cáncer es cáncer colorrectal. En una realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención, para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que el cáncer es cáncer de páncreas. En una realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención, para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que el cáncer es cáncer gástrico. En una realización adicional,  
15 la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención, para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que el cáncer es cáncer de riñón. En una realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención, para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que el cáncer es cáncer de vejiga. En una realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención, para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que el cáncer es cáncer de próstata. En una realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención, para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que el cáncer es  
20 cáncer de mama. En una realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención, para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que el cáncer es cáncer ovárico. En una realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención, para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que el cáncer es cáncer de esófago. En una realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención, para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que el cáncer es un sarcoma de tejidos blandos. En una realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención, para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que el cáncer es un carcinoma hepatocelular.

En una realización adicional, la presente invención proporciona el anticuerpo de la presente invención para su uso simultáneamente, por separado o en combinación secuencial con uno o más agentes antitumorales. Los agentes antitumorales pueden seleccionarse del grupo que consiste en el ramucirumab, necitumumab, olaratumab, galunisertib, abemaciclib, cisplatino, carboplatino, dacarbazina, doxorubicina liposomal, docetaxel, ciclofosfamida y doxorubicina, navelbina, eribulina, paclitaxel, partículas de paclitaxel unido a proteínas para una suspensión inyectable, ixabepilona, capecitabina, FOLFOX (leucovorina, fluorouracilo y oxaliplatino), FOLFIRI (leucovorina, fluorouracilo e irinotecán), y cetuximab, en el tratamiento del cáncer.

35 En el presente documento se desvela el anticuerpo de la presente invención para su uso simultáneamente, por separado o en combinación secuencial con uno o más agentes inmuno-oncológicos. En el presente documento se desvela además el anticuerpo de la presente invención para su uso simultáneamente, por separado o en combinación secuencial con uno o más agentes inmuno-oncológicos seleccionados del grupo que consiste en el nivolumab, ipilimumab, pidilizumab, pembrolizumab, tremelimumab, urelumab, lirilumab, atezolizumab y durvalumab, en el  
40 tratamiento del cáncer.

En el presente documento se desvela el uso de un anticuerpo de la presente invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. En el presente documento se desvela además el uso de un anticuerpo de la presente invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, en el que el cáncer es un melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de esófago, sarcoma de tejidos blandos o carcinoma hepatocelular.

En el presente documento se desvela además el uso de un anticuerpo de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en el que dicho medicamento es para administrarse simultáneamente, por separado o secuencialmente con uno o más agentes antitumorales. En el presente documento se desvela además el uso de un anticuerpo de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en el que dicho medicamento es para administrarse simultáneamente, por separado o secuencialmente con uno o más agentes antitumorales seleccionados del grupo que consiste en el ramucirumab, necitumumab, olaratumab, galunisertib, abemaciclib, cisplatino, carboplatino, dacarbazina, doxorubicina liposomal, docetaxel, ciclofosfamida y doxorubicina, navelbina, eribulina, paclitaxel, partículas de paclitaxel unido a proteínas para una suspensión inyectable, ixabepilona, capecitabina, FOLFOX (leucovorina, fluorouracilo y oxaliplatino), FOLFIRI (leucovorina, fluorouracilo e irinotecán), y cetuximab.

En el presente documento se desvela además el uso de un anticuerpo de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en el que dicho medicamento es para administrarse simultáneamente, por separado o secuencialmente con uno o más agentes inmuno-oncológicos. En el presente documento se desvela además el uso de un anticuerpo de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en el que dicho medicamento es para administrarse simultáneamente, por separado o secuencialmente con

uno o más agentes inmuno-oncológicos seleccionados del grupo que consiste en el nivolumab, ipilimumab, pidilizumab, pembrolizumab, tremelimumab, urelumab, lirilumab, atezolizumab y durvalumab, en el tratamiento del cáncer.

5 Un anticuerpo de la presente invención es un complejo polipeptídico modificado mediante ingeniería genética, de origen artificial. Una molécula de ADN como se desvela en el presente documento es una molécula de ADN de origen artificial que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de uno de los polipéptidos en un anticuerpo de la presente invención.

10 El anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo de tipo IgG y tiene cadenas "pesadas" y cadenas "ligeras" que se entrecruzan por medio de puentes disulfuro intra- e inter-catenarios. Cada cadena pesada está compuesta por una HCVR N-terminal y una región constante de cadena pesada ("HCCR"). Cada cadena ligera está compuesta por una LCVR y una región constante de cadena ligera ("LCCR"). Cuando se expresan en ciertos sistemas biológicos, los anticuerpos que tienen secuencias Fc nativas humanas se glicosilan en la región Fc. Típicamente, la glicosilación se produce en la región Fc del anticuerpo en un sitio de N-glicosilación muy conservado. Los N-glicanos se adhieren típicamente a la asparagina. Los anticuerpos también pueden glicosilarse en otras posiciones.

15 Opcionalmente, ciertos anticuerpos de la presente invención contienen una porción Fc que deriva de la IgG<sub>1</sub> humana. Se sabe que la IgG<sub>1</sub> se une a las proteínas de la familia de receptores Fc-gamma (FcγR) así como a la C1q. La interacción con estos receptores puede inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Por lo tanto, opcionalmente, ciertos anticuerpos de la presente invención son un anticuerpo monoclonal totalmente humano que carece de la función efectora Fc (IgG<sub>1</sub>, lambda, Fc-nulo). Para conseguir un anticuerpo IgG<sub>1</sub> Fc-nulo, es necesaria una mutagénesis selectiva de restos dentro de la región CH2 de su región Fc de IgG<sub>1</sub>. Se introducen sustituciones de aminoácidos L234A, L235E, y G237A en Fc de IgG<sub>1</sub> para reducir la unión a FcγRI, FcγRIIa y FcγRIII, y se introducen sustituciones A330S y P331S para reducir la fijación del complemento mediada por C1q.

20 Para reducir la posible inducción de una respuesta inmunológica cuando se dosifica en humanos, ciertos aminoácidos pueden requerir mutaciones de reversión para que coincidan con las secuencias de la línea germinal de los anticuerpos. Ciertos anticuerpos de la presente invención contienen mutaciones E1Q y S94R en la cadena pesada variable y mutaciones T76S y A80S en la cadena ligera variable.

25 Las regiones HCVR y LCVR pueden subdividirse además en regiones de hiper-variabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad ("CDR"), intercaladas con regiones más conservadas, llamadas regiones marco ("FR").

