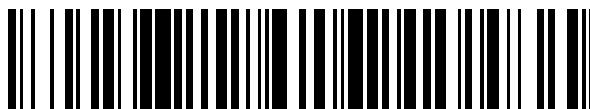


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 792 183**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.09.2013** **PCT/CN2013/083467**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.03.2015** **WO15035606**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2013** **E 13893636 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020** **EP 3044234**

54 Título: **Anticuerpos anti-PD1 y su uso como productos terapéuticos y de diagnóstico**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.11.2020

73 Titular/es:

BEIGENE SWITZERLAND GMBH (100.0%)
c/o VISCHER AG, Aeschenvorstadt 4
4051 Basel, CH

72 Inventor/es:

SONG, JING;
LI, KANG;
ZHANG, TONG;
XU, LANLAN;
LIU, QI y
PENG, HAO

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 792 183 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 anti-PD1 y su uso como productos terapéuticos y de diagnóstico

5 Introducción

La muerte programada 1 (PD-1, también denominada CD279) es una proteína receptora de 55 KD relacionada con la familia de receptores coestimulantes/inhibidores de CD28/CTLA4 (Blank *et al.*, 2005 Cancer Immunol Immunother 54:307-314). Los genes y ADNc que codifican PD-1 se clonaron y caracterizaron en ratón y ser humano (Ishida *et al.*, 1992 EMBO J 11:3887-3395; Shinohara *et al.*, 1994 Genomics 23:704-706). La PD-1 de longitud completa
10 contiene 288 restos de aminoácidos (número de referencia del NCBI: NP_005009). Su dominio extracelular consiste en los restos de aminoácidos 1-167 y la cola C terminal citoplasmática comprende los restos 191-288, que tiene dos motivos reguladores inmunitarios hipotéticos, un motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM; Vivier *et al.*, 1997 Immunol Today 18:286-291) y un motivo de cambio de tirosina inmunorreceptora (ITSM; Chemnitz *et al.*,
15 2004 J Immunol 173:945-954).

Hasta ahora, se han identificado dos ligandos relacionados con la secuencia, PD-L1 (B7-H1) y PD-L2 (B7-DC), que interaccionan específicamente con PD-1, induciendo transducción de señal intracelular que inhibe la activación de linfocitos T mediada por CD3 y CD28 (Riley, 2009 Immunol Rev 229: 114-125), que, a su vez, atenúa actividades de linfocitos T, por ejemplo, la reducción de la proliferación celular, la secreción de IL-2 e IFN- γ , así como la secreción de otros factores de crecimiento y citocinas.

La expresión de PD-1 se ha encontrado frecuentemente en linfocitos inmunitarios tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos y linfocitos citolíticos naturales (NK). Se ha expresado con poca frecuencia en otros tejidos humanos, tales como músculo, epitelio, tejidos neuronales, etc. Asimismo, el alto nivel de expresión de PD-1 se asocia a frecuencia con la activación de células inmunitarias. Por ejemplo, cuando la línea de linfocitos T humanos, Jurkat, se activó mediante fitohemaglutinina (PHA) o éster forbólico (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato o TPA), la expresión de PD-1 se reguló positivamente de manera visible en Transferencia de Western (Vibharka *et al.*, 1997 Exp Cell Res 232:25-28). Se observó el mismo fenómeno en linfocitos T y B murinos estimulados y en linfocitos T CD4⁺ humanos primarios tras la estimulación mediante anticuerpo anti CD3 (Agata *et al.*, 1996 Int Immunol 8:765-772; Bennett *et al.*, 2003 J Immunol 170:711-118). El aumento de la expresión de PD-1 después de la estimulación de linfocitos T efectores dirige los linfocitos T efectores activados hacia el agotamiento y reducción de las actividades inmunitarias. Por lo tanto, la señal inhibidora mediada por PD-1 desempeña un papel importante en la tolerancia inmunitaria (Bour-Jordan *et al.*, 2011 Immunol Rev 241:180-205).

Se ha informado de aumento de la expresión de PD-1 en linfocitos de infiltración en tumores (TIL) y expresión de ligando de PD-1 en células tumorales en variedades de cánceres implicadas en diferentes tipos de tejidos y órganos tales como pulmón (Konishi *et al.*, 2004 Clin Cancer Res 10:5094-5100), hígado (Shi *et al.*, 2008 Int J Cancer 128:887-896; Gao *et al.*, 2009 Clin Cancer Res 15:971- 979), estómago (Wu *et al.*, 2006 Acta Histochem 108:19-24), riñón (Thompson *et al.*, 2004 Proc Natl Acad Sci 101:17174-17179; Thompson *et al.*, 2007 Clin Cancer Res 13:1757-1761), mama (Ghebeh *et al.*, 2006 Neoplasia 8:190-198), ovario (Hamanishi *et al.* 2007 Proc Natl Acad Sci 104:3360-3365), páncreas (Nomi *et al.*, 2007 Cancer Res 13:2151-2157), melanocitos (Hino *et al.*, 2010 Cancer 116:1757-1766) y esófago (Ohigashi *et al.*, 2005 Clin Cancer Res 11:2947-2953). Con más frecuencia, el aumento de la expresión de PD-1 y PD-L1 en esos cánceres está asociado a mal pronóstico del resultado de supervivencia del paciente. El uso de ratones transgénicos con inactivación del gen de PD-1 que inhibía el crecimiento de células cancerosas de xenoinjerto dilucidó adicionalmente la importancia de la señalización de PD-1 en la modulación del sistema inmunitario para erradicación o tolerancia del cáncer (Zhang *et al.*, 2009 Blood 114:1545-1552).

No solamente la regulación positiva de la señalización de PD-1 conduce a tolerancia inmunitaria al crecimiento canceroso, sino también a la infección y expansión vírica en seres humanos. Los virus de infección de hígado prevalentes, VHB y VHC, inducen la sobreexpresión de ligandos de PD-1 en hepatocitos y activan la señalización de PD-1 en linfocitos T efectores, lo que da como resultado agotamiento de linfocitos T y tolerancia a la infección vírica (Boni *et al.*, 2007 J Virol 81:4215-4225; Golden-Mason *et al.*, 2008 J Immunol 180:3637-3641). De manera análoga, la infección por VIH evita con frecuencia el sistema inmunitario humano por mecanismos similares. La modulación terapéutica de la señalización de PD-1 por moléculas antagonistas puede invertir la tolerancia de las células inmunitarias y reactivarlas para erradicar el cáncer y la infección vírica crónica (Blank *et al.*, 2005 Cancer Immunol Immunother 54:307-314; Okazaki *et al.*, 2007 Int Immunol 19:813-824). Los documentos WO2006/121168 y WO2008156712 desvelan anticuerpos anti PD-1 humana de alta afinidad, relacionados con Nivolumab y Pembrolizumab, respectivamente. La invención se define por las reivindicaciones y cualquier otro aspecto o realización expuestos en el presente documento que no quede dentro del alcance de las reivindicaciones son solamente informativos.

Sumario de la invención

La invención proporciona métodos y composiciones para inhibición inmunitaria de PD-1. La invención proporciona un anticuerpo como se define en las reivindicaciones. En un aspecto, la divulgación proporciona un dominio de unión a

antígeno de anticuerpo que se une específicamente con PD-1 humana y comprende una región determinante de complementariedad (CDR) que tiene una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 11-22, 31-42 y 59-63.

- 5 Las CDR son susceptibles de recombinación en región variable de cadena pesada (Vh) y regiones variables de cadena ligera (Vk) que comprenden secuencias (CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) y (CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3), respectivamente, y conservan unión y/o funcionalidad específicas de PD-1.

En realizaciones particulares, el dominio comprende una región variable de cadena pesada (Vh) o una región variable de cadena ligera (Vk) que comprende:

10

a) CDR-H1 (SEQ ID NO: 11, 17, 31 o 37),	d) CDR-L1 (SEQ ID NO: 14, 20, 34 o 40),
b) CDR-H2 (SEQ ID NO: 12, 18, 32 o 38),	e) CDR-L2 (SEQ ID NO: 15, 21, 35 o 41) o
c) CDR-H3 (SEQ ID NO: 13, 18, 33 o 39);	f) CDR-L3 (SEQ ID NO: 16, 22, 36 o 42).

En realizaciones particulares, el dominio comprende una región variable de cadena pesada (Vh) y/o una región variable de cadena ligera (Vk) que comprende:

a) mu317	CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 (SEQ ID NOS: 11-13);
	CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 (SEQ ID NOS: 14-16);
b) mu326	CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 (SEQ ID NOS: 17-19);
	CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 (SEQ ID NOS: 20-22);
c) 317-4B6	CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 (SEQ ID NOS: 31-33);
	CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 (SEQ ID NOS: 34-36);
d) 326-4A3	CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 (SEQ ID NOS: 37-39);
	CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 (SEQ ID NOS: 40-42);
e) 317-1	CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 (SEQ ID NOS: 11, 59, 13);
	CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 (SEQ ID NOS: 14-16);
f) 317-4B2	CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 (SEQ ID NOS: 11, 60, 13);
	CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 (SEQ ID NOS: 61, 15, 16);
g) 317-4B5	CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 (SEQ ID NOS: 11, 60, 13);
	CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 (SEQ ID NOS: 61, 15, 16);
h) 317-4B6	CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 (SEQ ID NOS: 11, 32, 13);
	CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 (SEQ ID NOS: 61, 15, 16);
i) 326-1	CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 (SEQ ID NOS: 17, 62, 19);
	CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 (SEQ ID NOS: 20-22);
j) 326-3B1	CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 (SEQ ID NOS: 17, 62, 19);
	CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 (SEQ ID NOS: 20-22);
k) 326-3G1	CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 (SEQ ID NOS: 17, 62, 19); o
	CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 (SEQ ID NOS: 20-22).

15

En realizaciones particulares, el dominio comprende una región variable de cadena pesada (Vh) y una región variable de cadena ligera (Vk) que comprende:

- 20 (a) CDR-H1 (SEQ ID NO 31), CDR-H2 (SEQ ID NO 12, 32, 59 o 60) y CDR-H3 (SEQ ID NO 33), CDR-L1 (SEQ ID NO 14, 34 o 61), CDR-L2 (SEQ ID NO 35) y CDR-L3 (SEQ ID NO 36); o

(b) CDR-H1 (SEQ ID NO 37), CDR-H2 (SEQ ID NO 18, 38 o 62) y CDR-H3 (SEQ ID NO 39), CDR-L1 (SEQ ID NO 40), CDR-L2 (SEQ ID NO 41) y CDR-L3 (SEQ ID NO 42).

- 25 En realizaciones particulares, el dominio comprende una región variable de cadena pesada (Vh) o una región variable de cadena ligera (Vk) que comprende:

a) mu317 (SEQ ID NOS: 4 o 6);	p) 317-3H1 (SEQ ID NOS: 69);
b) mu326 (SEQ ID NOS: 8 o 10);	q) 317-311 (SEQ ID NOS: 70);
c) 317-4B6 (SEQ ID NOS: 24 o 26);	
d) 326-4A3 (SEQ ID NOS: 28 o 30);	r) 317-4B1 (SEQ ID NOS: 71);
e) 317-4B2 (SEQ ID NOS: 43 o 44);	s) 317-4B3 (SEQ ID NOS: 72);
f) 317-4B5 (SEQ ID NOS: 45 o 46);	t) 317-4B4 (SEQ ID NOS: 73);
g) 317-1 (SEQ ID NOS: 48 o 50);	u) 317-4A2 (SEQ ID NOS: 74);
h) 326-3B1 (SEQ ID NOS: 51 o 52);	v) 326-3A1 (SEQ ID NOS: 75);
i) 326-3G1 (SEQ ID NOS: 53 o 54);	w) 326-3C1 (SEQ ID NOS: 76);
j) 326-1 (SEQ ID NOS: 56 o 58);	x) 326-3D1 (SEQ ID NOS: 77);
k) 317-3A1 (SEQ ID NOS: 64);	y) 326-3E1 (SEQ ID NOS: 78);
l) 317-3C1 (SEQ ID NOS: 65);	z) 326-3F1 (SEQ ID NOS: 79);
m) 317-3E1 (SEQ ID NOS: 66);	aa) 326-3B N55D (SEQ ID NOS: 80);
n) 317-3F1 (SEQ ID NOS: 67);	ab) 326-4A1 (SEQ ID NOS: 81); o

o) 317-3G1 (SEQ ID NOS:68);	ac) 326-4A2 (SEQ ID NOS: 82).
-----------------------------	-------------------------------

En realizaciones particulares, el dominio comprende una región variable de cadena pesada (Vh) o una región variable de cadena ligera (Vk) que comprende:

a) mu317 (SEQ ID NOS:4 y 6);	p) 317-3H1 (SEQ ID NOS:69 y 26);
b) mu326 (SEQ ID NOS:8 y 10);	q) 317-311 (SEQ ID NOS:70 y 26);
c) 317-4B6 (SEQ ID NOS:24 y 26);	
d) 326-4A3 (SEQ ID NOS:28 y 30);	r) 317-4B1 (SEQ ID NOS:71 y 26);
e) 317-4B2 (SEQ ID NOS:43 y 44);	s) 317-4B3 (SEQ ID NOS:72 y 26);
f) 317-4B5 (SEQ ID NOS:45 y 46);	t) 317-4B4 (SEQ ID NOS:73 y 26);
g) 317-1 (SEQ ID NOS:48 y 50);	u) 317-4A2 (SEQ ID NOS:74 y 26);
h) 326-3B1 (SEQ ID NOS:51 y 52);	v) 326-3A1 (SEQ ID NOS:75 y 30);
i) 326-3G1 (SEQ ID NOS:53 y 54);	w) 326-3C1 (SEQ ID NOS:76 y 30);
j) 326-1 (SEQ ID NOS:56 y 58);	x) 326-3D1 (SEQ ID NOS:77 y 30);
k) 317-3A1 (SEQ ID NOS:64 y 26);	y) 326-3E1 (SEQ ID NOS:78 y 30);
l) 317-3C1 (SEQ ID NOS:65 y 26);	z) 326-3F1 (SEQ ID NOS:79 y 30);
m) 317-3E1 (SEQ ID NOS:66 y 26);	aa) 326-3B N55D (SEQ ID NOS:80 y 30);
n) 317-3F1 (SEQ ID NOS:67 y 26);	ab) 326-4A1 (SEQ ID NOS:28 y 81); o
o) 317-3G1 (SEQ ID NOS:68 y 26);	ac) 326-4A2 (SEQ ID NOS:28 y 82).

5 En realizaciones particulares, el dominio se une específicamente con restos de PD1: (a) K45 e I93 (numeración de AA basada en PNAS 2008, 105:10483; equivalente a K58 e I106 en la SEQ ID NO 2); o (b) I93, L95 y P97 (numeración de AA basada en PNAS 2008, 105: 10483; equivalente a I106, L108 y P110 en la SEQ ID NO 2).

10 En realizaciones particulares, el dominio induce la liberación de IL-2 en células HuT78/PD-1 cocultivadas con células HEK293/OS8/PD-L1 o con células EK293/OS8/PD-L2 y/o inhibe la secreción de IL-2 en células HuT78/P3Z cocultivadas con células HEK293/PD-L1 o con células HEK293/PD-L2.

15 La invención también proporciona un dominio efector o constante de cadena pesada de anticuerpo IgG4 que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 83-88, en particular las SEQ ID NO 87 u 88.

La invención también proporciona anticuerpos, F(ab) o F(ab)₂ que comprenden un dominio de unión a PD-1 objeto.

20 La invención también proporciona anticuerpos que comprenden un dominio de unión a PD-1 objeto y un dominio efector o constante de cadena pesada de IgG4 que comprende cualquiera de las SEQ IDNO: 83-88, en particular las SEQ ID NO 87 u 88.

La divulgación también proporciona un polinucleótido que codifica un dominio de unión a PD-1 objeto, en particular secuencias de ADNc.

25 La divulgación proporciona métodos para usar los dominios objeto administrando el dominio a una persona que se ha determinado que tiene cáncer o una infección vírica o que necesite de otro modo antagonismo de PD-1.

30 La divulgación también proporciona proteínas de fusión que comprenden: (a) un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) de un mAAb anti CD3 humano OKT3 fusionado con el dominio C terminal (113-220) de CD8α de ratón (SEQ ID NO: 89); o (b) los dominios extracelulares y transmembrana de PD-1 humana fusionada con el dominio citoplasmático de la cadena de CD3ζ humana (SEQ ID NO: 90).

35 La divulgación también proporciona métodos para usar las proteínas de fusión objeto, que comprenden ensayar, explorar o seleccionar anticuerpos anti-PD-1 con una línea celular que expresa la proteína de fusión.

Breve descripción de los dibujos

40 Figura 1. Presentación esquemática de PD-1/Fc (parte superior) y PD-1/His (parte inferior). ECD: dominio extracelular. L: conector. H: marcador de His. Fc: fragmento γ4Fc de IgG4 humano. N: extremo N. C: extremo C.
 Figura 2. Curvas de reacción dependiente de dosis de mAAb murinos que se unen con PD-1 humana en ELISA. Los mAAb murinos se indicaron en la esquina superior izquierda de cada figura. Los mAAb 317 y 517 comparten un alto grado de homología con la región variable de cadenas pesadas y ligeras. La fuerza de señal de unión se indicó por lecturas de DO₄₅₀ directas. El antígeno, PD-1/His, se aplicó a concentraciones crecientes de hasta 70 nanogramos por pocillo en un volumen de 50 microlitros. El método se ha descrito en el Ejemplo 1.
 45 Figura 3. Curva de reacción dependiente de dosis de mAAb murinos que se unen con PD-1 humana expresada en células vivas mediante análisis de FACS. Se indicaron en cada panel los códigos de los anticuerpos murinos y CE₅₀. IFM significa intensidad de fluorescencia media. Se suspendieron células HuT78/PD-1 en una placa de 96 pocillos a 5 X 10⁴ células por pocillo para FACS. La unión de mAAb de PD-1 con la diana de superficie celular y
 50 detección de FACS se realizaron como se ha descrito en el ejemplo 1.

Figura 4. Presentación esquemática de los sistemas de cocultivo celular usados para ensayar las actividades funcionales de mAb anti PD-1. Los linfocitos T ($CD4^+$ o $CD8^+$) representan células HuT78/PD-1 o linfocitos T primarios en PBMC. TCR: receptor de linfocitos T. N: núcleo. C: citoplasma.

Figura 5. Curva de reacción dependiente de dosis de secreción de IL-2 inducida por mAb murino en células HuT78/PD-1 cocultivadas con células HEK293/OS8/PD-L1. Valor de referencia: liberación de IL-2 promedio inducida por mIgG a todas las concentraciones probadas. Línea superior: mayor liberación de IL-2 basada en el cálculo de regresión mediante software Prism.

Figura 6. (A) Histogramas que muestran la secreción de IFN- γ inducida por mAb anti PD-1 en PBMC (donante 19) cocultivadas con la línea celular HEK293/OS8/PD-L1. (B) Histogramas que muestran la secreción de IFN- γ inducida por mAb anti PD-1 en PBMC (donante 20) cocultivadas con la línea celular HEK293/OS8/PD-L1.

Figura 7. (A) y (B) Actividades de ADCC de mAb anti PD-1 mediante cocultivo de células efectoras (NK92MI/PD-1) y células diana (HuT78/PD-1). Las medias se calcularon a partir de dos puntos de datos de los experimentos representativos. Los mAb se añadieron a la concentración de 10 μ g/ml. Experimento realizado como se describe en el ejemplo 9.