30 Cada HCVR y LCVR se compone de tres CDR y cuatro FR, ordenadas desde el extremo amino-terminal hasta el extremo carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En el presente documento, las tres CDR de la cadena pesada se denominan "HCDR1", "HCDR2" y "HCDR3" y las tres CDR de la cadena ligera se denominan "LCDR1", "LCDR2" y "LCDR3". Las CDR contienen la mayoría de los restos que forman interacciones específicas con el antígeno. Actualmente existen tres sistemas de asignación de CDR para anticuerpos que se utilizan para la delineación de secuencias. La definición de CDR de Kabat (Kabat y col. "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) se basa en la variabilidad de las secuencias de anticuerpos. La definición de CDR de Chothia (Chothia y col. "Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 196, 901-917 (1987); Al-Lazikani y col., "Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997)) se basa en estructuras tridimensionales de anticuerpos y topologías de los bucles de CDR. Las definiciones de CDR de Chothia son idénticas a las definiciones de CDR de Kabat con la excepción del HCDR1 y HCDR2. La definición de CDR de North (North y col. "A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations", Journal of Molecular Biology, 406, 228-256 (2011)) se basa en la agrupación por propagación de afinidad con un gran número de estructuras cristalinas. Para los fines de la presente invención, se utilizan las definiciones de CDR de North.

35 Un ADN aislado que codifica una región HCVR puede convertirse en un gen de cadena pesada de longitud completa mediante la unión operativa del ADN que codifica la HCVR con otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada. En la técnica se conocen las secuencias de los genes de la región constante de la cadena pesada de humano, así como de otros mamíferos. Se pueden obtener fragmentos de ADN que abarcan estas regiones, por ejemplo, mediante amplificación por PCR estándar.

40 Un ADN aislado que codifica una región LCVR puede convertirse en un gen de cadena ligera de longitud completa mediante la unión operativa del ADN que codifica la LCVR a otra molécula de ADN que codifica una región constante de cadena ligera. En la técnica se conocen las secuencias de los genes de la región constante de la cadena ligera de humano, así como de otros mamíferos. Los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse mediante amplificación por PCR estándar. La región constante de la cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda. Preferentemente para anticuerpos de la presente invención, la región constante de la cadena ligera es una región constante lambda.

45 Los polinucleótidos desvelados en el presente documento se expresarán en una célula hospedadora después de que las secuencias se hayan unido operativamente a una secuencia control de la expresión. Los vectores de expresión

son típicamente replicables en los organismos hospedadores, ya sea como episomas o como parte integral del ADN cromosómico del hospedador. De manera habitual, los vectores de expresión contendrán marcadores de selección, por ejemplo, tetraciclina, neomicina y dihidrofolato reductasa, para permitir la detección de las células transformadas con las secuencias de ADN deseadas.

- 5 El anticuerpo de la presente invención puede producirse fácilmente en células de mamíferos tales como células CHO, NS0, HEK293 o COS. Las células hospedadoras se cultivan usando técnicas bien conocidas en la técnica.

Los vectores que contienen las secuencias polinucleotídicas de interés (por ejemplo, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos del anticuerpo y las secuencias de control de la expresión) pueden transferirse a la célula hospedadora mediante procedimientos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de hospedador celular.

- 10 Pueden emplearse varios procedimientos de purificación de proteínas y tales procedimientos se conocen y describen la técnica, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology* 182: 83-89 (1990) y Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, 3ª Edición, Springer, NY (1994).

- 15 En otro aspecto de la presente divulgación, el anticuerpo, o los ácidos nucleicos que codifican el mismo, se proporcionan de forma aislada. Como se usa en el presente documento, el término "aislada" se refiere a una proteína, péptido o ácido nucleico que está libre o sustancialmente libre de cualquier otra especie macromolecular que se encuentre en un ambiente celular. "Sustancialmente libre", como se usa en el presente documento, significa que la proteína, el péptido o ácido nucleico de interés comprende más del 80 % (en una fracción molar) de las especies macromoleculares presentes, preferentemente más del 90 % y, más preferentemente, más del 95 %.

- 20 El anticuerpo de la presente invención, o las composiciones farmacéuticas que componen al mismo, pueden administrarse por vía parenteral (por ejemplo, vía subcutánea e intravenosa). Un anticuerpo de la presente invención puede administrarse a un paciente solo con vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables en dosis únicas o múltiples. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden prepararse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 22ª ed. (2012), A. Loyd y col., Pharmaceutical Press) y, como se desvela en el presente documento, comprenden un anticuerpo, y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

- 25 El término "tratar" (o "tratamiento") se refiere a ralentizar, interrumpir, detener, aliviar, parar, reducir o revertir la progresión o la gravedad de un síntoma, trastorno, condición o enfermedad existente.

- 30 "Se une" como se usa en el presente documento en referencia a la afinidad de un anticuerpo para el PD-L1 humano quiere decir, a menos que se indique lo contrario, una  $K_D$  de menos de aproximadamente  $1 \times 10^{-6}$  M, preferentemente, menos de aproximadamente  $1 \times 10^{-9}$  M como se determina por procedimientos comunes que se conocen en la técnica, que incluyen esencialmente, como se describe en el presente documento, el uso de un biosensor de resonancia de plasmón superficial (SPR) a 37 °C.

- 35 "Cantidad eficaz" significa la cantidad de un anticuerpo de la presente invención o composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la presente invención que provocará la respuesta biológica o médica o el efecto terapéutico deseado en un tejido, sistema, animal, mamífero o humano que pretende conseguir el investigador, médico u otro profesional clínico. La cantidad eficaz del anticuerpo puede variar según factores tales como la patología, la edad, el género y el peso del sujeto, y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el sujeto. Una cantidad eficaz es también aquella en la que se supera cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

- 40 La presente invención se ilustra además con el siguiente ejemplo no limitante.

#### **Ejemplo 1: Expresión y purificación de anticuerpos**

- 45 A continuación, en la sección titulada "Secuencias de aminoácidos y nucleótidos" se enumeran los polipéptidos de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, las secuencias completas de aminoácidos de cadena pesada y ligera del anticuerpo A y las secuencias de nucleótidos que las codifican. En la tabla 1 se muestran adicionalmente, las SEQ ID NO para la cadena ligera, la cadena pesada, la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo A. Los anticuerpos de la presente invención,

- 50 que incluyen, pero sin limitarse a, el anticuerpo A, se pueden fabricar y purificar esencialmente de la siguiente manera. Una célula hospedadora apropiada, tal como HEK 293 o CHO, puede transfectarse de manera transitoria o estable con un sistema de expresión para la secreción de anticuerpos utilizando una proporción de HC:LC de vector predeterminada óptima o un único sistema de vector que codifique tanto HC como LC. El medio clarificado, en el que se ha secretado el anticuerpo, puede purificarse utilizando cualquiera de las muchas técnicas comúnmente utilizadas. Por ejemplo, el medio puede aplicarse convenientemente a una columna MabSelect (GE Healthcare), o a una columna KappaSelect (GE Healthcare) para un fragmento de Fab, que se ha equilibrado con un tampón compatible, tal como tampón fosfato salino (pH 7,4). La columna puede lavarse para eliminar los componentes de unión no específicos. El anticuerpo unido puede eluirse, por ejemplo, mediante gradiente de pH (tal como de tampón Tris 20 mM de pH 7 a 55 tampón citrato de sodio 10 mM de pH 3,0, o de tampón fosfato salino de pH 7,4 a tampón de glicina 100 mM de pH

- 3,0). Las fracciones de anticuerpo se pueden detectar, tal como mediante SDS-PAGE, y luego pueden agruparse. Una mayor purificación es opcional, dependiendo del uso que se quiera dar. El anticuerpo puede concentrarse y/o filtrarse de forma estéril usando técnicas comunes. Los agregados solubles y los multímetros pueden eliminarse eficazmente mediante técnicas comunes, que incluyen la exclusión por tamaño, la interacción hidrófoba, el intercambio iónico, la cromatografía multimodal o la cromatografía de hidroxipatita. La pureza del anticuerpo después de estos pasos de cromatografía es mayor del 95 %. El producto puede congelarse inmediatamente a -70 °C o puede ser liofilizarse.