Figura 8. Mapeo de los epítomos de unión de mAb anti PD-1 mediante ELISA (panel superior) y transferencia de Western (panel inferior). Se usaron medios acondicionados que contenían PD-1 TS o Mt para evaluar la actividad de unión mediante ELISA y transferencia de Western. ** indica los restos de AA para los que la actividad de unión de mAb se redujo a 25-50 % de PD-1 TS. *** indica los restos de AA para los que la actividad de unión de mAb se redujo por debajo de 25 % de PD-1 TS.

Figura 9. Liberación de IFN- γ inducida mediante mAb anti PD-1 humanizados en PBMC humanas primarias de diferentes donantes sanos, que se cocultivaron con células HEK293/OS8/PD-L1.

Figura 10. Citotoxicidad de células NK92MI/PD-1 potenciada por mAb anti PD-1 humanizados, hu317 (A) y hu326 (B). Las células de cáncer de pulmón diana, SK-MES-1/PD-L1, se cocultivaron con las células efectoras a la relación (T con respecto a E) de 1 a 2 y se ensayaron como se describe en el ejemplo 12.

Figura 11. Curvas de crecimiento tumoral individual en tres grupos de tratamiento, vehículo (PBS), IgG humano (hulGg) y mAb anti PD-1 (hu317-1/IgG4mt2). Cada curva representa una ruta de crecimiento tumoral, con los ratones portadores de tumores codificados por números indicados a la derecha de cada panel. Se sembraron células Hep3B/OS8/PD-L1 (establecidas a partir de la línea de carcinoma hepatocelular Hep3B) el día 1, se implantaron PBMC el día 15 y se inyectaron tres dosis de hu317-1/IgG4mt2 el día 18, 28 y 38, respectivamente. Los métodos se describen en el ejemplo 12.

Descripción de realizaciones particulares de la invención

PD-1 inicia la señalización inhibidora en células inmunitarias cuando interacciona con sus ligandos, PD-L1 o PD-L2. En los casos de crecimiento de cáncer e infección vírica, la activación de la señalización de PD-1 promueve la tolerancia inmunitaria, lo que conduce a que los cánceres o las células infectadas por virus escapen de la vigilancia inmunitaria y a metástasis de cáncer o aumento de la carga vírica. La inhibición de la señalización celular mediada por PD-1 mediante agentes terapéuticos puede activar células inmunitarias incluyendo linfocitos T, linfocitos B y linfocitos NK, y por lo tanto potenciar las funciones celulares inmunitarias de inhibición del crecimiento de células cancerosas o infección vírica, y restaurar la vigilancia inmunitaria y la función de memoria inmunitaria para tratar dichas enfermedades humanas.

La invención proporciona anticuerpos cuyas funciones son antagónicas a la señalización celular inducida por ligando y mediada por PD-1 en células inmunitarias. Se humanizaron anticuerpos anti PD-1 murinos hasta un alto grado de similitud con anticuerpos humanos en las regiones marco conservadas. Los anticuerpos completos realizados en el formato de variante de IgG4 humana modificada tienen un conjunto único de características en los aspectos de funciones efectoras y propiedades fisicoquímicas. Los anticuerpos anti PD-1 desvelados son adecuados para usos terapéuticos en el tratamiento del cáncer, controlando las infecciones víricas y otras enfermedades humanas que están implicadas de manera mecánica en la tolerancia inmunitaria agravada.

Definiciones

A menos que el contexto indique otra cosa, el término "anticuerpo" se usa en su sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa) y fragmentos de anticuerpos siempre que reconozcan PD-1. Una molécula de anticuerpo es habitualmente mono-específica, pero también puede describirse como idioespecífica, heteroespecífica o poliespecífica. Las moléculas de anticuerpos se unen por medio de sitios de unión específicos con determinantes antigénicos específicos o epítomos en antígenos. Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una parte de un anticuerpo de longitud completa, en general la región de unión a antígeno o variable de la misma. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos monocatenarios; y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales (mAb) mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Kohler *et al* (1975); Patente de los Estados Unidos n.º 4.376.110; Ausubel *et al* (1987-1999); Harlow *et al* (1988); y Colligan *et al* (1993). Los mAb de la invención pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA y cualquier subclase de las mismas. Un hibridoma que produce un

mAb puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*. Se pueden obtener altos títulos de mAb en producción *in vivo* cuando se inyecten células de los hibridomas individuales por vía intraperitoneal en ratones, tales como ratones Balb/c sensibilizados con pristina para producir líquido ascítico que contiene altas concentraciones de los mAb deseados. Se pueden purificar mAb de isotipo IgM o IgG a partir de dicho líquido ascítico o de sobrenadantes de cultivo, usando métodos de cromatografía en columna bien conocidos por los expertos en la materia.

Un “polinucleótido aislado” se refiere a un segmento o fragmento polinucleotídico que se ha separado de secuencias que lo flanquean en un estado natural, p. ej., un fragmento de ADN que se ha retirado de las secuencias que están normalmente adyacentes al fragmento, p. ej., las secuencias adyacentes al fragmento en un genoma en el que aparece de manera natural. La expresión incluye, por lo tanto, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector, en un plásmido de replicación autónoma o virus, o en el ADN genómico de un procarionte o eucarionte, o que existe como molécula separada (p. ej., como ADNc o un fragmento genómico o de ADNc producido mediante PCR o digestión con enzimas de restricción) independiente de otras secuencias. También incluye un ADN recombinante, que es parte de un gen híbrido que codifica una secuencia polipeptídica adicional.

Una “construcción” significa cualquier molécula polinucleotídica recombinante tal como plásmido, cósmido, virus, molécula polinucleotídica de replicación autónoma, fago o molécula polinucleotídica de ADN o ARN mono o bicatenaria lineal o circular, procedente de cualquier fuente, con capacidad de integración genómica o replicación autónoma, que comprende una molécula polinucleotídica donde se han unido una o más moléculas polinucleotídicas de una manera funcionalmente operativa, es decir unidas operativamente. Una construcción recombinante comprenderá normalmente los polinucleótidos de la invención unidos operativamente con secuencias reguladoras de inicio de la transcripción que dirigirán la transcripción del polinucleótido en la célula hospedadora prevista. Pueden emplearse promotores tanto heterólogos como no heterólogos (es decir, endógenos) para dirigir la expresión de los ácidos nucleicos de la invención.

Un “vector” se refiere a cualquier construcción polinucleotídica recombinante que pueda usarse para el fin de transformación, es decir la introducción de ADN heterólogo en una célula hospedadora. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma vírico. Determinados vectores tienen capacidad de replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (p. ej., vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (p. ej., vectores de mamífero no episómicos) se integran en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora y de este modo se replican junto con el genoma del hospedador. Por otra parte, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes con los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento “vectores de expresión”.

Un “vector de expresión” como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de ácido nucleico con capacidad de replicación y expresión de un gen de interés cuando se transforma, transfecta o transduce en una célula hospedadora. Los vectores de expresión comprenden uno o más marcadores seleccionables fenotípicos y un origen de replicación para garantizar el mantenimiento del vector y para, si se desea, proporcionar amplificación dentro del hospedador. El vector de expresión comprende además un promotor para conducir la expresión del polipéptido dentro de las células. Pueden ser vectores de expresión adecuados plásmidos procedentes, por ejemplo, de pBR322 o diversos plásmidos pUC, que están disponibles en el mercado. Otros vectores de expresión pueden proceder de vectores de expresión de bacteriófagos, fagémidos o cósmidos.

Realizaciones adicionales de la divulgación

En realizaciones específicas, la divulgación proporciona anticuerpos monoclonales de ratón identificados a partir de la exploración de clones de hibridoma murinos como se desvela en el presente documento.

En otras realizaciones, la divulgación proporciona composiciones de las siguientes secuencias polinucleotídicas y proteicas:

- a) La secuencia de ADNc, SEQ ID NO 3, que codifica la región variable de cadena pesada de mAb 317 murino;
- b) La secuencia proteica de la región variable de cadena pesada de mAb 317 murino o mu317_Vh (SEQ ID NO 4);
- c) La secuencia de ADNc, SEQ ID NO 5, que codifica la región variable de cadena ligera de mAb 317 murino;
- d) La secuencia proteica de la región variable de cadena ligera de mAb 317 murino o mu317_Vk (SEQ ID NO 6);
- e) La secuencia de ADNc, SEQ ID NO 7, que codifica la región variable de cadena pesada de mAb 326 murino;
- f) La secuencia proteica de la región variable de cadena pesada de mAb 326 murino o mu326_Vh (SEQ ID NO 8);
- g) La secuencia de ADNc, SEQ ID NO 9, que codifica la región variable de cadena ligera de mAb 326 murino;
- h) La secuencia proteica de la región variable de cadena ligera de mAb 326 murino o mu326_Vk (SEQ ID NO 10).

En un aspecto, la divulgación proporciona composiciones que comprenden secuencias de regiones determinantes de complementariedad (CDR), que median en la unión con los antígenos diana, PD-1, incluyendo las secuencias de CDR de mu317 y m326:

- 5 a) La CDR1 de la cadena pesada de mu317 (mu317 H-CDR1) contiene la secuencia de aminoácidos de GFSLTSGYGVH (SEQ ID NO 11);
- b) La mu317 H-CDR2 contiene la secuencia de aminoácidos de VIWAGGSTNYNSALMS (SEQ ID NO 12);
- c) La mu317 H-CDR3 contiene la secuencia de aminoácidos de ARAYGNYWYIDV (SEQ ID NO 13);
- 10 d) La CDR1 de la cadena ligera de mu317 (mu317 L-CDR1) contiene la secuencia de aminoácidos de KASQSVSNDVA (SEQ ID NO 14);
- e) La mu317 L-CDR2 contiene la secuencia de aminoácidos de YAFHRFT (SEQ ID NO 15);
- f) La mu317 L-CDR3 contiene la secuencia de aminoácidos de HQAYSSPYT (SEQ ID NO 16);
- g) La mu326 H-CDR1 contiene la secuencia de aminoácidos de GYTFTNYGMN (SEQ ID NO 17);
- h) La mu326 H-CDR2 contiene la secuencia de aminoácidos de WINNNNGEPTYAEFEKG (SEQ ID NO 18);
- 15 i) La mu326 H-CDR3 contiene la secuencia de aminoácidos de ARDVMDY (SEQ ID NO 19);
- j) La mu326 L-CDR1 contiene la secuencia de aminoácidos de RASESVDNYGYSFMH (SEQ ID NO 20);
- k) La mu326 L-CDR2 contiene la secuencia de aminoácidos de RASNLES (SEQ ID NO 21);
- l) La mu326 L-CDR3 contiene la secuencia de aminoácidos de QQSKEYPT (SEQ ID NO 22)

20 En otra realización, la divulgación proporciona composiciones que comprenden las secuencias de los anticuerpos monoclonales de humanización que proceden de mAb murinos mu317 y mu326, incluyendo:

- a) El mAb de humanización hu317-4B6 comprende la secuencia proteica de la región variable de cadena pesada (Vh) como la SEQ ID NO 24, que está codificada por
- 25 b) el ADNc de hu317-4B6_Vh (SEQ ID NO 23);
- c) El mAb de humanización hu317-4B6 también comprende la secuencia proteica de la región variable de cadena ligera (Vk) como la SEQ ID NO 26, que está codificada por
- d) el ADNc de hu317-4B6 (SEQ ID NO 25);
- e) El mAb de humanización hu326-4A3 comprende la secuencia proteica de Vh como la SEQ ID NO 28, que está
- 30 codificada por
- f) el ADNc de hu326-4A3-Vh (SEQ ID NO 27);
- g) El mAb de humanización hu326-4A3 también comprende la secuencia proteica de Vk como la SEQ ID NO 30, que está codificada por
- h) el ADNc de hu326-4A3_Vk (SEQ ID NO 29);
- 35 i) Las secuencias proteicas de hu317-4B2_Vh (SEQ ID NO 43) y hu317-4B2_Vk (SEQ ID NO 44);
- j) Las secuencias proteicas de hu317-4B5_Vh (SEQ ID NO 45) y hu317-4B5_Vk (SEQ ID NO 46);
- k) La secuencia proteica de hu317-1_Vh (SEQ ID NO 48) y el ADNc que codifica hu317-1_Vh (SEQ ID NO 47);
- l) La secuencia proteica de hu317-1_Vk (SEQ ID NO 50) y el ADNc que codifica hu317-1_Vk (SEQ ID NO 49);
- m) Las secuencias proteicas de hu326-3B1_Vh (SEQ ID NO 51) y hu326-3B1_Vk (SEQ ID NO 52);
- 40 n) Las secuencias proteicas de hu326-3G1_Vh (SEQ ID NO 53) y hu326-3G1_Vk (SEQ ID NO 54);
- o) La secuencia proteica de hu326-1_Vh (SEQ ID NO 56) y el ADNc que codifica hu326-1_Vh (SEQ ID NO 55);
- p) La secuencia proteica de hu326-1_Vk (SEQ ID NO 58) y el ADNc que codifica hu326-1_Vk (SEQ ID NO 57);
- q) Las secuencias proteicas de otros mAb de humanización procedentes de mu317 (SEQ ID NO 63-74);
- 45 r) Las secuencias proteicas de otros mAb de humanización procedentes de mu326 (SEQ ID NO 75-82);

En un aspecto, la divulgación proporciona composiciones que comprenden las secuencias de CDR de los anticuerpos monoclonales de humanización. Las CDR pueden estar compartidas entre la misma serie de mAb de humanización, tales como hu317 o hu326 (véase Tabla 15-16). A continuación se enumeran CDR no redundantes:

- 50 a) secuencia de H-CDR1 de GFSLTSGYGVH (SEQ ID NO 31), compartida entre los mAb de humanización hu317 y mu317 en las cadenas pesadas;
- b) secuencia de H-CDR3 de ARAYGNYWYIDV (SEQ ID NO 33), compartida entre los mAb de humanización hu317 y mu317 en las cadenas pesadas;
- c) secuencia de L-CDR1 de KSESVSNDVA (SEQ ID NO 34), compartida entre los mAb de humanización
- 55 hu317-4B2, hu317-4B5 y hu317-4B6 en las cadenas ligeras;
- d) secuencia de L-CDR2 de YAFHRFT (SEQ ID NO 35), compartida entre los mAb de humanización hu317 y mu317 en las cadenas ligeras;
- e) secuencia de L-CDR3 de HQAYSSPYT (SEQ ID NO 36), compartida entre los mAb de humanización hu317 y mu317 en las cadenas ligeras;
- 60 f) secuencia de H-CDR2 de VIYAGGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO 32) en hu317-4B6_Vh;
- g) secuencia de H-CDR2 de VIYAGGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO 60) en hu317-4B2_Vh y hu317-4B5_Vh;
- h) secuencia de H-CDR2 de VIWAGGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO 59) en hu317-1_Vh;
- i) secuencia de L-CDR1 de KASQSVSNDVA (SEQ ID NO 11) en hu317-1_Vk;
- j) secuencia de H-CDR1 de GYTFTNYGMN (SEQ ID NO 37), compartida entre los mAb de humanización hu326
- 65 y mu326 en las cadenas pesadas;
- k) secuencia de H-CDR3 de ARDVMDY (SEQ ID NO 39), compartida entre los mAb de humanización hu326 y

mu326 en las cadenas pesadas;

l) secuencia de L-CDR1 de RASESVDNYGYFSMH (SEQ ID NO 40), compartida entre los mAb de humanización hu326 y mu326 en las cadenas ligeras;

m) secuencia de L-CDR2 de RASNLES (SEQ ID NO 41), compartida entre los mAb de humanización hu326 y mu326 en las cadenas ligeras;

n) secuencia de L-CDR3 de QQSKEYPT (SEQ ID NO 42), compartida entre los mAb de humanización hu326 y mu326 en las cadenas ligeras;

o) secuencia de H-CDR2 de WINNNNAEPTYAQDFRG (SEQ ID NO 38) en hu326_4A3_Vh;

p) secuencia de H-CDR2 de WINNNNGEPTYAQGFRG (SEQ ID NO 62) en el Vh de hu326_1 y otros mAb hu317.

En otro aspecto, la divulgación proporciona epítomos de unión particulares de los mAb anti PD-1 humanizados en el antígeno, y uso funcional de los mismos. Se mutaron individualmente seis restos de aminoácidos (AA) críticos en PD-1 necesarios para la unión a ligando y se usaron proteínas de PD-1 mutantes y de tipo silvestre para evaluar los epítomos de unión. El resto cuya mutación alteró significativamente la unión del anticuerpo se reconoce como un epítopo de unión clave o significativo. Son epítomos de unión significativos de mAb hu317-4B5 y hu317-4B6 K45 e I93 (numeración de AA basada en 2008 PNAS, 105:10483; equivalente a K58 e I106 en la SEQ ID NO 2); y son epítomos de unión significativos de mAb hu326-3B1 y hu317-4A3 I93, L95 y P97 (numeración de AA basada en 2008 PNAS, 105:10483; equivalente a I106, L108 y P110 en la SEQ ID NO 2).

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona composiciones que comprenden las secuencias de región constante de variantes de IgG4 humanas recombinantes, que pueden unirse con las regiones variables de los anticuerpos objeto, incluyendo los mAb anti PD-1 humanizados, que mostraron funciones efectoras y propiedades fisicoquímicas preferidas. Las secuencias son las siguientes:

La secuencia de región constante de IgG4mt10 (SEQ ID NO 88);

a) Una secuencia de referencia de IgG4mt1 (SEQ ID NO 83);

b) Una secuencia de referencia de IgG4mt2 (SEQ ID NO 84);

c) Una secuencia de referencia de IgG4mt6 (SEQ ID NO 85);

d) Una secuencia de referencia de IgG4mt8 (SEQ ID NO 86);

e) Una secuencia de referencia de IgG4mt9 (SEQ ID NO 87).

En otra realización, la divulgación proporciona métodos para ensayar las funciones de anticuerpos anti PD-1, usando un plásmido que expresa la proteína de fusión recombinante, OS8, para generar líneas celulares estables, HEK293/OS8/PD-L1 o HEK293/OS8/PD-L2, que coexpresa OS8 (una molécula activadora de linfocitos T) y un ligando de PD-1. Las líneas celulares se usaron para interactuar con linfocitos T y PBMC mediante cocultivo para evaluar la funcionalidad de mAb anti PD-1 (véase ejemplo 3 y ejemplo 4). Como alternativa, se usó otro plásmido que expresaba la proteína de fusión recombinante, P3Z, para generar la línea celular estable, HuT78/P3Z, en la que P3Z actúa como sensor molecular y mediador de la transducción de señal. Cuando P3Z interactúa con el ligando de PD-1, transmitirá señal intracelular para activar la liberación de IL-2 en las células HuT78. Los sistemas pueden usarse para evaluar el efecto inhibitorio de mAb anti PD-1 (véase ejemplo 3).

En un aspecto, la divulgación proporciona composiciones que comprenden las secuencias de aminoácidos de las proteínas de fusión recombinantes de la siguiente manera:

a) Secuencia de proteína de OS8 (SEQ ID NO 89);

b) Secuencia de proteína de P3Z (SEQ ID NO 90).

En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para generar las líneas celulares estables que expresan las proteínas de fusión recombinantes descritas en el presente documento y métodos para usar el sistema para ensayar de manera cuantitativa las actividades funcionales de mAb anti PD-1.

En otra realización, la divulgación proporciona polinucleótidos que codifican las proteínas objeto. Los polinucleótidos pueden unirse operativamente con una secuencia reguladora de la transcripción heteróloga para expresión y pueden incorporarse en vectores, células, etc.