Tabla 1: SEQ ID NO

	Anticuerpo A
HCVR	8
LCVR	9
Cadena pesada	10
Cadena ligera	11

## Ensayos

### **Actividad *in vivo* - ensayo de WINN**

- 10 La actividad inmunomoduladora *in vivo* de los anticuerpos de la presente invención puede probarse con el ensayo de Winn. En el ensayo de Winn, se inyectan juntas células tumorales humanas y células inmunitarias humanas (alógenas) al mismo tiempo en un ratón inmunodeficiente, y luego se dosifican con un agente inmunomodulador. Se puede evaluar la capacidad del agente inmunomodulador para retrasar o bloquear el crecimiento del tumor en el modelo. Se mide el volumen del tumor para determinar el efecto del agente inmunomodulador en el ensayo y si hay una mejora de la respuesta inmunológica hacia el tumor.

- 15 Como se usa en el presente documento, el 2.14H9OPT es un anticuerpo humano IgG1 PD-L1 que utiliza las secuencias de cadenas pesadas y ligeras de la solicitud de patente estadounidense 2013/0034559. Como se usa en el presente documento, el S70 es un anticuerpo humano IgG1 PD-L1 que utiliza las secuencias de cadenas pesadas y ligeras de la solicitud de patente estadounidense 2010/0203056. Tanto para 2.14H9OPT y como para S70, las cadenas pesadas se fusionaron con la región variable de la región constante de la IgG1 humana que contenía cambios de restos en L234A, L235E, G237A, A330S y P331S, para silenciar las funciones efectoras relacionadas con los receptores Fc gamma y la cascada del complemento. La proteína recombinante se expresó en células de mamíferos y se purificó por los procedimientos de purificación estándar de ProA, tanto para 2.14H9OPT como para S70.

- 20 La mejora de la respuesta inmunológica a los alo-antígenos por los anticuerpos de la presente invención se puede probar en el modelo de xenoinjerto NCI-H292 de NSCLC humano. El día 0, se implantan por vía subcutánea en el costado de ratones NSG de Jackson Laboratories (7 semanas de edad, hembras, en grupos de 8-10 ratones)  $2 \times 10^6$  células H292, o una mezcla de  $2 \times 10^6$  células H292 y  $1 \times 10^6$  PBMC humanas en HBSS (0,2 ml de volumen total). A partir del día 1, los ratones se tratan una vez por semana con una inyección intraperitoneal de anticuerpos a 10 mg/kg. El bienestar y el comportamiento de los animales, incluyendo el acicalamiento y la deambulación, se examinan al menos dos veces por semana.

- 25 El peso corporal y el volumen tumoral se miden dos veces por semana. Las muestras de los tumores se recogen el día 36 para todos los grupos. La tinción inmunohistoquímica (IHC) se realiza en muestras de tumores usando anticuerpos de conejo anti-CD3 de ratón (con reactividad cruzada con el humano, Abcam), seguido de tinción con una IgG secundaria anti-conejo conjugada con HRP (Dako).

- 35 Los volúmenes tumorales se miden dos veces por semana a partir del día 4 después de la implantación de las células utilizando calibradores electrónicos. Volumen del tumor ( $\text{mm}^3$ ) =  $\pi/6 \cdot \text{Longitud} \cdot \text{Anchura}^2$ . La eficacia antitumoral se expresa como porcentaje de la relación T/C y se calcula como se resume a continuación:  
El porcentaje de T/C se calcula con la fórmula  $100 \Delta T/\Delta C$  si  $\Delta T > 0$  de los valores de la media geométrica.  $\Delta T$  = volumen tumoral medio del grupo tratado con fármaco en el día final del estudio - volumen tumoral medio del grupo tratado con fármaco el día inicial de la dosificación;  $\Delta C$  = volumen tumoral medio del grupo de control el día final del estudio - volumen tumoral medio del grupo de control el día inicial de la dosificación. Además, El porcentaje de regresión se calcula usando la fórmula =  $100 \times \Delta T/T_{\text{inicial}}$  si  $\Delta T < 0$ . Los animales sin tumores medibles se consideran respondedores completos (CR) y los tumores con  $>50$  % de regresión son respondedores parciales (PR).

- 45 Los datos del volumen del tumor se analizan hasta el día 35 con un análisis de la varianza de medidas repetidas de dos factores por tiempo y tratamiento usando los procedimientos MIXED en el software SAS (Versión 9.2). La respuesta analizada es la transformación logarítmica del volumen tumoral. La transformación logarítmica es necesaria para igualar la varianza a través del tiempo y los grupos de tratamiento. La estructura de correlación para el modelo de medidas repetidas es la potencia espacial. Se realizan comparaciones predefinidas por parejas del o de los grupos tratados con el o los grupos de control para cada punto temporal.

- 50 Las secciones de tumores del modelo también pueden analizarse para detectar la infiltración de linfocitos T CD3

positivos mediante la medición de la presencia de linfocitos T CD3 positivos utilizando la tinción para CD3 y el análisis con el Aperio Scan Scope. El análisis de imágenes nucleares de IHC macro detecta la tinción nuclear para un cromógeno diana para las células individuales en aquellas regiones que el usuario elija y cuantifica sus intensidades. Se hacen de tres a cinco anotaciones del área viable del tumor y se utilizan para ajustar los parámetros hasta que los resultados del algoritmo generen una identificación celular consistente. A continuación, se guarda el macro y se registran los portaobjetos para su análisis. El porcentaje de células CD3 positivas como porcentaje del número total de células se calcula con el software Aperio.

**Volumen tumoral**

En experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, el anticuerpo A dosificado a 10 mg/kg, una vez por semana, ip se tolera bien, como se observa por el peso corporal y las observaciones clínicas. Cuando no se añaden células inmunitarias al animal inmunodeficiente como grupo de control del experimento (ratones en los que se ha implantado la línea celular de cáncer de pulmón H292, pero sin PBMC), el tratamiento con el anticuerpo A o 2.14H9OPT dosificado a 10 mg/kg, una vez por semana, ip no tiene efecto sobre el crecimiento del tumor H-292 comparado con el tratamiento con IgG humana.

Cuando las células inmunes y el anticuerpo de prueba se añaden al animal inmunodeficiente, el anticuerpo A da un resultado significativamente superior para controlar la IgG, mientras que 2.14H9OPT no lo hace. Los ratones en los que se han coimplantado tumores NCI-H292 y PBMC y dosificados con el anticuerpo A a 10 mg/kg una vez por semana dan como resultado una T/C de 35% que es significativamente diferente de la de los ratones de control tratados con IgG (p = 0,006). Los ratones en los que se han coimplantado tumores NCI-H292 y PBMC dosificados con 2.14H9OPT a 10 mg/kg, una vez por semana, ip dan como resultado una T/C del 54% que no es significativamente diferente en comparación con el tratamiento con IgG humana (P = 0,102).

**Infiltración de linfocitos T CD3 positivos**

En experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, mediante el análisis de IHC, la co-implantación en ratones de la línea de tumor pulmonar H292 y PBMC humanas como grupo de control ocasiona un aumento del 10 % de linfocitos T CD3 humanos presentes en el tumor medido el día 36 después de la implantación, mientras que los animales en los que solo se han implantado células H292 tienen un aumento del 3 % de linfocitos T CD3. El tratamiento con PBMC y el anticuerpo A (dosificado a 10 mg/kg una vez por semana, i.p.) ocasiona un aumento del 13 % de linfocitos T CD3 humanos; la significación estadística del grupo tratado con PBMC + anticuerpo A comparado con el grupo de control PBMC + IgG tiene un valor de p de 0,021. El tratamiento con PBMC y 2.14H9OPT (dosificado a 10 mg/kg, una vez por semana, i.p.) no aumenta el porcentaje de infiltración de linfocitos T CD3 humanos en comparación con los controles tratados con IgG co-implantadas con células H292 y PBMC humanas (9% de linfocitos T CD3 para 2.14H9OPT frente a un 10% de linfocitos T CD3 para el control).

**Modelo de xenoinjerto de tumor humano establecido en ratones NSG humanizados con PBMC**

La eficacia de los anticuerpos de la presente invención puede probarse en el modelo de xenoinjerto NCI-H827 de NSCLC humano para evaluar la capacidad de retrasar o destruir los tumores establecidos en el modelo. En el día 0, se implantan 1x10<sup>7</sup> células H827 por vía subcutánea en el costado de ratones NSG (7 semanas de edad, hembras, 10 ratones por grupo). El día 34, con el xenoinjerto del tumor humano establecido, los ratones se infunden (i.v.) con 5 x10<sup>6</sup> PBMC humanas. A partir del día 35, los ratones se dosifican a 10 mg/kg por semana (3 dosis totales) i.p. con IgG humana o con el anticuerpo PD-L1. El bienestar y el comportamiento de los animales, incluyendo el acicalamiento y la deambulaci3n, se examinan al menos dos veces por semana. El peso corporal y el volumen tumoral se miden dos veces por semana.

En experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, el tratamiento con el anticuerpo A inhibe significativamente el crecimiento del tumor en los ratones NSG humanizados, comparado con el tratamiento con IgG humana (tabla 2).

**Tabla 2: Volumen tumoral (mm<sup>3</sup>) en el modelo de xenoinjerto NCI-H827 de NSCLC humano**

Tratamiento	Días	21	28	30	34	36	40	43	47
IgG Hu	Media	156	290	337	397	445	726	779	883

	EEM (error estándar de la media)	15	13	24	34	60	59	75	78
<b>Anticuerpo A</b>	Media	163	293	336	367	379	433	557	468
	EEM (error estándar de la media)	13	26	25	20	51	35	54	41

<b>Tratamiento</b>	<b>Días</b>	<b>50</b>	<b>55</b>	<b>57</b>	<b>62</b>	<b>65</b>	<b>69</b>	<b>72</b>	<b>76</b>
<b>IgG Hu</b>	Media	959	1000	1241	1345	1530	1508	1854	2056
	EEM (error estándar de la media)	87	69	102	91	52	90	121	123
<b>Anticuerpo A</b>	Media	503	593	580	672	625	775	772	691
	EEM (error estándar de la media)	76	85	105	154	170	202	221	231

La eficacia de los anticuerpos de la presente invención también se puede probar midiendo la respuesta inmunológica a los alo-antígenos en el modelo de xenoinjerto NCI-H292 de NSCLC humano.

- 5 El día 0, se implantan  $2 \times 10^6$  células H292 por vía subcutánea en el costado de ratones NSG (7 semanas de edad, hembras, 10 ratones por grupo). El día 17, después de que el tumor se establezca, los ratones se infunden (i.v.) con  $10 \times 10^6$  PBMC humanas. A partir del día 18, los ratones se dosifican con anticuerpo a 10 mg/kg por semana x3 (3 dosis totales) i.p.s. El bienestar y el comportamiento de los animales, incluyendo el acicalamiento y la deambulación, se examinan al menos dos veces por semana. El peso corporal y el volumen tumoral se miden dos veces por semana.
- 10 Los días 32-36, se sacrifican los ratones y se analiza la sangre con respecto al injerto de linfocitos T periféricos utilizando tubos de TruCount™ para evaluar el impacto sobre el injerto periférico del compartimiento de linfocitos T humanos, así como el fenotipo de agotamiento de los subgrupos de linfocitos T.

15 En experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo con dos ratones por grupo, los ratones portadores de tumores tratados con el anticuerpo A muestran una relación CD4:CD8 alterada que favorece el compartimiento CD8 en comparación con el grupo tratado con IgG humana (tabla 3; el 63 % de los linfocitos T fueron CD8 para el anticuerpo A, en comparación con el 47% para el control de IgG). El grupo tratado con el anticuerpo A no difiere significativamente del grupo tratado con IgG en cuanto a los recuentos absolutos de linfocitos T periféricos (recuento de CD4 + recuento de CD8), pero sí muestra mayores recuentos de linfocitos T periféricos que el grupo tratado con 2.14H9OPT ( $43 \times 10^3 / \mu\text{l}$  de sangre para hlgG,  $45 \times 10^3$  células /  $\mu\text{l}$  de sangre para el anticuerpo A y  $10 \times 10^3$  células /  $\mu\text{l}$  de sangre para el 2.14H9OPT).

20

Cuando se examina la activación de las células T, los niveles de PD-1 en las células T pueden verse como un sello distintivo de linfocitos T agotados. Un número menor de linfocitos T PD-1+ frente al control, sugiere una mayor activación de los linfocitos T con el anticuerpo PD-L1. En este estudio con dos ratones por grupo, se observa una disminución de la expresión de PD-1 en los linfocitos T del grupo tratado con el anticuerpo A (15% PD-1+) y del grupo tratado con 2.14H9OPT (32% PD-1+) en comparación con el grupo tratado con IgG (53% PD-1+).