En otra realización, la divulgación proporciona los anticuerpos anti PD-1 murinos y anticuerpos anti PD-1 en versión humanizada, incluyendo hu317-4B6, hu317-4B5, hu317-4B2, etc., y hu326-4A3, hu326-3B1, hu326-3G1, etc., que tienen funciones para suprimir la transducción de señal mediada por PD-1 y activar células inmunitarias, que desencadenan una cascada de respuestas inmunitarias incluyendo secreción de citocinas y citotoxicidad hacia células diana tales como células cancerosas y dicho uso funcional de los anticuerpos.

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos anti PD-1 humanizados como se define en las reivindicaciones que activan varios tipos de células inmunitarias que expresan PD-1, incluyendo linfocitos T humanos, linfocitos NK y PBMC cuyas funciones son amplificar las señales de respuesta inmunitaria, movilizar el sistema inmunitario y actuar como células efectoras inmunitarias para eliminación de células cancerosas e infecciones víricas, y dicho uso

funcional de los anticuerpos.

En otro aspecto, los mAb anti PD-1 humanizados se usan como agentes terapéuticos para tratar enfermedades humanas que están implicadas en la supresión de células inmunitarias mediante señalización intracelular mediada por PD-1, lo que conduce a progresión de la enfermedad, en particular cánceres e infecciones víricas.

Las composiciones de la divulgación son útiles para el tratamiento del cáncer, enfermedades neurodegenerativas e infecciosas, en particular víricas, y otras afecciones en las que la expresión inadecuada o perjudicial de la PD-1 humana y/o es un componente de la etiología o patología de la afección. Por lo tanto, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer o inhibir la progresión tumoral en un sujeto que lo necesite con una proteína anti PD-1 objeto. La divulgación proporciona además el uso de polinucleótidos objeto para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer o inhibir la progresión tumoral en un sujeto.

La divulgación incluye todas las combinaciones de las realizaciones particulares enumeradas.

Ejemplos

Ejemplo 1. Generación de anticuerpo monoclonal anti PD-1

Se generaron anticuerpos monoclonales (mAb) anti PD-1 basándose en la tecnología de fusión de hibridoma convencional (Kohler y Milstein 1976 Eur J Immunol 6:511-519; de St Groth y Sheidegger 1980, J Immunol Methods 35:1-21; Mechetner 2007 Methods Mol Biol 378:1-13) con modificaciones menores. Se seleccionaron mAb con actividades de unión alta en ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para caracterización adicional.

Proteína recombinante PD-1 para ensayos de inmunización y unión

Se obtuvo plásmido de expresión que contenía ADNc de PD-1 humana de longitud completa de Origene (cat n.º SC117011, n.º de referencia del NCBI: NM_005018.1, Beijing, China). El dominio extracelular que consistía en los aminoácidos (AA) 1-168 de PD-1 (SEQ NO.1, SEQ NO.2) se amplificó mediante PCR y se subclonó en un vector de expresión basado en pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) con el extremo C fusionado con un marcador de His₆ o con el dominio γFc de cadena pesada de IgG4 humana, que dio como resultado dos plásmidos de expresión de proteína de fusión recombinante, PD-1-EC/His y PD-1-EC/Fc (abreviados como PD-1/His y PD-1/Fc). La presentación esquemática de proteínas inmunógenas/antígenas se ha mostrado en la figura 1. Para la producción de proteína de fusión recombinante, se transfectaron de forma transitoria plásmidos PD-1/His y PD-1/Fc en células 293-F en 1-3 litros de medio (Invitrogen) y se cultivaron durante 5-7 días en un incubador de CO₂ equipado con agitador rotatorio. El sobrenadante que contenía la proteína recombinante se recogió y se clarificó mediante centrifugación a 15000 g durante 30 minutos. PD-1/His se purificó mediante cromatografía de afinidad de metales inmovilizada usando Ni-Sepharose Fast Flow (Cat. n.º 17531801, GE Lifesciences, Shanghai, China), seguido de cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna HiLoad 16/60 Superdex 200 (Cat. n.º 17106901, GE Lifesciences, Shanghai, China). Se purificó PD-1/Fc usando una columna de proteína G Sepharose Fast Flow (cat. n.º 17061805, GE Lifesciences). Se dializaron proteínas tanto PD-1/His como PD-1/Fc frente a solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se almacenaron en un congelador a -80 °C en alícuotas pequeñas.

El ADNc que codifica PD-L1 humano se sintetizó de manera química mediante Genescript (Nanjing, China) basándose en la secuencia publicada (n.º de referencia del NCBI NM_014143). El plásmido de expresión de PD-L2 se obtuvo de Origene (Cat. n.º SC108873, n.º de referencia del NCBI NM_025239.2, Beijing, China). Ambos ADNc se clonaron en pcDNA3.1/Higromicina (Cat. n.º V870-20, Invitrogen) y pcDNA3.1/V5-His (Cat. n.º V810-20, Invitrogen), respectivamente.

Línea celular de expresión estable

Se establecieron líneas celulares estables que expresaban PD-1, PD-L1 o PD-L2 humanos mediante transfección de plásmidos pcDNA3.1 que contenían PD-1, PD-L1 y PD-L2 a HUT78 (ATCC, Manassas, VA, EE. UU.) y HEK293 (ATCC), respectivamente, y se siguieron de selección con medio que contenía 200 microgramos de higromicina (Cat. n.º 10687-010, Invitrogen) o 1 mg de G418 (Sigma) por mililitro. Se aislaron clones individuales mediante un método convencional, dilución limitada o selección de colonias individuales de la superficie del pocillo de cultivo. Todos los clones se exploraron mediante transferencia de Western y análisis de FACS usando anticuerpos anti PD-1, PD-L1 y PD-L2 (Cat. n.º 12-9969, 17-5983, 12-5888, eBioscience, San Diego, EE. UU.), respectivamente, y los clones de expresión máxima se seleccionaron para ensayo de unión de FACS para explorar anticuerpos monoclonales de hibridoma o se usaron en ensayos funcionales.

Inmunización, fusión de hibridoma y clonación.

Se inmunizaron ratones Balb/c de ocho a doce semanas de edad (de BEIJING HFK BIOCSIENCE CO., LTD, Beijing, China) por vía subcutánea con 100 µl de adyuvante (Cat. n.º KX0210041, KangBiQuan, Beijing, China) que contenía

5 microgramos de PD-1/Fc. La inmunización se realizó mediante dos inyecciones del inmunógeno anterior con tres semanas de diferencia. Dos semanas después de la segunda inmunización, se evaluaron los sueros de ratones con respecto a la unión de PD-1 mediante FACS (siguientes secciones). Los ratones con títulos de anticuerpo anti PD-1 altos en sueros se seleccionaron y se reforzaron por vía intraperitoneal con 50 microgramos de PD-1/Fc en ausencia de cualquier adyuvante. Tres días después del refuerzo, los esplenocitos se aislaron y fusionaron con la línea celular de mieloma murino, células SP2/0 (ATCC), usando técnicas convencionales (Gefer, M.L. *et al.*, 1977 Somat Cell Genet, 3:231-236).

Evaluación de la actividad de unión a PD-1 de los anticuerpos mediante ELISA y FACS

Los sobrenadantes de clones de hibridoma se exploraron inicialmente mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) como se describe en "Flanagan, M.L. *et al.* 2007 Methods in Molecular Biology 378:33-52" con algunas modificaciones. En resumen, se aplicaron 50-200 nanogramos de proteína PD-1/His o PD-1/Fc en 50 microlitros de solución salina tamponada con fosfato (PBS) en una placa de 96 pocillos (Shenzhen JinCanHua Industry Co., Ltd, Shenzhen, China) por pocillo. Se usaron el anticuerpo anti IgG de ratón ligado a HRP (Cat. n.º 7076S, Cell Signaling Technology, EE. UU. y Shanghái, China) y reactivo quimioluminiscente (Cat. n.º PA107-01, TIANGEN, China) para detectar y revelar la señal de ELISA, que se leyó mediante un lector de placas (PHREASTAR FS, BMG LABTECH, Alemania) a una longitud de onda de 450 nm. Los clones productores de anticuerpos positivos para ELISA se verificaron adicionalmente mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) usando un método convencional. Las líneas celulares de expresión estable de PD-1, HuT78/PD-1 (10^5 células/pocillo), descritas anteriormente, se tiñeron con sobrenadantes de hibridomas anti PD-1 en placas de 96 pocillos de fondo en V (Cat. n.º 3897, Corning, EE. UU. y Shanghái, China). Para bloquear los receptores de Fc humanos, las células se preincubaron con IgG humano (20 µg/ml) (Cat. n.º H11296, LifeHolder, EE. UU. y Shanghái, China). Se detectaron anticuerpos de PD-1 con anticuerpo de cabra anti IgG de ratón marcado con Dylight™ 649 (Cat. n.º 405312, Biolegend, San Diego, EE. UU.) y la fluorescencia celular se supervisó usando un citómetro de flujo (Guava easyCyte 8HT, Merck-Millipore, EE. UU. y Shanghái, China).

El medio acondicionado de células de hibridoma que mostró señal positiva en ensayo tanto ELISA como FACS se sometió a ensayos funcionales para identificar anticuerpos con buena actividad funcional en ensayos basados en células inmunitarias humanas (en el presente documento). Los anticuerpos con actividad funcional positiva se subclonaron y caracterizaron adicionalmente.

Subclonación y adaptación a medio sin suero o bajo en suero

Los clones de hibridoma positivos de exploración primaria mediante ELISA, FACS y ensayos funcionales se subclonaron mediante el método convencional de dilución limitada. Cada uno de los clones positivos se sembró en una placa de 96 pocillos, se cultivó en medio RPMI1640 (Cat. n.º SH30809.01B, Hyclone, Shanghái, China) con suero bovino fetal al 10 % (FBS, Cat. n.º SH30084.03, Hyclone, Beijing, China) en un incubador de CO₂. Se seleccionaron tres subclones de cada placa de dilución limitada y se caracterizaron mediante FACS y ensayos funcionales. Los subclones seleccionados mediante ensayos funcionales se definieron como anticuerpo monoclonal. Los mejores subclones se adaptaron para crecimiento en el medio CDM4MAb (Cat. n.º SH30801.02, Hyclone) con FBS 1-3 %.

Expresión y purificación de anticuerpos monoclonales

Se cultivaron células de hibridoma productoras de anticuerpos monoclonales murinos o células 293-F transfectadas con plásmidos de anticuerpos recombinantes (Cat. n.º R79007, Invitrogen) en medio CDM4MAb (Cat. n.º SH30801.02, Hyclone) o medio de expresión Freestyle293. (Cat. n.º 12338018, Invitrogen), respectivamente, en una incubadora de CO₂ a 37 °C durante 5 a 7 días. El medio acondicionado se recogió mediante centrifugación a 10.000 g durante 30 minutos para retirar todas las células y los residuos celulares y se filtró a través de una membrana de 0,22 µm antes de su purificación. Se aplicaron anticuerpos murinos o recombinantes y se unieron a una columna de proteína A (Cat. n.º 17127901, GE Life Sciences) siguiendo las instrucciones del fabricante, se lavaron con PBS, se eluyeron en el tampón que contenía citrato 20 mM, NaCl 150 mM, pH 3,5. Los materiales eluidos se neutralizaron con Tris 1 M pH 8,0 y habitualmente contenían anticuerpos de más del 90 % de pureza. Los anticuerpos purificados por afinidad con proteína A se dializaron frente a PBS o se purificaron adicionalmente usando una columna HiLoad 16/60 Superdex200 (Cat. n.º 17531801, GE Life Sciences) para retirar los agregados. Las concentraciones de proteína se determinaron midiendo la absorbancia a 280 nm o mediante ensayo de Bradford (Cat. n.º 1856210, Thermo Scientific, Rockford, IL, EE. UU.) usando IgG bovino de concentración definida (Cat. n.º 23212, Thermo Scientific) como los patrones. Los anticuerpos purificados se almacenaron en alícuotas en un congelador a -80 °C.

Ejemplo 2. Comparación de actividades de unión entre anticuerpos anti PD-1

Mediante la exploración de miles de clones de hibridomas se identificaron algunos anticuerpos monoclonales superiores (mAb), que se unen con PD-1 humana con alta especificidad y fuerza. Como se muestra en el ensayo de ELISA (figura 2), tres de los anticuerpos superiores indujeron dicha fuerza y especificidad de unión. Los resultados

del análisis FACS demostraron que los anticuerpos monoclonales seleccionados se unen con las proteínas PD-1 nativas expresadas en la superficie celular. mAb317 (mu317), mu326 y mu150 murinos mostraron actividad de unión dependiente de la concentración y su CE_{50} (concentración eficaz al 50 % de actividad) de unión fue significativamente menor que la del mu55 de control (figura 3).

Evaluación de la afinidad de unión de mAb mediante resonancia de plasmón superficial (RPS)

Los mAb con altas actividades de unión en ELISA y FACS, así como con potentes actividades funcionales en los ensayos basados en células (en el presente documento) se examinaron para determinar su constante cinética de unión en reacciones de unión en tiempo real. Los mAb anti PD-1 murinos se purificaron a partir de sobrenadantes de hibridoma usando columna de flujo de proteína A (Cat. n.º 17531801, GE Life Sciences) seguido de cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna HiLoad 16/60 Superdex200 (Cat. n.º 17106901, GE Life Sciences). Los anticuerpos anti PD-1 purificados se concentraron hasta 0,5-1 mg/ml en PBS y se almacenaron en alícuotas en un congelador a -80 °C.

Para determinar las afinidades de unión de mAb de PD-1, se realizaron mediciones de RPS en tampón HBS-N (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 0,005 % v/v, GE Healthcare) usando el instrumento BIAcore™ T-200 (GE Life Sciences). Se generó un chip biosensor CM5 anti Fc de ratón (GE Healthcare) usando un protocolo de acoplamiento de amina primaria convencional. Se capturaron mAb de PD-1 a 0,3 µg/ml en superficie anti Fc de ratón durante 1 minuto a 10 µl/min. Se inyectó PD-1/Fc en una dilución en serie de 3,3 nM a 120 nM sobre la superficie unida a anticuerpo durante 3 minutos a 30 µl/min seguido de una fase de disociación de 10 minutos. Se calcularon las velocidades de asociación (K_a o k_{on}) y las velocidades de disociación (K_d o k_{off}) usando el modelo de unión de Langmuir uno a uno (Software BIA Evaluation, GE Life Sciences). Se calculó la constante de disociación en equilibrio (K_D) como la relación k_{off}/k_{on} .

Como se muestra en la tabla 1, tanto mu326 como mu517, un miembro de la familia de secuencia afín relacionado con mu317, tienen una K_D subnanomolar igual a 0,324 nM y 0,289 nM, respectivamente, que es significativamente mejor que la de mu134. La velocidad K_{on} fue similar entre los tres mAb enumerados en la tabla 1, pero la velocidad de K_{off} fue significativamente diferente, se observó una velocidad de disociación mucho más rápida en mu134.

Tabla 1. Constante de unión de determinados anticuerpos superiores

mAb	K_{on} (M^{-1}, s^{-1})	K_{off} (s)	K_D (M)
mu326	$2,4 \times 10^5$	$7,79 \times 10^{-5}$	$3,24 \times 10^{-10}$
mu517	$1,96 \times 10^5$	$5,66 \times 10^{-5}$	$2,89 \times 10^{-10}$
mu 134	$1,1 \times 10^5$	$3,69 \times 10^{-4}$	$3,35 \times 10^{-9}$

Determinación de afinidad de Fab anti PD-1 mediante RPS

Se convirtieron mAb anti PD-1 en la versión Fab mediante PCR para fusionar las regiones variables de cadenas pesadas y ligeras con el extremo N de IgG2-CH1 humano y región constante de cadena kappa, respectivamente, y se subclonaron en el vector pcDNA3.1 (Invitrogen). Ambos vectores de expresión se coexpresaron en células 293-F usando un protocolo de transfección transitoria similar a la expresión transitoria de anticuerpos completos. En resumen, la cadena kappa de Fab se amplificó mediante PCR y se subclonó en un vector de expresión basado en pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). En un plásmido separado, la región variable de cadena pesada (VH) junto con la secuencia codificante de CH1 de IgG2 humana se fusionó con un marcador de c-Myc-His8 C terminal mediante PCR solapante y después se subclonó en el vector de expresión. Las mutaciones C232S y C233S (numeración de restos de Kabat, Kabat *et al.* Sequence of proteins of immunologic interest, 5ª ed Bethesda, MD, NIH 1991) se introdujeron en la cadena pesada de IgG2 para evitar el intercambio de enlaces disulfuro y estabilizar IgG2 humano en la conformación de IgG2-A (Lightle *et al.* 2010 Protein Sci 19 (4):753-762). Ambas construcciones contenían un péptido señal cadena arriba de las secuencias maduras de Fab. Se consiguió expresión secretada de Fab mediante cotransfección de los 2 plásmidos anteriores en células 293-F y se recogieron sobrenadantes de cultivo celular 6-7 días después de la transfección. Se purificaron Fab marcados con His8 de sobrenadantes de cultivo celular usando una columna de Ni-sepharose Fast Flow (Cat. n.º 17531801, GE Life Sciences) seguido de cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna HiLoad 16/60 Superdex200 (Cat. n.º 17106901, GE Life Sciences). Los Fab purificados se concentraron hasta 0,5-5 mg/ml en PBS y se almacenaron en alícuotas en un congelador a -80 °C.

Para determinaciones de afinidad de Fab anti PD-1, se usaron ensayos de RPS con el instrumento BIAcore™ T-200 (GE Life Sciences). Brevemente, se acopló PD-1/His humano o PD-1/His de mono cinomolgo con chips biosensores CM5 activados (Cat. n.º BR100530, GE Life Sciences) para conseguir aproximadamente 100-200 unidades de respuesta (UR), seguido de bloqueo de grupos que no habían reaccionado con etanolamina 1 M. Se inyectaron muestras de Fab de concentración creciente de 0,12 nM a 90 nM en el tampón de ejecución de RPS (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween20 0,05 %, pH 7,4) a 30 µl/minuto y se calcularon las respuestas de unión en PD-1/His humano o PD-1/His de mono restando de las UR de una celda de flujo en blanco. Se calcularon las velocidades de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) usando el modelo de unión de Langmuir uno a uno (Software BIA

Evaluation, GE Life Sciences). La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calculó como la relación k_{off}/k_{on} .

Las afinidades de unión determinadas mediante RPS de Fab anti PD-1 se enumeraron en la Tabla 18. Cada Fab anti PD-1 se unió con alta afinidad ($K_d = 0,15-1$ nM) con PD-1 humana. Todos los Fab, excepto 326-3G1, se unieron con afinidades ligeramente menores pero parecidas (en un intervalo de 5 veces en K_d) a PD-1 de mono cinomolgo.

Ejemplo 3. Actividad funcional de anticuerpos anti PD-1 en linfocitos T humanos.

Generación de líneas celulares estables

Se obtuvieron la línea celular de empaquetamiento retrovítico PT67, líneas de linfocitos T humanos HuT78 y HEK293 de la Colección Americana de Cultivo Tipo (ATCC, Rockville, MD). Se generó una sublínea de HuT78 HuT78/PD-1 que expresa PD-1 mediante transducción retrovítica usando vector pFB-neo (Stratagene/Agilent Tech, Santa Clara, CA) que contenía el gen *PD-1*, según el protocolo descrito anteriormente (Zhang *et al.* 2005 Blood 106:1544-1551). El agente que interacciona con linfocitos T, un Ab quimérico anclado a membrana (OS8), se construyó fusionando el fragmento variable de cadena sencilla (scFv) de un mAb anti CD3 humano OKT3 (Kipriyanov *et al.* 1997, PEDS 10:445-453) con el dominio C terminal (113-220) de CD8 α de ratón (número de referencia del NCBI: NP_001074579.1) que incluye dominios bisagra, transmembrana y citoplasmático. Haciendo esto, se ancla scFv anti-CD3 a la superficie celular como un activador de linfocitos T. Se subclonaron ADNc de PD-L1, PD-L2 y OS8 humanos en el vector pcDNA3.1. Se generaron líneas celulares estables HEK293/OS8/PD-L1, Hep3B/OS8/PD-L1 y HEK293/OS8/PD-L2 que coexpresan ADNc tanto de OS8 como de PD-L1 o PD-L2 mediante cotransfección de células HEK293 y Hep3B (ATCC) con los plásmidos emparejados, seguido de selección de higromicina o G418 durante 10-14 días. Después se clonaron las líneas celulares mediante dilución limitante como se ha descrito anteriormente (Fuller SA, *et al.* Curr Protoc Mol Biol. Capítulo 11: Unidad 11.8., 2001). Se construyó un receptor de PD-1 quimérico, denominado P3Z, fusionando los dominios extracelular y transmembrana de PD-1 humana con el dominio citoplasmático de la cadena CD3 ζ humana (n.º de referencia del NCBI NP_932170.1). Se clonó la secuencia de ADNc codificante de P3Z en pFB-neo y se suministró a células HuT78 mediante transducción retrovítica para generar células HuT78/P3Z.

Determinación de las funciones del anticuerpo de PD-1 mediante liberación de IL-2 en células HuT78/PD-1

Para determinar si los anticuerpos anti PD-1 pueden bloquear la interacción de señalización de PD-1 inducida por PD-L1, se preincubaron células HuT78/PD-1 ($1,5 \times 10^4$ células por pocillo en una placa de 96 pocillos) con sobrenadantes de hibridoma o anticuerpos de PD-1 durante 15 minutos antes del cocultivo con células HEK293/OS8/PD-L1 o HEK293/OS8/PD-L2 (4×10^4 por pocillo) en una placa de fondo plano alimentada con 200 μ l de medio de cultivo RPMI1640 por pocillo a 37 °C. Después de 16-18 horas, se recogieron los sobrenadantes del cocultivo. Se ensayó IL-2 mediante ELISA usando equipos de ELISA de IL-2 Ready-Set-Go! (Cat. n.º 88-7025, eBiosciences, San Diego, CA). En este ensayo, el bloqueo de la señalización de PD-1 con anticuerpos anti PD-1 dio lugar a señalización de TCR y producción de IL-2 mejoradas (fig. 4).

Como se muestra en la fig. 5 y la tabla 2, los mAb murinos anti PD-1, mu317 y mu326, indujeron actividad funcional significativamente mayor que mu30, inhibiendo la señalización de PD-1 inducida por PD-L1 que conduce a aumento de la secreción de IL-2. Ambos tuvieron mayor secreción de IL-2 (línea superior, tabla 2), 675 y 634 pg/ml, respectivamente, y ambos tuvieron CE_{50} menor (concentración eficaz de mAb a 50 % del nivel de inducción de secreción de IL-2) que el anticuerpo mu30.

Tabla 2. Liberación de IL-2 inducida por mAb anti PD-1 en células HuT78/PD-1 cocultivadas con células HEK293/OS8/PD-L1

Anticuerpo	Valor de referencia (pg/ml)	Línea superior (pg/ml)	CE_{50} (μ g/ml)
mu30	95	527	0,229
mu317	95	675	0,083
mu326	95	634	0,053
mlgG	95	N/A	N/A

Valor de referencia: promedio de liberación de IL-2 inducida por mlgG a todas las concentraciones probadas, véase fig. 4.
Línea superior: mayor liberación de IL-2 basada en el cálculo de la regresión mediante Software Prism, fig. 4.
N/A: no aplicable

La interacción de células HuT78/PD-1 con mAb anti PD-1 no solo bloqueó la activación de linfocitos T inducida por PD-L1, sino que también bloqueó la liberación de IL-2 inducida por PD-L2. La tabla 3 presenta los datos que muestran que mu317 y mu326 tenían mucha mayor potencia en la activación de los linfocitos T como se indica por los parámetros (CE_{50}) de secreción de IL-2 que los de mu476.

Tabla 3. Liberación de IL-2 inducida por mAb anti PD-1 en células HuT78/PD-1 cocultivadas con células HEK293/OS8/PD-L2

Anticuerpo	Valor de referencia (pg/ml)	Línea superior (pg/ml)	CE ₅₀ (µg/ml)
476	180	599	0,183
317	192	563	0,032
326	218	635	0,038

Valor de referencia: promedio de liberación de IL-2 inducido en la parte de cola inferior de la curva de reacción sigmoidea.
Línea superior: promedio de liberación de IL-2 inducido en la parte de meseta de la curva de reacción sigmoidea

Determinación de las funciones de anticuerpos de PD-1 mediante señalización inversa de la liberación de IL-2 en células HuT78/P3Z

En el receptor quimérico P3Z, el dominio de señalización de PD-1 se reemplazó con el dominio citoplasmático de CD3ζ. Por lo tanto, P3Z media en la activación tras su integración con PD-L1, en lugar de la inhibición como receptor de PD-1 original. En este ensayo, se preincubaron células HuT78/P3Z (3×10^4 /pocillo) con sobrenadantes de hibridoma o anticuerpos de PD-1 durante 15 minutos antes del cocultivo con células HEK293/PD-L1 o HEK293/PD-L2 (5×10^4 /pocillo) en placas de fondo plano de 96 pocillos (un volumen total de 200 µl/pocillo) a 37 °C. Después de 16-18 horas, se recogieron sobrenadantes y se ensayó la producción de IL-2 mediante ELISA como se ha descrito anteriormente.

La actividad funcional de mAb murinos anti PD-1 se confirmó adicionalmente mediante lectura directa de la activación de linfocitos T en el ensayo de señalización inversa descrito anteriormente. De forma coherente con el resultado descrito anteriormente, mu317 y mu326 tenían la mejor actividad funcional entre los mAb que se exploraron. Como se muestra en la tabla 4 y la tabla 5, mu317 y mu326 fueron mucho más potentes que uno de los mAb de baja actividad, mu37, tanto con respecto a CI₅₀ como a inhibición máxima.

Tabla 4. Inhibición de la secreción de IL-2 mediante mAb anti PD-1 en células HuT78/P3Z cocultivadas con células HEK293/PD-L1

Anticuerpo	CI ₅₀ (µg/ml)	Inhibición máxima, %
37	0,287	86,9
317	0,083	99,3
326	0,039	97,6

La inhibición máxima se calculó como el porcentaje (%) de inhibición con mAb anti PD-1 añadidos al nivel más alto de 10 µg/ml en cultivo.

Tabla 5. Inhibición de la secreción de IL-2 mediante mAb anti PD-1 en células HuT78/P3Z cocultivadas con células HEK293/PD-L2

Anticuerpo	CI ₅₀ (µg/ml)	Inhibición máxima, %
37	0,127	43,3
317	0,020	94,3
326	0,018	93,4

La inhibición máxima se calculó como el porcentaje (%) de inhibición con mAb anti PD-1 añadidos al nivel más alto de 10 µg/ml en cultivo.

Ejemplo 4. Activación de la secreción de IFN-γ mediante mAb anti PD-1 en PBMC humanas primarias cocultivadas con células HEK293/OS8/PD-L1

Para verificar si los mAb superiores seleccionados contra PD-1 también ejercen efecto funcional en células inmunitarias humanas primarias, se ensayó la función de los anticuerpos usando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) recién aisladas, que consistían principalmente en linfocitos T (50-70 %), linfocitos B y linfocitos NK (15-30 %) y monocitos (2-10 %). Se aislaron PBMC humanas de donantes sanos mediante centrifugación en gradiente de densidad usando medio de separación de linfocitos ficoll (Histopaque-1077; Sigma-Aldrich, MO) según las instrucciones del fabricante. Toda la recogida de sangre humana siguió el Procedimiento Interno de Beigene. Después se estimularon PBMC con mAb anti CD3 (40 ng/ml) OKT3 (Cat. n.º 16-0037, eBioscience, CA) durante 3 días antes del ensayo. El análisis de FACS (ejemplo 1) mostró que la expresión de PD-1 en las PBMC activadas (principalmente linfocitos T) aumentó en un grado variable dependiendo de los donantes individuales (tabla 6). Para determinar la respuesta de linfocitos T preactivados a células tumorales positivas para ligando de PD-1 tras interacción del complejo de TCR/CD3, se cocultivaron PBMC (1×10^4) con células HEK293/OS8/PD-L1 o HEK293/OS8/PD-L2 (3×10^4) en placas de fondo plano de 96 pocillos durante 15-18 horas. Se ensayaron sobrenadantes sin células para determinar el nivel de IFN-γ, mediante ELISA, usando equipos de ELISA Ready-Set-Go! (Cat. n.º 88-7316, eBiosciences), que es el indicador más prominente de la activación de linfocitos T, así como de otra activación de células inmunitarias (Thakur A. *et al.* 2012 Vaccine, 30:4907-4920).

PBMC y tratamiento	Porcentaje de células positivas para tinción con PD-1 seleccionadas frente a PMBC totales teñidas	
	Donante-3	Donante-4
PBMC, no estimuladas/teñidas mediante Ab de PD-1	12,0 %	3,2 %
PBMC, estimuladas/teñidas mediante Ab de PD-1	40,0 %	38,1 %
PBMC, no estimuladas/teñidas mediante Ab de control	<0,5 %	<0,5 %
PBMC, estimuladas/teñidas mediante Ab de control	<0,5 %	<0,5 %
Estimulación: se cultivaron PBMC recién aisladas durante 3 días en presencia de anticuerpo anti CD3, OKT3, e IL-2.		
Sin estimulación: PBMC nuevas sometidas a tinción de anticuerpos y análisis de FACS.		

La fig. 6 demostró que la presencia de los mAb mu317 y mu326 en el cocultivo de PBMC preactivadas y células HEK293/OS8/PD-L1 dio lugar a aumento de la acumulación de IFN- γ de una manera dependiente de la dosis.

Aunque el nivel basal de IFN- γ con tratamiento de IgG murina de control varía entre diferentes donantes, el aumento de la secreción de IFN- γ en PBMC tratadas mediante mu317 o mu326 es estadísticamente significativo en el intervalo de 0,1 a 10 μ g/ml de tratamiento de anticuerpo. En comparación con el nivel correspondiente de PBMC tratadas con mIgG, la secreción de IFN- γ inducida por mu317 y mu326 entre los niveles de concentración de 0,1 a 10 μ g/ml aumentó de 2,5 a 3,2 veces en PBMC del donante-19 y aumentó de 1,4 a 2,3 veces en PBMC del donante-20, respectivamente.

Ejemplo 5. Activación de linfocitos NK mediante mAb anti PD1

Líneas celulares estables para ensayo funcional en linfocitos NK

Se ha informado previamente de que los linfocitos NK humanos primarios expresan proteína PD-1 en respuesta al tratamiento con IL-2 y la inhibición de la señalización mediada por PD-1 potenció la citotoxicidad de linfocitos NK (2010 Blood, 116:2286). Para ensayo cuantitativo del efecto funcional ejercido por mAb anti PD-1 en linfocitos NK, se modificaron por ingeniería genética la línea celular NK humana NK92MI (ATCC) y la línea celular de cáncer de pulmón SK-Mes-1 (ATCC) para expresar de manera estable PD-1 y PD-L1 humanos, respectivamente, mediante transducción retroviral según los protocolos descritos anteriormente (Zhang *et al.* 2005, Blood 106: 1544-1551, Zhang *et al.* 2006, Cancer Res, 66:5927). Las dos líneas celulares estables se denominaron NK92MI/PD-1 y SK-Mes-1/PD-L1.

Los Ab anti PD-1 promueven la producción y secreción de IFN- γ en células NK92MI/PD-1

Se ensayó la actividad funcional de los mAb anti PD-1 en linfocitos NK mediante la medición cuantitativa de la producción de IFN- γ y la secreción en células NK92MI/PD-1 que se cocultivaron con la línea celular de cáncer de pulmón SK-MES-1/PD-L1 a una relación de 1 a 2 en placa de fondo plano de 96 pocillos con un total de 6×10^4 células por pocillo. Los mAb anti PD-1 se añadieron a las células NK92MI/PD-1 15 minutos antes de iniciarse el cocultivo, después las células se cocultivaron durante una noche en una incubadora de CO₂. Se ensayaron sobrenadantes sin células para determinar el nivel de IFN- γ mediante ELISA como se ha descrito en el ejemplo 4.

Todos los mAb anti PD-1 desencadenaron aumento significativo de la producción de IFN- γ desde el valor de referencia con baja concentración de tratamiento de anticuerpo hasta la línea superior con alta concentración de tratamiento de anticuerpo. Los dos anticuerpos superiores, mu317 y mu326, tenían menor CE₅₀ que el anticuerpo de comparación 5C, lo que indica que tienen efecto activador más potente para los linfocitos NK (tabla 7).

Tabla 7. IFN- γ secretado en medio (pg/ml) mediante células NK92MI/PD-1 en presencia de mAb anti PD-1 y células SK-MES-1/PD-L1

Anticuerpo	Valor de referencia (pg/ml)	Línea superior (pg/ml)	CE ₅₀ (μ g/ml)
317	28	532	0,40
326	15	509	0,20
5C	20	535	1,17
Valor de referencia: promedio de liberación de IFN- γ inducida en la parte de cola inferior de la curva de reacción sigmoidea.			
Línea superior: promedio de liberación de IFN- γ inducida en la parte de meseta de la curva de reacción sigmoidea			

El anticuerpo anti PD-1 potencia la destrucción de células cancerosas mediada por células NK92MI/PD-1

Se determinó la citotoxicidad de células NK92MI/PD-1 contra células SK-MES-1/PD-L1 mediante ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) usando el equipo de ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96

(Promega, Madison, WI). En resumen, se preincubaron células NK92MI/PD-1 (10^5) con mAb anti PD-1 a concentraciones finales dentro del intervalo de 0,004-10 µg/ml durante 15 minutos y se añadieron células SK-MES-1/PD-L1 (2×10^4) al cultivo de células inmunitarias en una placa de fondo en V de 96 pocillos a una relación de células efectoras con respecto a tumorales (E:T) de 5:1, y después se cocultivaron durante 5 horas. La lisis de células tumorales completa se estableció como el máximo de destrucción de células, la lectura de ensayo de liberación de LDH de cada muestra se calculó como el porcentaje de destrucción celular máxima. Las destrucciones celulares (%) de todas las muestras se normalizaron entre las placas usando 10 % del valor de referencia como el patrón común.

En el ensayo de citotoxicidad específico expuesto anteriormente, los mAb anti PD-1 seleccionados provocaron una destrucción de células tumorales neta (= línea superior - valor de referencia) que varió de 19 % a 20,2 % a alta concentración de aporte de mAb. Mu317 y mu326 tuvieron menor CE_{50} que mu336, lo que indica mejor potencia para desencadenar destrucción de células tumorales mediada por células NK92M1/PD-1 (tabla 8).

Tabla 8. Citotoxicidad de células NK92MI/PD-1 hacia células tumorales inducida por mAb anti PD-1

Anticuerpo	Valor de referencia (%)	Línea superior (pg/ml)	CE_{50} (µg/ml)
317	10	29,06	0,50
326	10	30,19	0,37
336	10	29,72	1,52

Valor de referencia: porcentaje de células tumorales destruidas no debido al efecto de mAb anti PD-1, normalizado con respecto a 10 % de placas cruzadas.
Línea superior: promedio de porcentaje de tumor destruido en presencia de concentraciones mayores de mAb, es decir 3 µg/ml y 10 µg/ml

Ejemplo 6. Clonación y análisis de secuencias de mAb de PD-1

Los clones de hibridoma murino que secretaban un mAb específico se cultivaron hasta una densidad de 3 a 10×10^6 células en una placa de cultivo tisular de 100 mm y las células se recogieron mediante centrifugación a 1500 rpm en un rotor de cubeta oscilante. El ARN celular total se aisló usando equipo de ARN Ultrapure (Cat. n.º CW0581, CWBIOTECH, Beijing, China) siguiendo el protocolo del fabricante. El ARN se resuspendió en agua con doble desionización, y la concentración se midió mediante NanoDrop (ThermoFisher, Shanghai, China).

Los cebadores de PCR usados para clonación de ADNc de mAb fueron sintetizados por Invitrogen (Beijing, China) en función de las secuencias previamente indicadas (Brocks *et al.* 2001 Mol Med 7:461-469). El ADNc de 1ª cadena se sintetizó usando transcriptasa inversa (Cat. n.º AH301-02, Transgen Biotech, Beijing, China). Se realizó amplificación por PCR de ADNc de mAb específico usando un equipo de reactivos de PCR (Cat. n.º Ap221-12, TransGen Biotech, Beijing, China) y siguiendo el protocolo del fabricante. El producto de PCR fue secuenciado directamente por el proveedor de servicios (GeneWiz, Beijing, China) o se subclonó en un vector pCR (Invitrogen), y se secuenció posteriormente (GeneWiz).

Las secuencias de proteínas de mAb murinos se analizaron mediante alineamiento de homología de secuencias. Los mAb se agruparon en función de la homología de secuencia y los resultados de mapeo de epítomos (ejemplo 13). Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) se identificaron basándose en Kabat (Wu, T.T. y Kabat, E.A., 1970 J. Exp. Med. 132: 211-250) y el sistema de IMGT (Lefranc M.-P. *et al.*, 1999 Nucleic Acids Research, 27, 209-212) mediante anotación de secuencia y mediante análisis de secuencia basado en Internet (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/index.html y <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>). Como se muestra en la tabla 9, las CDR de mu317 y mu326 son muy diferentes con respecto a su longitud e identidad de secuencia.

Tabla 9. CDR de mu317 y mu326

mAb	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
mu317, HC	<u>GFSLT</u> SYGVH	11	VIWAGGSTNYNSALMS	12	ARAYGNYWYIDV	13
mu317, LC	KASQSVSNDVA	14	YAFHRT	15	HQAYSSPYT	16
mu326, HC	<u>GYFT</u> NYGMN	17	WINNNNGEPTYAEFFKG	18	ARDVMDY	19
mu326, LC	RASEVDNYGYSEFMH	20	RASNLES	21	QQSKEYPT	22

Nota: las CDR en negrita se basan en el sistema de Kabat; las CDR subrayadas se basan en el sistema de IMGT.