25

**Tabla 3: Efecto del tratamiento con el anticuerpo A en un injerto de linfocitos T periféricos en el modelo de xenoinjerto NCI-H292 de NSCLC humano**

Tratamiento	Ratón	Recuento de CD8	Recuento de CD4	Relación CD4/CD8
PBMC 10M + hlgG	n.º 1	16801	19591	1,17
	n.º 2	23832	26295	1,10

(continuación)

Tratamiento	Ratón	Recuento de CD8	Recuento de CD4	Relación CD4/CD8
PBMC 10M + 2.14H9OPT	n.º 1	9317	8611	0,52
	n.º 2	1577	1419	0,67
PBMC 10M + anticuerpo A	n.º 1	28879	15095	0,92
	n.º 2	27450	18319	0,90

### Reacción linfocitaria mixta

La función de bloqueo de las señales de PD-L1 por los anticuerpos de la presente invención puede evaluarse midiendo la liberación de citocinas durante la activación de los linfocitos T. Es de esperar que aumenten los niveles de ciertas citocinas, tales como IFN- $\gamma$ , si se promueve la activación de los linfocitos T mediante el tratamiento con anticuerpos de la presente invención.

Se aíslan los monocitos CD14+ a partir de PBMC humanos frescos obtenidos de un donante sano (AllCells) con microesferas MACS (Miltenyi). Se generan células dendríticas inmaduras (DC) mediante el cultivo de estos monocitos en 12 ml de medio RPMI-1640 completo en presencia de 1000 UI/ml de hGM-CSF y 500 UI/ml de hIL-4 durante 4 días. Las células T CD4+ se purifican a partir de PBMC humanas frescas de un donante sano diferente (AllCells) mediante selección negativa (Milteny). Luego, se mezclan los dos tipos de células en pocillos individuales de una placa de 96 pocillos con 100  $\mu$ l de medio AIM-V completo que contiene  $1 \times 10^5$  linfocitos T CD4+ y  $4 \times 10^3$  DC inmaduras por pocillo (E:T = 25:1). Se añaden 100  $\mu$ l de medio AIM-V completo que contiene una concentración 2 nM de anticuerpo IgG1 humano o de PD-L1 humano en 6 réplicas. Después de incubar durante 2 días a 37 °C al 5% de CO<sub>2</sub>, se recogen los sobrenadantes y se miden con respecto al IFN- $\gamma$  humano con un kit ELISA (R&D Biosystems).

En experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, La adición de cada anticuerpo, anticuerpo A, S70 o 2.14H9OPT, aumenta la producción de IFN- $\gamma$  por los linfocitos T de manera dependiente de la dosis. A la concentración más alta probada (33,3 nM), el anticuerpo A tiene un aumento de 5,71 veces en comparación con 3,05 veces (S70) y 4,51 veces (2.14H9OPT).

**Tabla 4: Cambio en veces de la secreción de IFN- $\gamma$  vs. el control de IgG**

	Concentración de anticuerpo (nM)					
	0,01	0,05	0,27	1,3	6,7	33,3
Anticuerpo A	1,25	1,95	2,68	4,13	4,11	5,71
S70	1,03	1,40	1,90	2,27	2,82	3,05
2.14H9OPT	1,26	2,27	2,96	4,55	3,24	4,51

### Dominancia de la cadena pesada del anticuerpo

La estructura del co-complejo del anticuerpo A/hPD-L1 se resuelve para dos cristales separados a resoluciones de 3,7Å y 3,2Å. Cuando se analizan, cada uno muestra la región HCDR3 del anticuerpo A contactando directamente con el hPD-L1 mientras que la LCDR3 del anticuerpo A se aparta del epítopo. Las CDR de la cadena ligera del anticuerpo A no tienen contactos significativos con ninguno de los dominios hPD-L1. Dentro de un límite de 6Å, el parátipo del anticuerpo A está compuesto por dieciocho restos de cadena pesada y solo siete restos de cadena ligera. Los aminoácidos del sitio de unión a PD-L1/PD-1 han sido documentados en Lin y col. (2008) PNAS 105(8):3011-3016. Los contactos realizados por la cadena ligera variable del anticuerpo A en PD-L1 no son los aminoácidos implicados en la interacción PD-L1/PD-1.

Para confirmar la dominancia de la cadena pesada del anticuerpo A visto en la estructura cristalina, se mide el efecto sobre la unión para los anticuerpos en los que la cadena pesada del anticuerpo A se empareja con cadenas ligeras menores que reemplazan a la cadena ligera del anticuerpo A. Un emparejamiento produjo un anticuerpo que se unió mediante ELISA a PD-L1 de forma comparable al anticuerpo A; este anticuerpo contenía una cadena ligera en la que ninguno de los aminoácidos del parátipo del anticuerpo A se conservaba en CDR de cadena ligera variable. Este resultado sugiere que la unión a PD-L1 por el anticuerpo A está casi completamente mediada por la cadena pesada. Puede analizarse la huella termodinámica del anticuerpo A para evaluar si la dominancia de la cadena pesada afecta positivamente a la unión de PD-L1.

### Deconvolución de la huella termodinámica del anticuerpo A

Una mejor asociación de un anticuerpo con la diana puede ser crítica en el desarrollo de un anticuerpo para uso terapéutico. Un anticuerpo que reconoce rápidamente y se une a la diana es una característica deseable para un anticuerpo para uso terapéutico. Una dominancia de unión a la cadena pesada del anticuerpo puede significar que se necesita que se produzcan menos cambios conformacionales antes de la unión.

Para evaluar la posibilidad de que la dominancia de la cadena pesada del anticuerpo A produzca características de unión deseables, se somete a deconvolución la firma termodinámica del bloqueo de PD-L1. Los estudios termodinámicos se realizan en los Fab del anticuerpo A, S70 y 2.14H9OPT.

5 Las cadenas pesadas y ligeras del Fab del anticuerpo A, Fab de S70 y Fab de 2.14H9OPT se clonan en el vector GS. Se cultivan células humanas 293-Freestyle (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) y se transfectan con los vectores GS de acuerdo con las especificaciones del fabricante en cultivos en matraz de agitación de suspensión. En resumen, se deja que el ADN del plásmido sin cortar y 293 fectin formen un complejo durante 25 min. Se resuspenden células HEK 293 en medio fresco (con agitación vorticial para eliminar los grumos) y posteriormente se combinan con el complejo de ADN/fectin antes de la incubación a 37 °C. El sobrenadante acondicionado se recoge después de 6 días y se  
10 analiza la expresión de las proteínas. Para purificar todos los Fab del sobrenadante de expresión de las células HEK 293 se utiliza el kit CaptureSelect™ IgG-CH1 Affinity Matrix (Thermo Fisher Scientific).