Ejemplo 7. Humanización de los mAb murinos

Simulación de estructura tridimensional de anticuerpos

Se simularon las estructuras tridimensionales para dominios variables de mu317 y mu326 para identificar restos de marco conservado que podrían ser importantes para sostener estructuras de bucles de CDR. Se mantuvieron los restos de marco conservado potencialmente importantes como los restos murinos originales en el primer ciclo de humanización de anticuerpos. Se adoptó el método de modelado estructural previamente establecido para anticuerpos (Morea *et al.* Methods 2000 20: 267-279) para simular la estructura tridimensional de mAb anti-PD-1 en función de las estructuras canónicas conocidas de anticuerpos (Al-Lazikani *et al.* 1997 Journal of Molecular Biology 273:927-948). En resumen, la secuencia de cada dominio variable (Vk y Vh) de anticuerpo murino se sometió a blast en la base de datos de PDB (Banco de Datos de Proteínas, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para identificar la secuencia de anticuerpos más homóloga con estructura de alta resolución conocida (resolución menor de 2,5 angstrom). Los moldes de estructura seleccionados para modelar mu317 y mu326 (enumerados en la tabla 10) tuvieron las mismas clases de estructuras de bucle canónico en L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3, H-CDR1 y H-CDR2 que los anticuerpos diana para modelar. Si los moldes para el Vk y el Vh vinieron de inmunoglobulinas diferentes, se empaquetaron juntos mediante un ajuste de mínimos cuadrados de los átomos de cadena principal para formar una estructura híbrida de restos de interfaz Vk-Vh, que se usó como los moldes para modelado de homología estructural mediante el programa de modelo Swiss (Kiefer *et al.* 2009 Nucleic Acids Research 37, D387-D392). Determinada conformación de cadena lateral se ajustó mientras que las conformaciones de cadena principal se conservaron. En los sitios donde la estructura original y la estructura modelada tuvieron el mismo resto, se conservó la conformación de cadena lateral. En sitios donde los restos eran diferentes, las conformaciones de cadena lateral se modelaron basándose en la estructura del molde, bibliotecas de rotámeros y consideraciones de empaquetamiento. Después del modelado de homología, se usó el programa PLOP (Jacobson *et al.* 2002 Journal of Physical Chemistry 106: 11673-11680) para refinar los modelos de homología para minimizar la energía de todos los átomos y optimizar la interfaz de Vk y Vh. Esta etapa se realizó para mejorar la estereoquímica, especialmente en las regiones en las que se habían unido entre sí segmentos de estructuras que venían de anticuerpos diferentes.

Tabla 10. Moldes de estructura usados en simulaciones de estructuras de anticuerpos

Cadena de anticuerpo	Código de PDB de la estructura de molde (molde de PDB para H-CDR3)	Identidad de secuencia	Similitud de secuencia
mu317 Vk	3MXV	87 %	92 %
mu317 Vh	3VFG	83 %	91 %
mu326 Vk	1EJO	92 %	94 %
mu326 Vh	INCA	88 %	90 %
317-1 Vk	4HJJ	90 %	95 %
317-1 Vh	3VFG (1AY1)	75 %	87 %
326-1 Vk	1EJO	87 %	92 %
326-1 Vh	3T2N (3CXD)	84 %	86 %

Las estructuras también se simularon para 317-1 y 326-1 con injertos de CDR para guiar ciclos adicionales de modificación de anticuerpos por ingeniería genética para potenciar los alcances de la humanización y/o potenciar las estabildades de los anticuerpos. Los moldes de estructura seleccionados también se enumeran en la tabla 10. Las simulaciones de estructura se realizaron de una manera similar al procedimiento anterior, excepto que las posibles conformaciones de H-CDR3 se tomaron de moldes de PDB 1AY1 para 317-1 y 3CXD para 326-1, respectivamente, que contenían H-CDR3 de tamaño y región de tronco similar. Se realizó minimización de la energía para restos de H-CDR3 injertados usando PLOP.

Humanización

Para humanización de los mAb anti PD-1, se buscaron genes de IgG de línea germinal humanos homólogos de las secuencias de ADNc de regiones variables de mu317 y mu326 mediante aplicación de blast de la base de datos de genes de inmunoglobulina humana en los sitios web de IMGT (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/index.html) y NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>). El IGVH e IGVk humanos con alta homología con los mAb de PD-1 se seleccionaron como el molde para humanización.

Se llevó a cabo humanización en principio mediante injertos de CDR. En el primer ciclo de humanización, las mutaciones de restos de aminoácidos de murinos a humanos en secuencias marco conservadas de regiones variables se guio mediante las estructuras tridimensionales simuladas y solamente los restos de aminoácidos murinos cuyos cambios conservaban la estructura de anticuerpo y bucle de CDR general se mutaron a secuencia humana como se ha descrito anteriormente. Las versiones iniciales de mAb humanizados fueron hu317-1 (SEQ NO 47-50) y hu326-1 (SEQ NO 55-58), que comprenden una cadena pesada con cadena pesada variable humanizada (Vh) fusionada con región constante de IgG2 humana (número de referencia del NCBI P01859) y una cadena ligera con cadena ligera variable humanizada kappa (Vk) fusionada con la región C de Ig kappa humana (número de referencia del NCBI P01834). De manera homóloga, se generaron anticuerpos quiméricos de mu317 y mu326, que consistían en un VH murino fusionado con una región constante de IgG2 humana y un Vk murino fusionado con la región C de Ig kappa humana. Los anticuerpos quiméricos completos se denominaron ch317 y ch326,

respectivamente. Todos los mAb recombinantes se expresaron y purificaron como se ha descrito en el ejemplo 1.

Los FACS y ensayos funcionales demostraron que mAb hu317-1 conservó casi la misma actividad de unión y funcional que el mu317 y ch317. La diferencia de CE_{50} en el análisis de FACS entre mu317 frente a ch317 y hu317-1 puede interpretarse por el hecho de que se usaron dos anticuerpos de detección diferentes, un IgG de cabra anti ratón y un IgG de cabra anti humano, en FACS. En los dos ensayos funcionales, las tres versiones de 317 se trataron de manera más igual y los resultados también están más cerca entre sí (tabla 11).

Como resultado del ciclo inicial de humanización para mu326, mAb hu326-1 conservó características funcionales similares al ch326 y mu326 originales, aunque la actividad funcional en el ensayo de unión de FACS y en el ensayo de liberación de IL-2 basado en células HuT78/PD-1 puede ser ligeramente más débil que el ch326 (tabla 12).

Tabla 11. Comparación de mu317, ch317 y hu317-1 mediante FACS y ensayos funcionales

Ensayo/Parámetro		mu317	ch317	hu317-1
FACS	CE_{50} (μ g/ml)	0,11	0,36	0,46
	IFM Superior*	205	217	203
Ensayo 1	CE_{50} (μ g/ml)	0,11	0,08	0,09
	Línea superior (pg/ml)	346	294	386
	Valor de referencia (pg/ml)	98	82	91
Ensayo 2	CI_{50} (μ g/ml)	0,11	0,10	0,11
	Inhibición máxima	99,5 %	99,0 %	99,8 %
*IFM: intensidad de fluorescencia media de análisis de FACS				
Ensayo 1: liberación de IL-2 inducida por los mAb en células HuT78/PD-1 cocultivadas con células HEK293/OS8/PD-L1				
Ensayo 2: liberación de IL-2 inducida por los mAb en células HuT78/P3Z cocultivadas con células HEK293/PD-L1				

Tabla 12. Comparación de mu317, ch317 y hu317-1 mediante FACS y ensayos funcionales

Ensayo/Parámetro		mu326	ch326	hu326-1
FACS	CE_{50} (μ g/ml)	0,126	0,072	0,117
	IFM Superior	195	163	129
Ensayo 1	CE_{50} (μ g/ml)	0,038	0,074	0,112
	Línea superior (pg/ml)	1149	1057	1143
	Valor de referencia (pg/ml)	242	250	283
Ensayo 2	CI_{50} (μ g/ml)	0,14	0,12	0,10
	Inhibición máxima	96,9 %	81,0 %	84,4 %
Ensayo 1: liberación de IL-2 inducida por los mAb en células HuT78/PD-1 cocultivadas con células HEK293/OS8/PD-L1				
Ensayo 2: liberación de IL-2 inducida por los mAb en células HuT78/P3Z cocultivadas con células HEK293/PD-L1				

En función del 1^{er} ciclo de humanización, se mutaron adicionalmente los otros restos de aminoácidos (AA) murinos

en el marco conservado (FR) de hu317-1_Vh y _Vk individualmente para evaluar la influencia en la función del anticuerpo. Como se muestra en la tabla 13, las siete mutaciones individuales en Vh y una mutación en Vk de hu317-1 tienen todas actividades funcionales similares. Solamente se observaron cambios menores en algunas mutaciones de Vh, tales como hu317-2_K71V con función inhibidora ligeramente más débil entre las mutaciones. Sin embargo, cuando todos los restos de aminoácidos murinos se mutaron juntos al humano (hu317-3A), la función es claramente más débil que el resto de mutaciones en FACS y ensayos de liberación de IL-2.

En la prueba inicial descrita anteriormente, hu326-1 alcanzó un nivel de humanización significativo en la FR excepto por algunos restos de AA murinos restantes. Aun así, tiene función más débil que el mu326. Por lo tanto, se realizaron más mutaciones individuales de vuelta a restos murinos o hacia delante a restos humanos para explorar la contribución de cada AA individual a la función de mAb326. La tabla 14 presenta todas las mutaciones de AA individuales realizadas en función del molde de hu326-1_Vh (SEQ NO 56, SEQ NO 57) y sus resultados de ensayos funcionales. La mayoría de las mutaciones mostraron mejor actividad funcional que las de hu326-1, coincidiendo con el mAb mu326 original. Un par de mutaciones (E46K y F95Y) mostraron ligeramente menos potencia en la CE₅₀ o Cl₅₀, lo que indica el papel de esos restos en la estructura y función del anticuerpo.

Tabla 13. Comparación de la actividad funcional de Fab con mutaciones de humanización en el marco conservado de hu317-1

Fab y composición		FACS, CE ₅₀	Liberación de IL-2 en HuT78/P3Z	
Vh	Vk		Inhibición máxima, %	CE ₅₀
hu317-1_Vh	hu317-1_Vk	0,19	98,78	0,30
hu317-2_L48I	hu317-1_Vk	0,14	98,51	0,37
hu317-2_L67V	hu317-1_Vk	0,15	98,57	0,30
hu317-2_K71V	hu317-1_Vk	0,18	96,55	0,48
hu317-2_N73T	hu317-1_Vk	0,15	98,29	0,31
hu317-2_S76N	hu317-1_Vk	0,13	98,56	0,28
hu317-2_V78F	hu317-1_Vk	0,18	98,03	0,38
hu317-2_M82L	hu317-1_Vk	0,13	98,47	0,27
hu317-1_Vh	HU317-2_G100Q	0,21	98,86	0,27
hu317-3A	hu317-1_Vk	0,32	79,66	0,35

Nota: la unidad para CE₅₀ es µg/ml; la numeración de los restos de aminoácidos mutados es igual que en las secuencias enumeradas para hu317-1; hu317-3A tiene toda la secuencia marco conservada mutada a humana.

Tabla 14. Comparación de la actividad funcional de mAb con mutaciones en el marco conservado de hu326-1

Anticuerpo	FACS, CE ₅₀ µg/ml	Liberación de IL-2 en HuT78/P3Z		Liberación de IL-2 en HuT78/PD-1	
		Inhibición máxima, %	Cl ₅₀ , µg/ml	Línea superior, pg/ml	CE ₅₀ , µg/ml
ch326	0,118	93,05	0,074	993	0,135
hu326-1	0,317	92,38	0,087	987	0,213
hu326-2 S9P ^B	0,145	96,04	0,075	1022	0,136
hu326-2 A16E ^B	0,155	96,33	0,078	1048	0,126
hu326-2 E46K ^B	0,132	95,25	0,079	1244	0,259
hu326-2 G63D ^B	0,139	96,44	0,064	1069	0,120
hu326-2 A76V ^F	0,102	96,65	0,071	1002	0,112
hu326-2 S84N ^B	0,131	96,52	0,060	1015	0,126
hu326-2 S85N ^B	0,110	95,62	0,093	932	0,104
hu326-2 T88N ^B	0,098	95,85	0,102		
hu326-2 F95Y ^F	0,097	95,62	0,166	1028	0,135

^B: retromutación a aminoácido murino; ^F: mutación directa a aminoácido humano.

Todas las mutaciones se realizaron en hu326-1_Vh (SEQ NO 56), que se emparejaron con hu326-1_Vk (SEQ NO 58).

Para explorar la mejor composición de secuencia de Vh y Vk posible para los mAb 317 y 326 que podrían usarse como productos terapéuticos en seres humanos, se realizaron diversas mutaciones combinadas (incluyendo algunas mutaciones en las secuencias de CDR) teniendo en consideración las características de anticuerpos, tales como el nivel de humanización en FR, actividades funcionales, propiedades fisicoquímicas, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). La mayoría de las mutaciones se consideraron inadecuadas para los criterios de calificación. Mediante el proceso de modificación por ingeniería genética, se seleccionaron seis de los mAb recombinantes, humanizados, con respecto a su utilidad terapéutica potencial: hu317-4B2 (SEQ ID NO 43-44), hu317-4B5 (SEQ ID NO 45-46), hu317-4B6 (SEQ ID NO 23-26), hu326-3B1 (SEQ ID NO 51-52), hu326-3G1 (SEQ ID NO 53-54) y hu326-4A3 (SEQ ID NO 27-30). Las CDR del mAb se compararon con las de los anticuerpos murinos originales, mostrados en la tabla 15 y la tabla 16.

Entre los seis mAb, hu317-4B2, hu317-4B5 y hu317-4B6 están estrechamente relacionados entre sí en sus secuencias y son muy similares en sus actividades funcionales y su fuerza. Por otro lado, hu326-3B1, hu326-3G1 y hu326-4A3 están bastante cerca entre sí en sus secuencias y funcionalidades (tabla 17-18). Dentro de cada uno de los dos grupos de mAb, también compartían muchas otras características además de secuencias y función, tales como propiedades fisicoquímicas y epítomos de unión (descritos en los ejemplos 10 y 11), aunque existen algunas diferencias menores.

Tabla 15. Comparación de CDR entre diferentes versiones de mAb 317

mAb	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
mu317, HC	GFSLTSGYGVH	11	VIWAGGSTNYNSALMS	12	ARAYGNYWYIDV	13
hu317-1, HC	GFSLTSGYGVH	11	VIWAGGSTNYNPSLKS	59	ARAYGNYWYIDV	13
hu317-4B2, HC	GFSLTSGYGVH	11	VIYAGGSTNYNPSLKS	60	ARAYGNYWYIDV	13
hu317-4B5, HC	GFSLTSGYGVH	11	VIYAGGSTNYNPSLKS	60	ARAYGNYWYIDV	13
hu317-4B6, HC	GFSLTSGYGVH	11	VIYADGSTNYNPSLKS	32	ARAYGNYWYIDV	13
mu317, LC	KASQSVSNDVA	14	YAFHRFT	15	HQAYSSPYT	16
hu317-1, LC	KASQSVSNDVA	14	YAFHRFT	15	HQAYSSPYT	16
hu317-4B2, LC	KSSSVSNDVA	61	YAFHRFT	15	HQAYSSPYT	16
hu317-4B5, LC	KSSSVSNDVA	61	YAFHRFT	15	HQAYSSPYT	16
hu317-4B6, LC	KSSSVSNDVA	61	YAFHRFT	15	HQAYSSPYT	16

Nota: los restos de AA subrayados se cambian de secuencia murina a secuencias de anticuerpos humanos o para mejora de las propiedades fisicoquímicas.

Tabla 16. Comparación de CDR entre diferentes versiones de mAb 326

mAb	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
mu326, HC	GYTFTNYGMN	17	WINNNNGEPTYAEFFKG	18	ARDVMDY	19
hu326-1, HC	GYTFTNYGMN	17	WINNNNGEPTYAQGFRG	62	ARDVMDY	19
hu326-3B1, HC	GYTFTNYGMN	17	WINNNNGEPTYAQDFRG	62	ARDVMDY	19
hu326-3G1, HC	GYTFTNYGMN	17	WINNNNGEPTYAQDFRG	62	ARDVMDY	19
hu326-4A3, HC	GYTFTNYGMN	17	WINNNNAEPTYAQDFRG	38	ARDVMDY	19
mu326, LC	RASESVDNYGYSFMH	20	RASNLES	21	QQSKEYPT	22
hu326-1, LC	RASESVDNYGYSFMH	20	RASNLES	21	QQSKEYPT	22
hu326-3B1, LC	RASESVDNYGYSFMH	20	RASNLES	21	QQSKEYPT	22
hu326-3G1, LC	RASESVDNYGYSFMH	20	RASNLES	21	QQSKEYPT	22
hu326-4A3, LC	RASESVDNYGYSFMH	20	RASNLES	21	QQSKEYPT	22

Nota: los restos de AA subrayados se cambian de secuencia murina a secuencias de anticuerpos humanos o para mejora de las propiedades fisicoquímicas.

Tabla 17. Actividades de unión de mAb humanizados ensayados mediante ELISA y FACS

mAb	ELISA, CE ₅₀ µg/ml	FACS, CE ₅₀ µg/ml
hu317-4B2	0,066	0,129*
hu317-4B5	0,057	0,115*
hu317-4B6	0,061	0,092*
hu326-3B1	0,092	0,165
hu326-3G1	0,088	0,190
hu326-4A3	0,091*	0,142*

* Datos de FACS usando la versión de Fab de anticuerpos sin normalización.
 ** Datos de estudio de transferencia y normalizados.

Tabla 18. Afinidad de unión de Fab ensayada mediante RPS

Fab	K _{on} (M ⁻¹ ·s ⁻¹)	K _{off} (s)	K _D (M)
hu317-4B5	3,89 x 10 ⁵	9,07 x 10 ⁻⁵	2,33 x 10 ⁻¹⁰
hu317-4B6	5,71 x 10 ⁵	8,37 x 10 ⁻⁵	1,47 x 10 ⁻¹⁰
hu326-3B1	2,18 x 10 ⁵	1,90 x 10 ⁻⁴	8,70 x 10 ⁻¹⁰
hu326-3G1	2,00 x 10 ⁵	2,01 x 10 ⁻⁴	1,00 x 10 ⁻⁹

Determinación de la afinidad de Fab anti PD-1 humanizados mediante RPS

Se convirtieron mAb anti PD-1 en la versión de Fab mediante PCR para fusionar las regiones variables de cadenas pesadas y ligeras con el extremo N de IgG2-CH1 humano y región constante de cadena kappa, respectivamente, y se subclonaron en el vector pcDNA3.1 (Invitrogen). Ambos vectores de expresión se coexpresaron en células 293-F usando un protocolo de transfección transitoria similar a la expresión transitoria de anticuerpos completos. En resumen, la cadena kappa de Fab se amplificó mediante PCR y se subclonó en un vector de expresión basado en pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). En un plásmido separado, la región variable de cadena pesada (VH) junto con la secuencia codificante de CH1 de IgG2 humano se fusionó con un marcador de c-Myc-His8 C terminal mediante PCR solapante y después se subclonó en el vector de expresión. Las mutaciones C232S y C233S (numeración de restos de Kabat, Kabat *et al.* Sequence of proteins of immunologic interest, 5ª ed Bethesda, MD, NIH 1991) se introdujeron en la cadena pesada de IgG2 para evitar el intercambio de enlaces disulfuro y estabilizar IgG2 humana en la conformación de IgG2-A (Lightle *et al.* 2010 Protein Sci 19 (4): 753-762). Ambas construcciones contenían un péptido señal cadena arriba de las secuencias maduras de Fab. Se logró expresión secretada de Fab mediante cotransfección de 2 plásmidos anteriores en células 293-F y se recogieron los sobrenadantes de cultivo celular 6-7 días después de la transfección. Se purificaron Fab marcados con His8 de sobrenadantes de cultivo celular usando una columna de Ni-sepharose Fast Flow (Cat. n.º 17531801, GE Life Sciences) seguido de cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna HiLoad 16/60 Superdex200 (Cat. n.º 17106901, GE Life Sciences). Los Fab purificados se concentraron hasta 0,5-5 mg/ml en PBS y se almacenaron en alícuotas en un congelador a -80 °C.