La unión de los Fab se realiza por resonancia de plasmón superficial (SPR). La inmovilización por acoplamiento amínico del monómero de PD-L1 humano como ligando en la superficie del chip sensor se realiza a 25 °C. Como analito se utilizan el Fab-anticuerpo A, el Fab-S70 y el Fab-2.14H9OPT y se inyectan sobre la superficie del chip sensor inmovilizado de monómero de PDL-1 humano. Todos los analitos de la muestra se procesan en diluciones seriadas triples (concentraciones iniciales de 3 nM para el anticuerpo A y 9 nM tanto para el S70 como para el 2.14H9OPT), 6 diluciones totales con un duplicado a una concentración media y un cero. Los gradientes de la muestra se preparan en el tampón de migración HBS-EP (HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,005 % v/v de surfactante P20). Los experimentos de unión se repiten a cuatro temperaturas diferentes: 20 °C, 25 °C, 37 °C y 42 °C. A lo largo  
15 de los experimentos cinéticos, el caudal se mantiene a 30 µl/min y el tiempo de asociación/contacto a 180 segundos para los tres Fab. Los tiempos de disociación son de 600 segundos para el Fab-S70 y 420 segundos para el Fab-anticuerpo A y Fab-2.14H9OPT. Después de la disociación, una solución de NaCl 0,75 M y NaOH 25 mM regenera el hPD-L1 inmovilizado, y luego la superficie se estabiliza durante 30 segundos con el tampón de migración. Los tiempos de regeneración del contacto son de 18 segundos, 24 segundos y 30 segundos para Fab-2.14H9OPT, Fab-S70 y Fab-anticuerpo A consecutivamente. La cinética de unión se analiza con el software de evaluación Biacore T200 (versión 3.0). Los datos están referenciados a una celda de flujo en blanco y los datos están ajustados al modelo de unión de Langmuir 1:1.  
20

Se usan gráficas de Van't Hoff para interacción del monómero de hPD-L1 con los Fab de anticuerpo A, S70 y 2.14H9OPT. El estado estacionario, la asociación y la disociación son las tres fases de unión analizadas. Se utiliza MATLAB para el análisis de regresión lineal. La medida de la bondad del ajuste de la regresión lineal  $R^2$  fue  $\geq 0,97$  para los tres Fab en las tres fases de unión.  
25

En experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, la T de Student LSMeans demuestra que las pendientes de todas las gráficas lineales son estadísticamente diferentes entre sí, excepto en las gráficas lineales de la fase de disociación del Fab-2.14H9OPT y Fab-anticuerpo A.  
30

Para la asociación, la interacción del Fab-anticuerpo A/hPD-L1 tiene la fase de asociación más favorable entre todos los complejos.  $\Delta S_{on}$  es una medida de asociación; cuanto más negativo sea el valor de  $\Delta S_{on}$ , más favorable es la interacción. El anticuerpo A tiene un valor  $\Delta S_{on}$  de -26,0 mientras que S70 y 2.14H9OPT tienen valores de  $\Delta S_{on}$  de -11,7 y -19,4, respectivamente. Estos datos demuestran una interacción de asociación más favorable para el anticuerpo A con PD-L1 que para S70 y 2.14H9OPT bajo estas condiciones.  
35

#### 40 Cinética de unión y afinidad

La constante de disociación cinética y de equilibrio ( $K_D$ ) para el PD-L1 humano se determina para los anticuerpos de la presente invención utilizando la resonancia de plasmón superficial (Biacore).

La inmovilización de los anticuerpos de la presente invención como ligandos sobre la superficie del chip sensor se realiza a 25 °C. La proteína de fusión soluble humana PD-L1-Fc (y en algunos casos, proteínas de fusión de mono cynomolgus PD-L1-Fc) se inyecta como analito en concentraciones que oscilan entre 0,0123 nM y 9 nM. El análisis se realiza a 37 °C. El tiempo de contacto para cada muestra es de 180 segundos a 30 µl/min. El tiempo de disociación fue de 240-1500 segundos. La superficie inmovilizada se regenera durante 18 segundos con NaCl 0,95 M / NaOH 25 mM a 30 µl/min, y luego se estabiliza durante 30 segundos. La cinética de unión se analiza con el software de evaluación Biacore T200 (versión 3.0). Los datos están referenciados en una celda de flujo en blanco, y los datos  
45 están ajustados a un modelo de unión 1:1.  
50

En experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, El anticuerpo A se une al PD-L1 humano con una  $K_D$  de 82 pM.

**Tabla 5: Unión del anticuerpo A mediante SPR**

Unión al anticuerpo A	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	$K_D$ (pM)
PD-L1 humano	1,40E+06	1,14E-04	82
PD-L1 Cyno	1,51E+06	1,84E-04	122

**Análisis ELISA: El anticuerpo A se une al PD-L1 recombinante**

La capacidad de los anticuerpos de la presente invención para unirse al PD-L1 humano puede medirse con un ensayo ELISA. Para el ensayo de unión de PD-L1, se recubre una placa de 96 pocillos (Nunc) con PD-L1-Fc humano (R&D Systems) durante la noche a 4 °C. Los pocillos se bloquean durante 2 h con tampón de bloqueo (PBS que contiene un 5% de leche en polvo descremada). Los pocillos se lavan tres veces con PBS que contiene 0,1% de Tween-20. Se añade el anticuerpo anti-PD-L1 o la IgG de control (100 µl) y se incuba a temperatura ambiente durante 1 h. Después del lavado, la placa se incuba con 100 µl de conjugado IgG F(ab')<sub>2</sub>-HRP anti-humano de cabra (Jackson Immuno Research) a temperatura ambiente durante 1 h. Las placas se lavan y luego se incuban con 100 µl de 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina. La absorbancia se lee a 450 nm en un lector de microplacas. La concentración semimáxima eficaz (CE50) se calcula utilizando el software GraphPad Prism 6.

En experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, El anticuerpo A se une al PD-L1 humano con una CE50 de 0,11 nM. El anticuerpo A conserva sus actividades de unión después de 4 semanas bajo tres condiciones de temperatura, 4 °C, 25 °C y 40 °C. El anticuerpo A mostró una actividad de unión al PD-L1 similar a la de S70 y 2.14H9OPT.

**15 Análisis de citometría de flujo: El anticuerpo A se une a PD-L1 en la superficie celular**

La capacidad de los anticuerpos de la presente invención para unirse al PD-L1 humano en la superficie celular puede medirse con un ensayo de citometría de flujo. Se añaden células MDA-MB 231 (línea celular de adenocarcinoma de mama humano PD-L1 positivo) a una placa de fondo en U de 96 pocillos a 1,5x10<sup>5</sup> células por pocillo en 200 µl de tampón de tinción y se incuban a 4 °C durante 30 min. Las placas se centrifugan a 1200 rpm durante 5 min y se retira el sobrenadante. Se añaden 100 µl de anticuerpo-biotina (diluido en serie 1:4 a partir de 10 µg/ml). Se evalúan un total de 6 diluciones en serie. Después de la incubación a 4 °C durante 30 min, las células se lavan dos veces con DPBS. Se añaden 100 µl de tampón de detección que contiene 5 µl de estreptavidina-PE. Después de la incubación a 4 °C durante 30 minutos más, la placa se centrifuga y se lava dos veces con DPBS. Las células se vuelven a suspender en 200 µl de DPBS para el análisis FACS.

En experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, El anticuerpo A se une a PD-L1 en la superficie de las células MDA-MB231 de manera dependiente de la dosis con una CE50 de 0,14 nM.