Para determinaciones de afinidad de Fab anti PD-1, se usaron ensayos de RPS con el instrumento BIAcore™ T-200 (GE Life Sciences). En resumen, se acopló PD-1/His humano o PD-1/His de mono cinomolgo a chips biosensores CM5 activados (Cat. n.º BR100530, GE Life Sciences) para conseguir aproximadamente 100-200 unidades de respuesta (UR), seguido de bloqueo de los grupos que no había reaccionado con etanolamina 1 M. Se inyectaron muestras de Fab de concentración creciente de 0,12 nM a 90 nM en el tampón de ejecución de RPS (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween20 al 0,05 %, pH 7,4) a 30 µl/minuto y se calcularon las respuestas de unión en PD-1/His humana o PD-1/His de mono restando las UR de una celda de flujo en blanco. Se calcularon las velocidades de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) usando el modelo de unión de Langmuir uno a uno (Software BIA Evaluation, GE Life Sciences). La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calculó como la relación k_{off}/k_{on} .

Las afinidades de unión determinadas mediante RPS de Fab anti PD-1 se han enumerado en la tabla 18. Cada Fab anti PD-1 se unió con alta afinidad ($K_d = 0,15\text{-}1\text{ nM}$) con PD-1 humana. Todos los Fab, excepto 326-3G1, se unieron con afinidades ligeramente menores pero similares (en un intervalo de 5 veces en K_d) con PD-1 de mono cinomolgo.

Ejemplo 8. Generación y expresión de mAb anti PD-1 recombinantes con región constante de IgG4 humana modificada

Ya que PD-1 se expresa principalmente en linfocitos T activados, se espera que los anticuerpos de bloqueo de PD-1 ligados al tipo de origen natural de restos de IgG-Fc induzcan funciones efectoras mediadas por Fc, tales como ADCC y CDC, en un grado variable dependiendo de las subclases de IgG, lo que da como resultado la eliminación de linfocitos T activados (Natsume A., *et al.* 2009 Drug Des Devel Ther. 3: 7-16). Se ha mostrado en muchos informes anteriores que la subclase de anticuerpo humano IgG4 tiene ADCC moderada y casi ninguna función efectora CDC (Moore GL, *et al.* 2010 MAbs, 2: 181-189). Por otro lado, se ha descubierto que la IgG4 natural es menos estable en condiciones de tensión tales como en tampón ácido o en temperatura creciente (Angal, S. 1993 Mol Immunol, 30:105-108; Dall'Acqua, W. *et al.* 1998 Biochemistry, 37: 9266-9273; Aalberse *et al.* 2002 Immunol, 105: 9-19). Para evitar que los linfocitos T PD-1⁺ sean destruidos y mejorar las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos anti PD-1, los mAb humanizados se unieron a IgG4 modificado por ingeniería genética mediante combinaciones de mutaciones para tener actividades de unión a FcγR o unión a C1q reducidas o nulas, atenuando o eliminando, por lo tanto, las funciones efectoras ADCC y CDC. Teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas del anticuerpo como un fármaco biológico, una de las propiedades menos deseables, intrínsecas, de IgG4 es la separación dinámica de sus dos cadenas pesadas en solución para formar medio anticuerpo, lo que conduce a anticuerpos biespecíficos generados *in vivo* mediante un proceso denominado "intercambio de ramas de Fab" (Van der Neut Kofschoten M, *et al.* 2007 Science, 317: 1554-157). La mutación de serina a prolina en la posición 228 (sistema de numeración de EU) pareció ser inhibidora para la separación de cadenas pesadas de IgG4 (Angal, S. 1993 Mol Immunol, 30: 105-108; Aalberse *et al.* 2002 Immunol, 105: 9-19). Se ha informado de que algunos de los restos de aminoácidos en la región bisagra y γFc influyen en la interacción del anticuerpo con receptores Fcγ (Chappel SM, *et al.* 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 9036-9040; Mukherjee, J *et al.*, 1995 FASEB J, 9: 115-119; Armour, K.L. *et al.*, 1999 Eur J Immunol, 29: 2613-2624; Clynes, R.A. *et al.*, 2000 Nature Medicine, 6: 443-446; Arnold J.N., 2007 Annu Rev Immunol, 25: 21-50). Asimismo, algunas isoformas de IgG4 que aparecen con poca frecuencia en la población humana también pueden inducir diferentes propiedades fisicoquímicas (Brusco, A. *et al.* 1998 Eur J Immunogenet, 25: 349-55; Aalberse *et al.* 2002 Immunol, 105: 9-19). Sin embargo, la agrupación de todas las mutaciones e isoformas previamente descubiertas en un anticuerpo específico no garantiza que una molécula de anticuerpo ideal comparta todas las características de productos terapéuticos tal como se ha descrito anteriormente, lo que puede resultar del efecto contradictorio de las mutaciones combinadas y de la influencia de la región variable en la función efectora y las propiedades fisicoquímicas de un anticuerpo (Igawa T. *et al.*, 2010 Prot Eng Design Select, 23: 385-392; Perchiacca J.M. y Tessier P.M., 2012 Ann Rev Biomol Eng 3: 263-286).

Para generar mAb anti PD-1 con menos ADCC, CDC e inestabilidad, se modificaron la región bisagra y yFc de IgG4 humano mediante la introducción de varias combinaciones de mutaciones, que crearon de IgG4mt1 a IgG4mt12. Algunas de las variantes de IgG4 modificadas eran claramente menos deseables como se indica por los resultados del ensayo, varias variantes de IgG4 relevantes y secuencias modificadas se enumeraron en la tabla 19. La evaluación de estos anticuerpos se describe en el presente documento.

Tabla 19. Modificaciones de secuencias de variantes de IgG4

IgG4 y variantes	Restos de aminoácidos*																
	...	228	229	230	231	232	233	234	235	236	...	265	...	309	...	409	...
IgG4	...	S	C	P	A	P	E	F	L	G	...	D	...	L	...	R	...
IgG4mt1	...	P	C	P	A	P	E	F	L	G	...	D	...	L		R	...
IgG4mt2	...	P	C	P	A	P	P	V	A	G	...	D	...	L		R	...
IgG4mt6	...	P	C	P	A	P	P	V	A	G	...	A	...	L	...	R	...
IgG4mt8	...	P	C	P	A	P	P	V	A	G	...	T	...	L	...	R	...
IgG4mt9	...	P	C	P	A	P	P	V	A	G	...	A	...	L	...	K	...
IgG4mt10	...	P	C	P	A	P	P	V	A	G	...	A	...	V	...	K	...

* La numeración de aminoácidos se basa en el sistema de EU. Los cambios están destacados por subrayado.

Ejemplo 9. IgG4mt10 no tiene unión a FcγR, y tiene menor función efectora ADCC y CDC

ADCC se inicia cuando un anticuerpo se une con la proteína diana de superficie celular seguido de ligamiento con receptores Fcγ (FcγR) expresados en células efectoras. Está bien documentado que IgG1 humano tiene unión significativamente mayor con FcγR que IgG2 e IgG4, especialmente, unión con FcγR-1 y FcγR-IIIa, que se correlacionó con la fuerza de IgG1 para activar ADCC. De manera que recuerda a ADCC, CDC se activa cuando un anticuerpo se entrecruza con una diana de superficie celular y proteína C1q, que se sigue de una reacción en cascada de formación del complejo del complemento y lisis de células diana. Como sustituto de ADCC y CDC, los ensayos de unión de anticuerpos con FcγR y C1q pueden actuar como el indicador fundamental de ADCC y CDC. Se evaluó por lo tanto de manera sistemática la unión de mAb con todos los FcγR principales.

Unión a FcγR

Se determinó la unión de diversos mutantes de IgG4 con FcγR mediante citometría de flujo. En resumen, se estableció una serie de transfectantes de HEK293 que expresaban FcγR humanos. Estos transfectantes expresaban FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB o FcγRIIIA. Se coexpresaron FcγR multisubunitarios (es decir, FcγRI y FcγRIIIA) con FcγRy. También se incluyeron variantes polimórficas (es decir, FcγRIIA H131 y R131, FcγRIIIA F158 y V158). Se usó un anticuerpo secundario (F(ab)2 de cabra anti IgG humano-Alexa Fluor 488, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EE. UU.) para detectar la unión de mAb anti PD-1 con variantes de IgG4 modificadas (tabla 19) con células HEK293 FcγR*. Como se esperaba, los mAb anti PD-1 en formato IgG1 (hu317-1/IgG1 y hu317-4B6/IgG1) se unen fuertemente con todos los FcγR, incluyendo FcγRI, FcγRIIA (alelos H131 y R131), FcγRIIB y FcγRIIIA (alelos V158 y F158) (tabla 20). Resulta interesante que cuando las dos versiones diferentes de mAb de humanización, hu317-1 y hu317-4B6 (con diferencias tanto en Vh como en Vk), se generaron en el mismo formato variante de IgG4, tal como en formato de IgG4mt1 o en formato de IgG4mt6, su fuerza de unión (IFM) varía en un intervalo de dos veces a casi 100 veces (por ejemplo, 455,2/115,7 = 3,9 veces; 13,6/1,0 = 13,6 veces; 434,6/4,9 = 88,7 veces; etc., véase tabla 20). Es coherente con los hallazgos anteriores por otros de que las regiones variables de los anticuerpos no tienen una influencia significativa en la unión con FcR, ejerciendo, por lo tanto, la influencia en la función efectora tal como ADCC (Igawa T. *et al.*, 2010 Prot Eng Design Select, 23: 385-392; Perchiacca J.M. y Tessier P.M., 2012 Ann Rev Biomol Eng 3: 263-286).

Como se demuestra en la tabla 20, cuando se prepararon hu317-4B6 y hu326-4A3 en formato de IgG4mt10, tenían la menor actividad de unión con FcγR entre los mAb de PD-1 y formatos variantes de IgG enumerados en la tabla, así como muchos otros mAb de humanización y formatos de IgG que se ensayaron en el estudio. La singularidad de hu317-4B6 y hu326-4A3 en el formato de IgG4mt10 a este respecto puede no extenderse a la misma familia de mAb de humanización con homología de secuencia algo distante, tal como hu317-1, como se ha descrito anteriormente.

Tabla 20. Fuerza de unión (IFM*) de mAb anti PD-1 con FcR determinada mediante FACS

mAb	FcγRI	FcγRIIA (H131)	FcγRIIA (R131)	FcγRIIB	FcγRIIIA (F158)	FcγRIIIA (V158)
hu317-1/IgG1	2152,9	168,7	139,6	442,4	99,7	277,2
hu317-4B6/IgG1	2771,7	1,7	0,6	1,9	28,0	293,7
hu317-1/IgG4mt1	455,2	21,3	21,9	434,6	0,6	20,7
hu317-4B6/IgG4mt1	115,7	0,2	0,0	4,9	0	6,1
hu317-1/IgG4mt6	13,6	1,0	0,8	1,8	0,9	1,1

(continuación)

mAb	FcγRI	FcγRIIA (H131)	FcγRIIA (R131)	FcγRIIB	FcγRIIA (F158)	FcγRIIA (V158)
hu317-4B6/IgG4mt6	1,0	0	0	0	0	0
hu317-4B6/IgG4mt10	0,4	0	0	0	0	0
hu326-4A3/IgG4mt10	0,5	0	0	0	0	0
*IFM: intensidad de fluorescencia media a partir de análisis de FACS						

ADCC

- 5 La ADCC clásica implica la activación de linfocitos NK mediante anticuerpos que interaccionan con FcγRIIA o CD16. Para verificar si los mAb anti PD-1 humanizados inducen ADCC, se usaron células NK92MI/CD16V, que se generaron a partir de células NK92MI (ATCC) mediante cotransducción de plásmidos de expresión que contenían genes *CD16* (alelo V158) y *FcRγ*, como células efectoras, y se usó la línea de linfocitos T que expresa PD-1, HuT78/PD-1, como células diana. Se cocultivaron células NK92MI/CD16V (4×10^4) con un número igual de células
- 10 HuT78/PD-1 en placas de fondo en V de 96 pocillos durante 5 horas. Se determinó la citotoxicidad mediante ensayo de liberación de LDH descrito en la sección anterior. Los resultados confirmaron que hu317-4B2/IgG4mt6, hu317-4B6/IgG4mt6, hu317-4B6/IgG4mt10 y hu326-4A3/IgG4mt10 tenían todos nivel basal de ADCC en comparación con los controles positivos (fig. 7). La diferencia menor en ADCC entre esos 4 mAb puede ser atribuible al error experimental (véase barras de error en la fig. 7).

CDC

- Los anticuerpos IgG4 humanos, en general, no inducen ninguna CDC mediante la ruta clásica. Se evaluó si los mAb anti PD-1 en formato IgG4mt10 desencadenarán CDC usando una línea de linfocitos T que expresan PD-1, Hut78/PD-1 y suero humano nuevo de donantes sanos. Se determinó la lisis celular mediante CDC por equipos de ensayo de Celltiter glo (Promega, Beijing, China). En resumen, se incubaron células HuT78/PD-1 (2×10^4) en RPMI1640 sin suero (Invitrogen) con Ab anti PD-1 (10 pg/ml) a 37 °C durante 15 minutos antes de añadir suero humano normal (NHS) a la concentración final de 15 % o 50 % en placas de fondo plano de 96 pocillos en un volumen total de 120 μl. Después de incubación durante una noche a 37 °C, las células se lisaron y ensayaron para
- 25 determinar la concentración de ATP. Para probar si los mAb anti PD-1 humanizados en IgG4mt10 pueden destruir linfocitos T primarios PD-1⁺ mediante CDC, se preactivaron PBMC aisladas de donantes sanos con Ab anti CD3 OKT3 (40 ng/ml) durante 3 días antes de cocultivo con Ab anti PD-1 más NHS. La cantidad de ATP es directamente proporcional al número de células presentes en cultivo. Se leyó la fluorescencia usando un fluorímetro de 96 pocillos (PHERA Star FS, BMG LABTECH). Los resultados se expresan en unidades de fluorescencia relativas (UFR) que
- 30 son proporcionales al número de células viables. El porcentaje de actividad de CDC se calculó de la siguiente manera: % de actividad de CDC = [(UFR de prueba - UFR de fondo)/(UFR en lisis celular total - UFR de fondo)] x 100. En general, no se pudo detectar ninguna ADCC mediada por mAb anti PD-1 en formato IgG4mt10 que se unan con PBMC activadas. En condiciones experimentales hipersensibles, tales como usando la línea celular que expresa en gran medida PD-1, alta concentración de suero y anticuerpos, se detectó un nivel muy bajo de CDC en algunas
- 35 ocasiones, y no hubo muchas diferencias entre diferentes versiones y mAb anti PD-1, lo que indica que los mAb anti PD-1 en formatos variantes de IgG4 conservaron la característica de actividad CDC baja o ausente como la forma común de IgG4.

Ejemplo 10. Los mAb anti PD-1 humanizados en formato IgG4mt10 tienen mayor estabilidad en condiciones de tensión

Estabilidad de anticuerpos anti PD-1 en condiciones de alta temperatura y ácidas.

- Los anticuerpos anti PD-1 usados en estudios de estabilidad se purificaron todos a partir de columna de proteína A seguido de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) como se ha descrito en secciones anteriores. Después de la purificación, los contenidos del agregado de muestras de anticuerpos purificados se supervisaron en cromatografía de exclusión por tamaño analítica-cromatografía líquida de alto rendimiento (SEC-HPLC), que quedaron dentro del intervalo de 0 % -0,5 %.
- 45 Para análisis de SEC-HPLC, las muestras de anticuerpos se analizaron usando una columna de TSKgel G3000 SWXL (7,8 x 300 mm, Cat. n.º. 08541, Tosoh Bioscience, Shanghai, China) en condiciones de elución isocrática (tampón de elución de fosfato de sodio 0,2 M, pH 7,2) y detección posterior a UV-215 nm. En cada ciclo, se cargaron 10 microlitros de muestra de anticuerpo en la columna y se eluyeron a un caudal de 1 ml/minuto. El dímero de especies de agregados mayores de anticuerpos se separaron de las especies monoméricas y se determinaron los
- 55 porcentajes de dímeros y agregados en función de las áreas máximas integradas de trazas UV.

Para estudio de estabilidad en almacenamiento con velocidad mejorada, los anticuerpos anti PD-1 (10-40 mg/ml en PBS) se mantuvieron en incubadoras a 40-50 °C durante 4-7 días para probar la estabilidad de los anticuerpos en condiciones de alta temperatura. Las muestras de anticuerpos se analizaron después para determinar la formación inducida por calor de dímero y agregados en SEC-HPLC. Para cada uno de los anticuerpos anti PD-1 analizados, menos del 2 % se convirtieron en especies de mayor peso molecular (dímeros y agregados), lo que indica que los anticuerpos anti PD-1 tuvieron buena estabilidad en condiciones de alta temperatura.

La estabilidad del anticuerpo en condición ácida ha sido un reto clave en el proceso de fabricación corriente abajo (Liu *et al.* 2010 mAbs 2:480-499). La elución de anticuerpos a partir de proteína A e inactivación de virus requieren habitualmente incubación del anticuerpo en condiciones de pH bajo (2,5-4). Sin embargo, dichas condiciones ácidas podrían provocar potencialmente desnaturalización y agregación de los anticuerpos. Se ha sabido que el IgG4 humano es menos estable que IgG1 e IgG2 (2002 Immunology 105:9). Por lo tanto, se ensayaron los mAb humanizados preparados con diversas formas mutantes de IgG4. En resumen, se estudiaron las estabildades de anticuerpos en condiciones de pH bajo en volumen 1:1 de cada muestra de anticuerpo (10 mg/ml en PBS) mezclada con tampones de pH bajo que contenían citrato de sodio 50 mM, NaCl 100 mM a pH 3,6, 3,3, 3,0 o 2,7, respectivamente. Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, las muestras de anticuerpos en condiciones de pH bajo se neutralizaron mediante dilución 1:5 en tampón de elución de SEC-HPLC que contenía fosfato de sodio 0,2 M, pH 7,2. Se realizaron análisis de SEC-HPLC como se ha descrito anteriormente y se cuantificaron los porcentajes de dímeros y agregados inducidos por condiciones de pH bajo. El mAb anti PD-1 317-4B6 en formato IgG1 era más estable en condiciones ácidas relevantes para bioprocesamiento incluso cuando el valor de pH se hace tan bajo como 2,7. Entre los mAb anti PD-1 preparados en varias variantes de IgG4, hu317-4B6/IgG4mt10 y hu326-4A3/IgG4mt10 fueron los más estables en la condición de tampón ácido (tabla 21) ya que los agregados inducidos por ácido se redujeron significativamente hasta un nivel que era similar al del formato de IgG1 de mAb anti PD-1, 317-4B6 y 326-4A3, es decir el agregado soluble es menos del 2 % (tabla 21).

Tabla 21. Dímeros y agregados solubles formados en tampones ácidos y ensayados mediante SEC-HPLC

mAb anti PD-1	% de dímero y agregados				
	pH7,2	pH3,6	pH3,3	pH3,0	pH2,7
317-4B6/IgG1	0,0 %	0,0 %	0,2 %	0,1 %	0,2 %
317-4B6/IgG4mt1	0,0 %	1,0 %	11,0 %	49,0 %	48,0 %
317-4B6/IgG4mt3	0,0 %	13,0 %	31,0 %	>50 %	>50 %
317-4B6/IgG4mt6	0,0 %	4,0 %	41,0 %	>50 %	>50 %
317-4B6/IgG4mt9	0,0 %	0,5 %	2,1 %	3,3 %	2,0 %
317-4 B6/IgG4mt10	0,0 %	0,2 %	0,6 %	0,6 %	1,4 %
326-4A3/IgG4mt10	0,0 %	0,0 %	0,4 %	0,5 %	1,2 %

Ejemplo 11. Mapeo de los epítomos de unión de mAb anti PD-1

Informes previos acerca de las estructuras cristalinas de complejos de PD-1/PD-L1 y PD-1/PD-L2 han aportado información para el entendimiento de los restos de aminoácidos (AA) críticos en PD-1 que son necesarios para la unión a ligando (Zhang *et al.* 2004 Immunity, 20:337-347; Lin DY *et al.* 2008 PNAS 105:3011-3016; Lazar-Molnar E. *et al.* 2008 PNAS, 105:10483-10488). De hecho, seis de dichos restos de AA se identificaron en el receptor mediante análisis de mutación puntual necesario para unión a PD-L1. Cinco de los seis restos de AA también eran necesarios para la unión a PD-L2 (Lin D.Y. *et al.* 2008 PNAS 105:3011-3016). Basándose en la información del análisis de mutación guiada por estructura se planteó la hipótesis de que el modo más eficaz para que los mAb funcionales bloqueen la señalización mediada por PD-1 es competir con ligandos de PD-1 uniéndose con los seis restos de AA críticos ocupando, por lo tanto, los epítomos de unión necesarios para la unión a ligando. Para explorar la hipótesis y entender el mecanismo de acción mediante anticuerpos de PD-1 funcionales, se realizaron seis mutantes de PD-1 reemplazando cada uno de los seis AA críticos por Ala, individualmente, es decir, K45A, I93A, L95A, P97A, I101A y E103A (numeración de restos de AA basada en Lin D.Y. *et al.* 2008 PNAS 105: 3011-3016). Los mutantes PD-1/Fc y PD-1/His (fig. 1) se usaron como moldes para mutagénesis guiada por PCR o mutagénesis de círculo rodante usando el sistema de mutagénesis rápida (Cat. n.º FM111, Transgen Biotech, Beijing, China). Todos los mutantes se subclonaron en los vectores de expresión basados en pcDNA de los inventores y se verificaron mediante secuenciación. Las proteínas PD-1 mutadas y de tipo silvestre se expresaron mediante transfección transitoria (descrita en el ejemplo 1) y se prepararon después de 4 a 6 días de cultivo. El medio acondicionado (MC) se analizó mediante transferencia de Western para verificar la expresión de la proteína PD-1 con respecto a calidad y cantidad. Los sobrenadantes (MC), después de eliminar los residuos celulares, se usaron directamente en análisis de ELISA o transferencia de Western para mapeo de epítomos.

Para estudiar los epítomos de unión de mAb anti PD-1 humanizados, se realizaron ensayos de ELISA usando el PD-1 de tipo silvestre (TS) y mutante (Mt) para evaluar las actividades de unión de hu317-4B5, hu317-4B6, hu326-3B1 y hu326-4A3. Para comprobar la singularidad de la identificación de unión del anticuerpo, se incluyeron dos anticuerpos de referencia (Ab de referencia 1 y Ab de referencia 2 de los documentos US8008449B2 y US8168757B2, respectivamente) en el estudio. Se aplicó un volumen igual de MC que contenía PD-1 TS o Mt en una placa de 96 pocillos para todos los mAb en el mismo ensayo de ELISA. Todos los resultados de ELISA se

normalizaron usando las lecturas de ELISA medias de señales de unión de PD-1 TS como el patrón. Las señales de unión de ELISA con un PD-1 Mt específico se normalizaron adicionalmente frente a la mayor lectura de unión de anticuerpo (establecida como 100 %) con el PD-1 Mt específico. Por conveniencia para el análisis de datos, cuando una señal de unión de ELISA de un mAb para un mutante específico descendió por debajo del 50 % en relación con PD-1 TS, se define que el resto de aminoácido es un epítipo de unión significativo porque su mutación anuló significativamente la unión de anticuerpo. De manera análoga, si una señal de unión a ELISA de un mAb para un mutante específico descendió por debajo del 25 %, se define como muy significativa. Como se muestra en la fig. 8, dos de los restos de AA críticos en PD-1, K45 e I93, son epítipos significativos o muy significativos para unión de mAb hu317-4B5 y hu317-4B6 y tres restos de AA, I93, L95 y P97, son epítipos significativos o muy significativos para hu326-3B1 y hu326-4A3. Por otro lado, los dos anticuerpos de referencia tienen epítipos de unión definidos, P97 es significativo para la referencia Ab-1, mientras que L95 y P97 son significativos para el Ab de referencia 2.

Resulta interesante que cuando la proteína PD-1 está desnaturalizada en transferencia de Western, los mAb hu317-4B5 y -4B6 aún eran capaces de unirse con PD-1 TS aunque los epítipos de unión críticos (K45 e I93) no están cerca entre sí (no lineales). Se indica que la proteína PD-1 se renaturalizó en algún grado después de la desnaturalización en SDS-PAGE del proceso de Transferencia de Western, que permite que los mAb anti PD-1 la reconozcan y se unan con ella. Aprovechando esta observación, se realizó análisis de transferencia de Western para los seis anticuerpos usados en el estudio de ELISA anterior. Los resultados generales de transferencia de Western corroboraron muy bien los resultados de ELISA, es decir los epítipos significativos o muy significativos, cuyas mutaciones dieron lugar a señales de unión bajas en ELISA, también proporcionaron la banda de transferencia de Western más débil en comparación con la unión con otro PD-1 mutante (fig. 8). También se observaron algunas diferencias menores entre ELISA y transferencia de Western, p. ej., las señales de unión de ELISA en I93A y E103A por el Ab de referencia 2 fueron relativamente más fuertes que las de la transferencia de Western. Puede ser indicativo de que esos restos de AA también pueden contribuir a la unión debido a que sus mutaciones influyen en la unión aunque solo en condiciones de tensión (es decir, desnaturalización o pérdida de la conformación nativa). Como se resume en la tabla 22, los mAb anti PD-1 en la presente invención tienen epítipos de unión identificables que difieren de otro anticuerpo anti PD-1.

Tabla 22. Sumario* de epítipos clave mediante mAb anti PD-1

	K45A	I93A	L95A	P97A	I101A	E103A
hu317-4B5	***	**				
hu317-4B6	***	**				
hu326-3B1		**	**	**		
hu326-4A3		***	**	**		
Ref. Ab-1				**		
Ref. Ab-2			**	**		

* basado en la Figura 8

Ejemplo 12. Los mAb anti PD-1 activan PBMC humanas primarias e inhiben el crecimiento tumoral en modelos de ratón de xenoinjerto

Los mAb anti PD-1 humanizados activan PBMC humanas

Durante todos los procesos de humanización, los mAb anti PD-1 humanizados en diversas etapas conservaron actividades funcionales similares según lo evaluado mediante ELISA, FACS y ensayos de liberación de citocinas basados en células inmunitarias. Para confirmar la función de las versiones finales de mAb humanizados, se ensayaron las funciones activadoras de hu317-4B5, hu317-4B6, hu326-3B1 y hu326-4A3 usando PBMC humanas primarias. Los resultados demostraron que los mAb durante toda la humanización mantuvieron las funciones de mAb murino original para activar PBMC primarias aunque el grado de activación difiere entre los cuatro donantes debido a la variación del fondo genético del individuo (fig. 9).

Los mAb anti PD-1 humanizados potencian la citotoxicidad basada en linfocitos NK contra células cancerosas

De manera que recuerda a los mAb murino originales, los mAb anti PD-1 humanizados, hu317-4B5, hu317-4B6, hu326-3B1 y hu326-3G1, potencian la citotoxicidad mediada por células NK92MI/PD-1 contra las células de cáncer de pulmón diana, SK-MES-1/PD-L1, de una manera dependiente de dosis (fig. 10, tabla 23). Pareció evidente que, en principio, los mAb anti PD-1 humanizados podrían actuar para romper la tolerancia de las células inmunitarias mediada por señalización de PD-1, potenciando la actividad de destrucción del cáncer mediante células inmunitarias, p. ej., linfocitos NK y linfocitos T citotóxicos.

El mAb anti PD-1 humanizado activa PBMC humanas e inhibe el crecimiento tumoral en un modelo de cáncer de xenoinjerto de ratón in vivo

Todas las pruebas experimentales anteriores indicaron que los mAb anti PD-1 podrían actuar en modelos de cáncer de ratón utilizando ratones inmunocomprometidos con xenoinjertos de células de cáncer humano, implantando

posteriormente PBMC humanas y aplicando el tratamiento de mAb para inhibir el crecimiento de células cancerosas *in vivo*. El experimento se diseñó de la siguiente manera. Se inocularon ratones macho SCID de siete-ocho semanas de edad (Vital River Laboratories, China) por vía subcutánea en el flanco derecho con 3×10^6 células Hep3B/OS8-PD-L1 en Matrigel al 50 % (BD Biosciences, Nueva Jersey, EE. UU.). Quince días después de la inoculación tumoral, los ratones que portaban un tamaño tumoral de entre 100 y 250 mm³ se aleatorizaron y se dividieron en tres grupos de tratamiento. Se inyectaron por vía intratumoral cien microlitros de PBMC agrupadas (5×10^5) de 2 donantes sanos. Tres días después de la implantación de PBMC, se administraron anticuerpos anti PD-1 (Hu317-IgG4mt2) e IgG humano mediante s.c. a una dosis de 10 mg/kg, respectivamente. Se repitió el tratamiento con anticuerpos una vez cada 10 días durante un total de 3 veces. Se inyectó PBS en un grupo paralelo como control negativo. Los tumores se midieron dos veces a la semana usando un calibrador a partir del día 7. Los volúmenes tumorales se calcularon usando la siguiente fórmula: $[D \times (d^2)]/2$, en la que D representa el diámetro mayor del tumor, y d representa el diámetro menor. Todos los estudios de animales se realizaron siguiendo los Procedimientos de Cuidado y Uso de Animales de Beigene.

En el estudio *in vivo*, aunque 60 % de los tumores en los grupos de control remitieron por sí solos, el resto del experimento *in vivo* aún es bastante informativo, lo que se presenta en la fig. 11. En los grupos de control, grupo tratado con vehículo o tratado con IgG humano (hulG), cada uno tiene 40 % de tumores (2 de 5 ratones) que crecen más que el valor de referencia en el punto de partida. Los dos tumores en el grupo tratado con PBS crecieron mucho más (por encima de 2.000 mm³, un ratón portador de tumor se sacrificó más temprano debido a que pasó el límite del tamaño tumoral por protocolo). Los dos tumores en el grupo tratado con hulG crecieron hasta el tamaño de 800 y 1.370 mm³, significativamente más que el promedio del valor de referencia de 164 mm³, aunque menor que los tumores tratados con PBS. Por otro lado, en el grupo tratado con mAb anti PD-1 (hu317-1/IgG4mt2), los tumores remitieron completamente o estaban cerca del tamaño del valor de referencia (un tumor = 200 mm³, que volvió a crecer de nuevo lentamente después de remitir hasta 50 % del valor de referencia a las dos semanas de implantación de PBMC). Los resultados indicaron que el mAb anti PD-1 descrito anteriormente puede activar células inmunitarias humanas que inhiben el crecimiento de células tumorales en el modelo de cáncer *in vivo* de ratón, lo que es coherente con los resultados experimentales *in vitro* descritos anteriormente.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BeiGene
Li, Kang
Zhang, Tong
Song, Jing
Xu, Lanlan
Liu, Qi
Peng, Hao

<120> ANTICUERPOS ANTI-PD1 Y SU USO COMO PRODUCTOS TERAPÉUTICOS Y DE DIAGNÓSTICO

<130> BGB 108

<160> 90

<170> Patentin versión 3.5

<210> 1
<211> 444
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 792 183 T3

```

ccaggatggt tcttagactc cccagacagg ccttgaacc cccccacett ctecccagcc      60
ctgctcgttg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg      120
gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc      180
gccttccccg aggaccgcag ccagcccggc caggactgcc gcttcctgtg cacacaactg      240
cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcaggggcc ggcgcaatga cagcggcacc      300
tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgcaga tcaaagagag cctgcgggca      360
gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgcccacag cccaccccag cccctcacc      420
aggccagccg gccagttcca aacc                                             444

```

<210> 2
 <211> 148
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
 1 5 10 15

Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
 20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
 35 40 45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
 50 55 60

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

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
 85 90 95

Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala
 100 105 110

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
 115 120 125

Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
 130 135 140

Gln Phe Gln Thr
 145

<210> 3

<211> 354
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 3

```

caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcaaagaa cctgtccatc      60
acttgcaactg tctctgggtt ttcattaacc agctatgggtg tacactggat tcgccagcct      120
ccaggaaagg gactggaatg gctgggagta atatgggccg gtggaagcac aaattataat      180
tcggctctca tgtccagact gagcatcagc aaagacaact ccaggagcca agttttctta      240
agaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatgtact actgtgccag agcctatggt      300
aactactggt acatcgatgt ctggggcgca gggaccacgg tcaccgtctc ctca          354
  
```

<210> 4
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10

<400> 4

15

```

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

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

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

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

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

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

Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Ile Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr
                100              105              110

Thr Val Thr Val Ser Ser
                115
  
```

<210> 5
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

20

25 <400> 5

ES 2 792 183 T3

```

gacattgtga tgacccagac tcccaaattc ctgcttgtat cagcaggaga cagggttacc      60
ataacctgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtag cttggtacca acagaagcca      120
gggcagtctc ctaaactgct gataaactat gcatttcacg gcttcactgg agtccctgat      180
cgtttcactg gcagtggata tgggacggat ttcattttca ccatcagcac tgtgcaggct      240
gaagacctgg cagtttatit ctgtcaccag gcttatagtt ctccgtacac gttcggaggg      300
gggaccaagc tggaaatgaa a                                              321

```

<210> 6
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 6

```

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

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

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

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

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

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

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

```

<210> 7
 <211> 342
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 7

cagatccagt tgggtgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60
 tcctgcaagg cttctgggta taccttcaca aactatggaa tgaactgggt gaagcaggct 120
 ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacaata ataatggaga gccaacatat 180
 gctgaagagt tcaagggacg gtttgccctc tctttggaaa cctctgccag cactgcctat 240
 ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac acggctacat atttctgtgc aagagatggt 300
 atggactatt ggggtcaagg aacctcagtc accgtctcct ca 342

<210> 8
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 8

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

Ser Ser

<210> 9
 <211> 330
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 9

ES 2 792 183 T3

```

gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc      60
atatcctgca gagccagtga aagtgttgat aattatggct atagttttat gcactggtac      120
cagcagaaac caggacagcc accccaactc ctcatctatc gtgcatccaa cctagaatct      180
gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag gcttcaccct caccattaat      240
cctgtggagg ctgatgatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagtaaaga atatccgacg      300
ttcgggtggag gcaccaagct ggaagtcaaa      330

```

<210> 10
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 10

```

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

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

Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
          35           40           45

Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
          50           55           60

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
          85           90           95

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

```

<210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 11

```

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val His
1           5           10

```

<210> 12
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 12

ES 2 792 183 T3

	Val	Ile	Trp	Ala	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Met	Ser
	1				5					10					15	

5

<210> 13
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10

<400> 13

	Ala	Arg	Ala	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Trp	Tyr	Ile	Asp	Val
	1				5					10		

15

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 14

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

20

<210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

25

<400> 15

	Tyr	Ala	Phe	His	Arg	Phe	Thr
	1				5		

30

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

35

<400> 16

	His	Gln	Ala	Tyr	Ser	Ser	Pro	Tyr	Thr
	1				5				

40

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

45

<400> 17

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

50

<210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 18

Trp Ile Asn Asn Asn Asn Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 19

Ala Arg Asp Val Met Asp Tyr
1 5

<210> 20
<211> 15
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 20

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Tyr Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 21

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 22

Gln Gln Ser Lys Glu Tyr Pro Thr
1 5

<210> 23
<211> 354
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 317-4B6 ADNc-Vh

<400> 23

ES 2 792 183 T3

```

caggtgcagc tgcaggagtc gggaccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc      60
acctgcactg tctctgggtt ttcattaacc agctatggtg tacactggat ccggcagccc      120
ccaggggaagg gactggagtg gatcggggtc atatacgccg atggaagcac aaattataat      180
ccctccctca agagtcgagt gaccatatca aaagacacct ccaagaacca ggtttccctg      240
aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agcctatggt      300
aactactggt acatcgatgt ctggggccaa gggaccacgg tcacogtctc ctca          354

```

<210> 24
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 317-4B6 pro-Vh

<400> 24

Gln Val 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 Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

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

<220>
 <223> 317-4B6 ADNc-Vk

<400> 25

ES 2 792 183 T3

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
atcaactgca agtccagcga gagtgtgagt aatgatgtag cttggtacca gcagaaacca 120
ggacagcctc ctaagctgct cattaactat gcatttcacg gcttcactgg ggtccctgac 180
cgattcagtg gcagcgggta tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcaggct 240
gaagatgtgg cagtttatta ctgtcaccag gcttatagtt ctccgtacac gtttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

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

<220>
<223> 317-4B6 pro-Vk
<400> 26

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

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

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

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

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Ala Tyr Ser Ser Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 27
<211> 342
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 326-4A3 ADNc-Vh

<400> 27

ES 2 792 183 T3

caggtgcagc tgggtgcagag cggcagcag ctgaagaagc ccggcgccag cgtgaaggtg 60
agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc aactacggca tgaactgggt gagacaggcc 120
cccgccaggg gcctgaagtg gatgggctgg atcaacaaca acaacgcoga gccacactac 180
gccaggact tcagaggcag attcgtgttc agcctggaca ccagcgccag caccgcctac 240
ctgcagatca gcagcctgaa gaccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagagacgtg 300
atggactact ggggccaggg caccctggtg accgtgagca gc 342

<210> 28
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 326-4A3 pro-Vh

<400> 28

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Asn Asn Asn Ala Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Asp Phe
50 55 60

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

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

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

Ser Ser

<210> 29
<211> 330
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 326-4A3 ADNc-Vk

<400> 29

ES 2 792 183 T3

gacattgtgc tgacccagtc tccagcctcc ttggccgtgt ctccaggaca gagggccacc 60
atcacctgca gagccagtga aagtgttgat aattatggct atagttttat gcaactggat 120
cagcagaaac caggacaacc tcctaaactc ctgatttacc gtgcatccaa cctagaatct 180
gggggtcccag ccaggttcag cggcagtggt tctgggaccg atttcaccct cacaattaat 240
cctgtggaag ctgaggatac tgcaaattat tactgtcagc aaagtaaaga atatccgacg 300
ttcggcggag ggaccaaggt ggagatcaaa 330

<210> 30
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 326-4A3 pro-Vk
<400> 30

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

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 31

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val His
1 5 10

<210> 32

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> 317-4B6 H-CDR2 o CDR-H2
 <400> 32

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

10

<210> 33
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 33

Ala Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Ile Asp Val
 1 5 10

20

<210> 34
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> 317-4B6 L-CDR1 o CDR-L1
 <400> 34

30

Lys Ser Ser Glu Ser Val Ser Asn Asp Val Ala
 1 5 10

35

<210> 35
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 35

Tyr Ala Phe His Arg Phe Thr
 1 5

40

<210> 36
 <211> 9
 <212> PTR
 <213> *Mus musculus*

45

<400> 36

His Gln Ala Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr
 1 5

50

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

55

<400> 37

ES 2 792 183 T3

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

<210> 38
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 326-4A3 H-CDR2 o CDR-H2
<400> 38