**Análisis ELISA: El anticuerpo A bloquea la interacción de PD-L1 con PD-1**

La capacidad de los anticuerpos de la presente invención para bloquear la unión de PD-L1 a PD-1 puede medirse en un ensayo ELISA. Para el ensayo de bloqueo receptor-ligando, se mezclan cantidades variables (de anticuerpo anti-PD-L1 o IgG de control con una cantidad fija de proteína de fusión biotinilada PD-L1-Fc (100 ng/pocillo) y se incuban a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla se transfiere a placas de 96 pocillos previamente recubiertas con PD-1-Fc (1 µg/ml) y luego se incuba a temperatura ambiente durante 1 h más. Después del lavado, se añade el conjugado de estreptavidina HRP y se lee la absorbancia a 450 nm. La CI50 representa la concentración de anticuerpos requerida para la inhibición del 50% de la unión de PD-L1 a PD-1.

En experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, El anticuerpo A bloquea la interacción de PD-L1 con PD-1 con una CI50 de 0,95 nM. El anticuerpo A mantiene su actividad de bloqueo después de 4 semanas bajo las tres condiciones de temperatura, 4 °C, 25 °C y 40 °C. El anticuerpo A demuestra una capacidad para bloquear la interacción de PD-L1 con PD-1 similar a la de S70 y 2.14H9OPT.

**Análisis ELISA: El anticuerpo A bloquea la interacción de PD-L1 con B7-1**

El PD-L1 humano también se une a B7-1. La capacidad de los anticuerpos de la presente invención para bloquear la unión de PD-L1 a B7-1 puede medirse en un ensayo ELISA. El procedimiento para el ensayo de bloqueo de PD-L1/B7-1 es similar al del ensayo de bloqueo de PD-L1/PD-1, excepto que las placas están recubiertas con 1 µg/ml de B7-1-Fc (R&D Systems). La concentración de anticuerpos necesaria para la inhibición del 50% de la unión de PD-L1 a PD-1 (CI50) se calcula con el software GraphPad prism 6.

En experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, El anticuerpo A bloquea la interacción de PD-L1 con B7-1 con una CI50 de 2,4 nM. El anticuerpo A muestra una capacidad de bloqueo de la interacción de PD-L1 con el receptor B7-1 similar a la de S70 y 2.14H9OPT.

**Secuencias de aminoácidos y de nucleótidos**

SEQ ID NO: 1 (PD-L1 humano)

ES 2 777 603 T3

MRIFAVFIFMTYWHLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIV  
YWEMEDKNIIQFVHGEECLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDA  
GVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPTSEHELTCQAEGYPKA  
EVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENH  
TAEVLPELPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQD  
TNSKKQSDTHLEET

SEQ ID NO: 2 (HCDR1 del anticuerpo A)  
KASGGTFSSY AIS

5 SEQ ID NO: 3 (HCDR2 del anticuerpo A)  
GIIPFGTANYA QKFQG

SEQ ID NO: 4 (HCDR3 del anticuerpo A)  
ARSPDYSPYYYYGMDV

SEQ ID NO: 5 (LCDR1 del anticuerpo A)  
SGSSSNIGSNTVN

10 SEQ ID NO: 6 (LCDR2 del anticuerpo A)  
YGNSNRPS

SEQ ID NO: 7 (LCDR3 del anticuerpo A)  
QSYDSSLSGSV

SEQ ID NO: 8 (HCYR del anticuerpo A)

15 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWMGGIIPF  
GTANYA QKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARSPDYSPYYYYG  
MDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 9 (LCVR del anticuerpo A)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRP  
SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCQSYDSSLSGSVFGGGIKLTVLG

SEQ ID NO: 10 (HC del anticuerpo A)

15 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWMGGIIPF  
GTANYA QKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARSPDYSPYYYYG  
MDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS  
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD  
KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH  
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
CKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD  
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE  
ALHNHYTQKSLSLSPGK

20 SEQ ID NO: 11 (LC del anticuerpo A)

ES 2 777 603 T3

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRP  
SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCQSYDSSLSGSVFGGGIKLTVLGQ  
PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT  
PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAEC

SEQ ID NO: 12 (ADN de la HC del anticuerpo A)

CAGGTCCAGCTGGTCCAGTCAGGGGCCGAGGTCAAAAAGCCAGGGTCATCTG  
TCAAAGTGTCTTGTAAGGCATCCGGGGGCACATTTTCCAGCTACGCTATCTCC  
TGGGTGAGACAGGCACCCAGGGCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCGGAATCATT  
CCATCTTCGGGACCGCCAACTACGCTCAGAAGTTTCAGGGAAGGGTCACTATT  
ACCGCCGACAAAAGCACATCTACTGCTTATATGGAGCTGTCTAGTCTGAGGTC  
TGAAGATACCGCAGTGTACTATTGCGCCCGGAGTCCCGACTATAGCCCTTACT  
ATTACTATGGCATGGATGTCTGGGGCCAGGGAACCACAGTGACAGTCTCATC  
CGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCA  
CCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA  
ACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC  
TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAC  
CGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC  
AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACA  
AAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGAGGGGGCACCGTC  
AGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC  
CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA  
GTTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG  
CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC  
TGCACCAAGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA  
AGCCCTCCCATCCTCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCC  
CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGA  
ACCAAGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC  
GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACAAGACCACGCCT  
CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATTCCAAGCTCACCGTGGA  
CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG  
GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGCAA

SEQ ID NO: 13 (ADN de la LC del anticuerpo A)

CAGTCCGTCCTGACACAGCCACCCTCAGCCTCTGGCACCCCTGGGCAGCGAGT  
GACAATCTCTTGTCTGGGAGTTCCTCAAATATTGGTAGTAACACCGTGAATT  
GGTACCAGCAGCTGCCCCGGCACAGCACCTAAGCTGCTGATCTATGGAACTC  
AAATAGGCCATCCGGAGTCCCCGACCGGTTCTCTGGTAGTAAATCAGGCACTT  
CCGCCAGCCTGGCTATTAGCGGGCTGCAGTCTGAGGACGAAGCCGATTACTA  
TTGCCAGTCTTACGATTCCAGCCTGTCTGGAAGTGTGTTTGGCGGAGGGATCA  
AGCTGACCGTCTGGGCCAGCCTAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCG  
CCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAG  
TGAATTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCC  
GTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAG  
TACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACA  
GAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAG  
TGGCCCCTGCAGAATGCTCT

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Eli Lilly and Company
- <120> Anticuerpos PD-L1
- 5 <130> X20754
- <150> 62/209056
- <151> 24/08/2015
- <160> 13
- <170> PatentIn versión 3.5
- 10 <210> 1
- <211> 290
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 15 <223> Construcción sintética
- <400> 1

ES 2 777 603 T3

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu  
 1 5 10 15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr  
 20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu  
 35 40 45

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile  
 50 55 60

Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser  
 65 70 75 80

Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn  
 85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr  
 100 105 110

Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val  
 115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val  
 130 135 140

Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr  
 145 150 155 160

ES 2 777 603 T3

Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser  
 165 170 175

Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn  
 180 185 190

Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr  
 195 200 205

Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu  
 210 215 220

Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His  
 225 230 235 240

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr  
 245 250 255

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys  
 260 265 270

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu  
 275 280 285

Glu Thr  
 290

<210> 2  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 2  
 Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser  
 1 5 10

10 <210> 3  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 3  
 Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

ES 2 777 603 T3

1

5

10

15

Gly

5 <210> 4  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 4  
 Ala Arg Ser Pro Asp Tyr Ser Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5 10 15

10 <210> 5  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Construcción sintética  
 <400> 5  
 Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn  
 1 5 10

20 <210> 6  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 6  
 Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser  
 1 5

25 <210> 7  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> Construcción sintética  
 <400> 7  
 Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val  
 1 5 10

35 <210> 8  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 40 <400> 8

ES 2 777 603 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Pro Asp Tyr Ser Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 9  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 9

ES 2 777 603 T3

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn  
 20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln  
 65 70 75 80

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

Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Ile Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110

<210> 10

<211> 453

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 10

ES 2 777 603 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Pro Asp Tyr Ser Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
 130 135 140

ES 2 777 603 T3

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
 145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys  
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala  
 225 230 235 240

Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser  
 325 330 335

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 385 390 395 400

ES 2 777 603 T3

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys  
450

<210> 11

<211> 216

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 11

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn  
20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln  
65 70 75 80

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

Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Ile Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln  
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu  
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr  
130 135 140

ES 2 777 603 T3

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys  
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr  
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His  
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys  
195 200 205

Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser  
210 215

<210> 12

<211> 1359

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 12

ES 2 777 603 T3

cagggtccagc tgggtccagtc aggggcccagag gtcaaaaagc cagggtcatc tgtcaaagtg 60  
tcttgtaagg catccggggg cacatthttcc agctacgcta tctcctgggt gagacaggca 120  
ccagggcagg gtctggagtg gatgggcccga atcattccca tcttcgggac cgccaactac 180  
gctcagaagt ttcagggag ggtcactatt accgcccagaca aaagcacatc tactgcttat 240  
atggagctgt ctagtctgag gtctgaagat accgcagtgt actattgccc ccggagtccc 300  
gactatagcc cttactatta ctatggcatg gatgtctggg gccaggggaa cacagtgaca 360  
gtctcatccg ctagcaccaa gggcccacatc gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc 420  
acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg 480  
acgggtgctg ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 540  
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgcctccag cagcttgggc 600  
accagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaagggt ggacaagaga 660  
gttgagcca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaagcc 720  
gagggggcac cgtcagtctt cctcttcccc caaaaccca aggacaccct catgatctcc 780  
cggaccctg aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag 840  
ttcaactggt atgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 900  
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca agactggctg 960  
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tccatcctc catcgagaaa 1020  
  
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc 1080  
cgggaggaga tgaccaagaa ccaagtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc 1140  
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1200  
cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttcctctatt ccaagctcac cgtggacaag 1260  
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1320  
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggcaaa 1359

<210> 13  
<211> 648  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> Construcción sintética

<400> 13

ES 2 777 603 T3

cagtccgtcc tgacacagcc accctcagcc tctggcacc	ctgggcagcg agtgacaatc	60
tcttgttctg ggagttcctc aaatattggt agtaacaccg	tgaattggta ccagcagctg	120
cccggcacag cacctaagct gctgatctat ggaaactcaa	ataggccatc cggagtcccc	180
gaccggttct ctggtagtaa atcaggcact tccgccagcc	tggctattag cgggctgcag	240
tctgaggacg aagccgatta ctattgccag tcttacgatt	ccagcctgtc tggaaagtgtg	300
tttggcggag ggatcaagct gaccgtcctg ggccagccta	aggctgcccc ctcggtcact	360
ctgttccgc cctcctctga ggagcttcaa gccacaagg	ccacactggg gtgtctcata	420
agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg gcctggaagg	cagatagcag ccccgtaag	480
gcgggagtgg agaccaccac accctccaaa caaagcaaca	acaagtacgc ggccagcagc	540
tacctgagcc tgacgcctga gcagtggaag tcccacagaa	gctacagctg ccaggtcacg	600
catgaagggg gcaccgtgga gaagacagtg gccctgcag	aatgctct	648

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une al PD-L1 humano (SEQ ID NO: 1), que comprende una cadena ligera (LC) y una cadena pesada (HC), en el que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (HCVR), y en el que la LCVR comprende las regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera LCDR1, LCDR2 y LCDR3 que consisten en las secuencias de aminoácidos SGSSSNIGSNTVN (SEQ ID NO: 5), YGNSNRPS (SEQ ID NO: 6) y QSYDSSLGSGV (SEQ ID NO: 7), respectivamente, y en el que la HCVR comprende regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada HCDR1, HCDR2 y HCDR3 que consisten en las secuencias de aminoácidos KASGGTFSSY AIS (SEQ ID NO: 2), GIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 3) y ARSPDYSYYGMDV (SEQ ID NO: 4), respectivamente.
2. Un anticuerpo, que comprende una cadena ligera (LC) y una cadena pesada (HC), en el que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (HCVR), en el que la LCVR tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEQ ID NO: 9 y la HCVR tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEQ ID NO: 8.
3. El anticuerpo de la reivindicación 2, en el que la LC tiene la secuencia de aminoácidos dada en SEQ ID NO: 11 y la HC tiene la secuencia de aminoácidos dada en SEQ ID NO: 10.
4. El anticuerpo de la reivindicación 3, que comprende dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, en el que cada cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEQ ID NO: 11 y cada cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEQ ID NO: 10.
5. El anticuerpo de la reivindicación 4, en el que una de las cadenas pesadas forma un puente disulfuro intercatenario con una de las cadenas ligeras, y la otra cadena pesada forma un puente disulfuro intercatenario con la otra cadena ligera, y una de las cadenas pesadas forma dos puentes disulfuro intercatenarios con la otra cadena pesada.
6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el anticuerpo está glicosilado.
7. Una célula de mamífero que comprende una molécula de ADN que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 y una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, en la que la célula es capaz de expresar un anticuerpo que comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10.
8. Un procedimiento de producción de un anticuerpo que comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, que comprende cultivar la célula de mamífero de la reivindicación 7 bajo condiciones tales que el anticuerpo es expresado, y recuperar el anticuerpo expresado.
9. Un anticuerpo producido por el procedimiento de la reivindicación 8.
10. Una composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o 9, y un vehículo, diluyente o excipiente aceptable.
11. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o 9, para su uso en terapia.
12. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o 9, para su uso en el tratamiento del cáncer.
13. El anticuerpo para su uso de la reivindicación 12, en el que el cáncer es un melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de esófago, sarcoma de tejidos blandos o carcinoma hepatocelular.
14. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o 9 para su uso simultánea, por separado o en combinación secuencial con uno o más agentes antitumorales, en el tratamiento del cáncer.
15. El anticuerpo para su uso de la reivindicación 14, en el que el cáncer es un melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de esófago, sarcoma de tejidos blandos o carcinoma hepatocelular.