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

Gly

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 39

Ala Arg Asp Val Met Asp Tyr
1 5

<210> 40
<211> 15
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 40

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Tyr Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 41
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 41

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 42

Gln Gln Ser Lys Glu Tyr Pro Thr
1 5

<210> 43
<211> 118

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> 317-4B2 pro-Vh

<400> 43

```

Gln Val 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 Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
          20          25          30

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

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

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
          85          90          95

Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
          100          105          110

Thr Val Thr Val Ser Ser
          115

```

10 <210> 44
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> 317-4B2 pro-Vk

20 <400> 44

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

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

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

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

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Ala Tyr Ser Ser Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 45

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 317-4B5 pro-Vh

<400> 45

Gln Val 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 Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

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

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

ES 2 792 183 T3

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 46
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 317-4B5 pro-Vk

<400> 46

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

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

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

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

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Ala Tyr Ser Ser Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 47
<211> 354
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 317-1 ADNc-Vh

<400> 47

ES 2 792 183 T3

cagggtgcagc tgcaggagtc gggaccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgggtt ttcattaacc agctatggtg tacactggat ccggcagccc 120
ccaggggaagg gactggagtg gctgggggtc atatgggccg gtggaagcac aaattataat 180
ccctccctca agagtcgact gaccatatca aaagacaact ccaagagcca ggtttccctg 240
aagatgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgagag agcctatggt 300
aactactggt acatcgatgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 48
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 317-1 pro-Vh

<400> 48

Gln Val 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 Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Lys Met Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 49
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 317-1 ADNc-Vk

<400> 49

ES 2 792 183 T3

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
atcaactgca aggccagcca gagtgtgagt aatgatgtag ctgggtacca gcagaaacca 120
ggacagcctc ctaagctgct cattaactat gcatttcacg gcttcactgg ggtccctgac 180
cgattcagtg gcagcgggta tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcaggct 240
gaagatgtgg cagtttatta ctgtcaccag gcttatagtt ctccgtacac gtttggcggg 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 50
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 317-1 pro-Vk

<400> 50

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

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

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

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

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Ala Tyr Ser Ser Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 51
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 326-3B1 pro-Vh

<400> 51

ES 2 792 183 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Asn Asn Asn Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Asp Phe
50 55 60

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

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

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

Ser Ser

<210> 52
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 326-3B1 pro-Vk

<400> 52

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

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

Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

ES 2 792 183 T3

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

Glu Tyr Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 53
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 326-3G1 pro-Vh

<400> 53

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Asn Asn Asn Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Asp Phe
50 55 60

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

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

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

Ser Ser

<210> 54
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 326-3G1 pro-Vk

<400> 54

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

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

Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

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

Glu Tyr Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 55
<211> 342
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 326-1 ADNc-Vh

<400> 55

caggtgcagc tgggtgcagag cggcagcgag ctgaagaagc ccggcgccag cgtgaaggtg 60
agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc aactacggca tgaactgggt gagacaggcc 120
cccgccagc gcttgagtg gatgggtgg atcaacaaca acaacggcga gccacctac 180
gccagggct tcagaggcag attcgtgttc agcctggaca ccagcgccag caccgcctac 240
ctgcagatca gcagcctgaa gaccgaggac accgcccgtgt acttctgcgc cagagacgtg 300
atggactact ggggccaggg caccaccgtg accgtgagca gc 342

<210> 56
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 326-1 pro-Vh

<400> 56

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser

<210> 57
<211> 330
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 326-1 ADNc-Vk

<400> 57

gacattgtgc tgaccagtc tccagcctcc ttggccgtgt ctccaggaca gagggccacc 60
atcacctgca gagccagtga aagtgttgat aattatggct atagttttat gcactgggtat 120
cagcagaaac caggacaacc tcctaaactc ctgatttacc gtgcatccaa cctagaatct 180
ggggtcccag ccaggttcag cggcagtggt tctaggaccg atttcaccct cacaattaat 240
cctgtggaag ctaatgatac tgcaaattat tactgtcagc aaagtaaaga atatccgacg 300
ttcggcggag ggaccaaggt ggagatcaaa 330

<210> 58
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 326-1 pro-Vk

<400> 58

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

Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr

ES 2 792 183 T3

20

25

30

Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

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

Glu Tyr Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 59
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 317-1 H-CDR2 o CDR-H2

<400> 59

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

<210> 60
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 317-4B2 H-CDR2 o CDR-H2

<400> 60

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

<210> 61
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 317-4B2 L-CDR1 o CDR-L1

<400> 61

Lys Ser Ser Glu Ser Val Ser Asn Asp Val Ala
1 5 10

<210> 62
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> 326-1 H-CDR2 o CDR-H2
 <400> 62
 10
 Trp Ile Asn Asn Asn Asn Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe Arg
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 63
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> 326-3G1 H-CDR2 o CDR-H2
 20
 <400> 63
 Trp Ile Asn Asn Asn Asn Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Asp Phe Arg
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 64
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> 317-3A1 pro-Vh
 30
 <400> 64
 Gln Val 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 Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 35

ES 2 792 183 T3

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 65
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 317-3C1 pro-Vh

<400> 65

Gln Val 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 Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 66
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<400> 66

ES 2 792 183 T3

Gln Val 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 Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 67
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 317-3F1 pro-Vh

<400> 67

Gln Val 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 Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

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

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

ES 2 792 183 T3

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 68

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 317-3G1 pro-Vh

<400> 68

Gln Val 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 Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 69

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<400> 69

ES 2 792 183 T3

Gln Val 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 Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 70
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 317-311 pro-Vh

<400> 70

Gln Val 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 Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

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

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

ES 2 792 183 T3

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 71
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 317-4B1 pro-Vh

<400> 71

Gln Val 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 Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 72
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<400> 72

ES 2 792 183 T3

Gln Val 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 Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

5 <210> 73
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> 317-4B4 pro-Vh
<400> 73

Gln Val 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 Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

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

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

15

ES 2 792 183 T3

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 74
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 317-4A2 pro-Vk

<400> 74

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

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

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

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

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Ala Tyr Ser Ser Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 75
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> 326-3A1 pro-Vh

<400> 75

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser

<210> 76
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 326-3C1 pro-Vh

<400> 76

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Asn Asn Asn Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Asp Phe
50 55 60

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

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

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

Ser Ser

<210> 77
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 326-3D1 pro-Vh

<400> 77

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser

<210> 78
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 326-3E1 pro-Vh

<400> 78

ES 2 792 183 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Asn Asn Asn Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Asp Phe
50 55 60

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

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

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

Ser Ser

<210> 79

<211> 114

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 326-3F1 pro-Vh

<400> 79

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser

<210> 80
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 326-3B N55D pro-Vh

<400> 80

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Asn Asn Asp Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Asp Phe
50 55 60

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

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

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

Ser Ser

<210> 81
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 326-4A1 pro-Vk

<400> 81

ES 2 792 183 T3

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

<210> 82
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 326-4A2 pro-Vk

<400> 82

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

Glu Tyr Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 83
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hulgG4mtl pro

<400> 83

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 84
<211> 327
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> hulgG4mt2 pro

<400> 84

ES 2 792 183 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr

ES 2 792 183 T3

65					70						75				80
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85						90				95		
Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
			100					105					110		
Pro	Val	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
		115					120					125			
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
	130					135					140				
Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
145					150					155					160
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe
				165					170					175	
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
			180					185					190		
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu
		195					200					205			
Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
	210					215					220				
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys
225					230					235					240
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
				245					250					255	
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
			260					265					270		
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
		275					280					285			
Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
	290					295					300				
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
305					310					315					320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 85
<211> 327
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> hulgG4mt6 pro

<400> 85

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Ala Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu

ES 2 792 183 T3

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

5 <210> 86
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> hulgG4mt8 pro

<400> 86

ES 2 792 183 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Thr Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

<210> 87
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> hulgG4mt9 pro

10

<400> 87

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

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 88
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hulgG4mtlO pro

<400> 88

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Pro Val Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Ala Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 89
 <211> 367
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> OS8 pro

10

<400> 89

Met Glu Arg His Trp Ile Phe Leu Leu Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

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

Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp
 115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser
 145 150 155 160

Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
 165 170 175

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser
 180 185 190

Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
 195 200 205

Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
210 215 220

Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
225 230 235 240

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
245 250 255

Glu Ile Asn Ser Ser Val Val Pro Val Leu Gln Lys Val Asn Ser Thr
260 265 270

Thr Thr Lys Pro Val Leu Arg Thr Pro Ser Pro Val His Pro Thr Gly
275 280 285

Thr Ser Gln Pro Gln Arg Pro Glu Asp Cys Arg Pro Arg Gly Ser Val
290 295 300

Lys Gly Thr Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro
305 310 315 320

Leu Ala Gly Ile Cys Val Ala Leu Leu Leu Ser Leu Ile Ile Thr Leu
325 330 335

Ile Cys Tyr His Arg Ser Arg Lys Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro
340 345 350

Leu Val Arg Gln Glu Gly Lys Pro Arg Pro Ser Glu Lys Ile Val
355 360 365

<210> 90
<211> 304
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> P3Z pro

<400> 90

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
35 40 45

ES 2 792 183 T3

Asn	Ala	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Asn	Thr	Ser	Glu	Ser	Phe	Val	50	55	60
Leu	Asn	Trp	Tyr	Arg	Met	Ser	Pro	Ser	Asn	Gln	Thr	Asp	Lys	Leu	Ala	65	70	75
Ala	Phe	Pro	Glu	Asp	Arg	Ser	Gln	Pro	Gly	Gln	Asp	Cys	Arg	Phe	Arg	85	90	95
Val	Thr	Gln	Leu	Pro	Asn	Gly	Arg	Asp	Phe	His	Met	Ser	Val	Val	Arg	100	105	110
Ala	Arg	Arg	Asn	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Leu	Cys	Gly	Ala	Ile	Ser	Leu	115	120	125
Ala	Pro	Lys	Ala	Gln	Ile	Lys	Glu	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Leu	Arg	Val	130	135	140
Thr	Glu	Arg	Arg	Ala	Glu	Val	Pro	Thr	Ala	His	Pro	Ser	Pro	Ser	Pro	145	150	155
Arg	Pro	Ala	Gly	Gln	Phe	Gln	Thr	Leu	Val	Val	Gly	Val	Val	Gly	Gly	165	170	175
Leu	Leu	Gly	Ser	Leu	Val	Leu	Leu	Val	Trp	Val	Leu	Ala	Val	Ile	Arg	180	185	190
Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	195	200	205
Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	210	215	220
Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	225	230	235
Gln	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	245	250	255
Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	260	265	270
Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	275	280	285
Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	290	295	300

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que comprende un dominio de unión a antígeno de anticuerpo que se une con PD-1 humana, y comprende:
5 una región variable de cadena pesada (Vh) que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 24; y una región variable de cadena ligera (Vk) que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 26.
2. El anticuerpo según la reivindicación 1, que se une con los restos de PD1: K45 e I93, equivalentes a K58 e I106 en la SEQ ID NO 2.
10
3. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende un dominio constante de IgG4 que comprende cualquiera de la SEQ ID NO: 83-88.
4. El anticuerpo según la reivindicación 3, que comprende un dominio constante de IgG4 que comprende las SEQ ID NO 87 u 88.
15
5. El anticuerpo según la reivindicación 1, que induce la liberación de IL-2 en células HuT78 transformadas con PD-1 cocultivadas con células HEK293 cotransformadas con OS8/PD-L1 u OS8/PD-L2, y/o que inhibe la secreción de IL-2 en células HuT78, transformadas con P3Z con células HEK293, transformadas con PD-L1 o PD-L2, en donde:
20 OS8 comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 89 y es un Ab quimérico, anclado a membrana, construido fusionando el fragmento variable de cadena sencilla (scFv) de un mAb anti CD3 humano OKT3 con el dominio C terminal (113-220) de CD8α de ratón; y
25 P3Z comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 90, y es un receptor de PD-1 quimérico, construido fusionando los dominios extracelular y transmembrana de PD-1 humana con el dominio citoplasmático de la cadena de CD3ζ humana.
6. Un F(ab) o F(ab)2 del anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
7. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso en el tratamiento de cáncer o de infección vírica.
30

Fig. 1

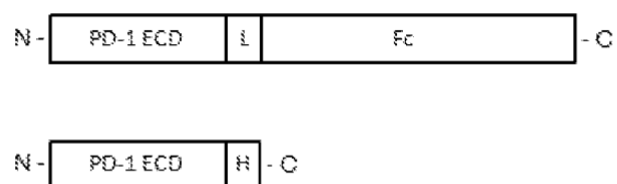


Fig. 2

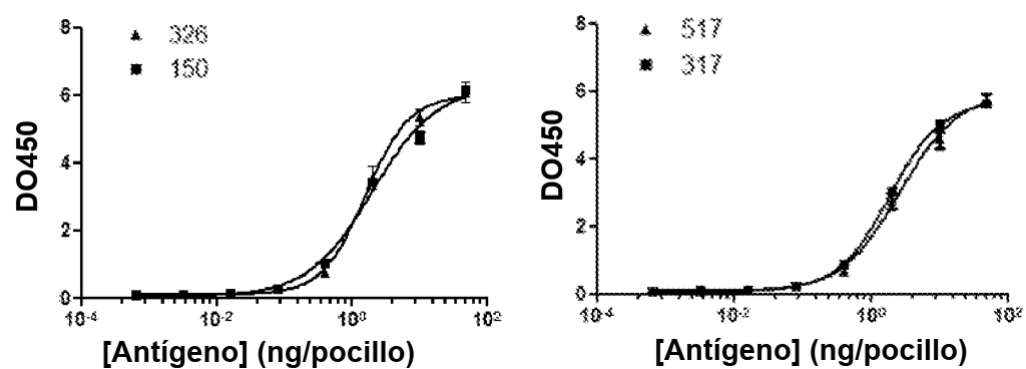


Fig. 3

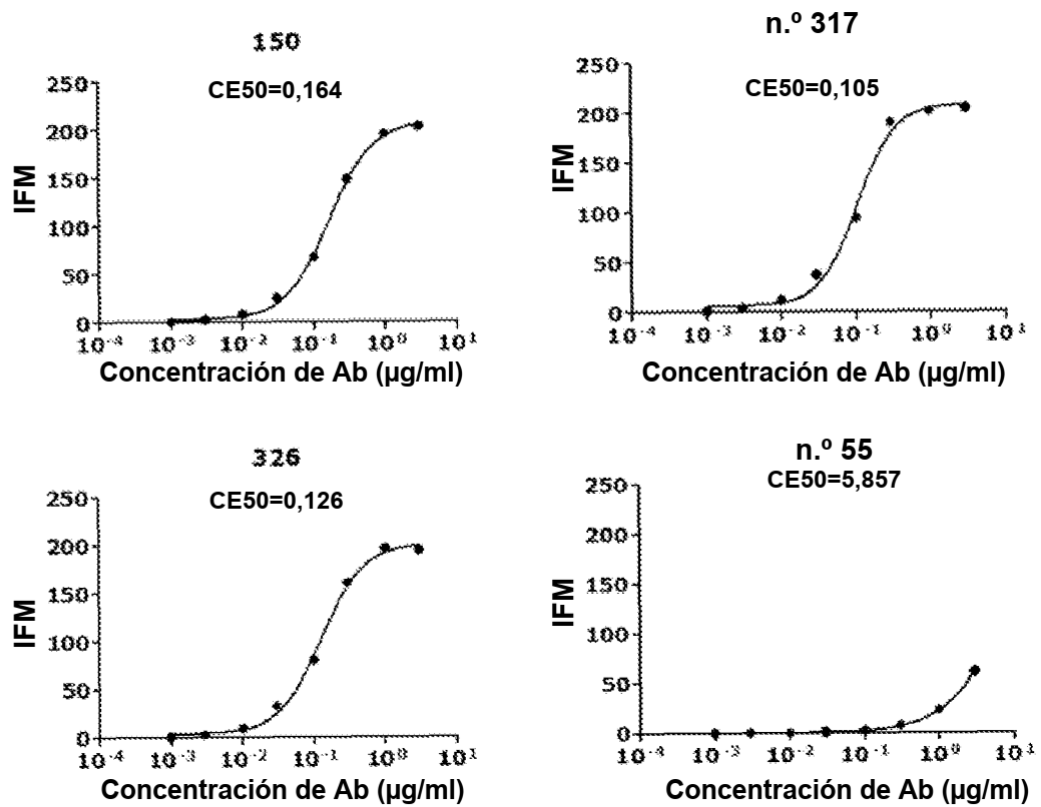


Fig. 4

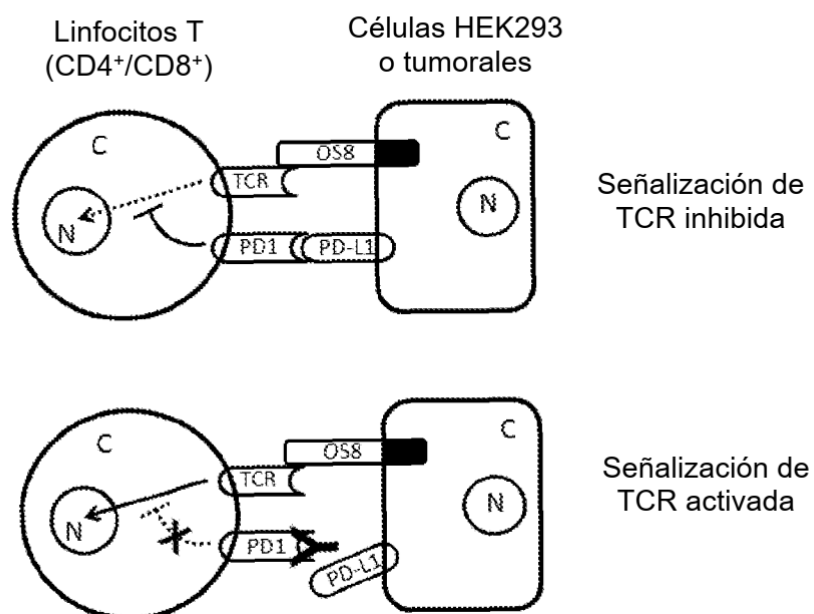


Fig. 5

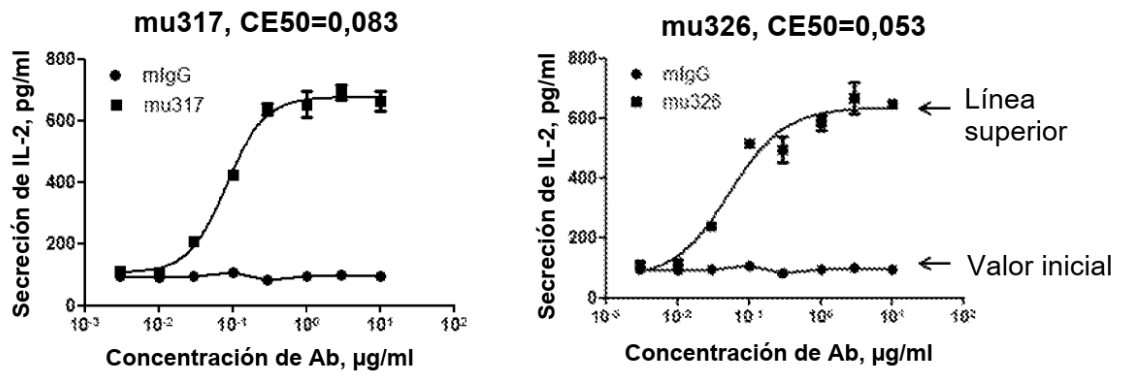
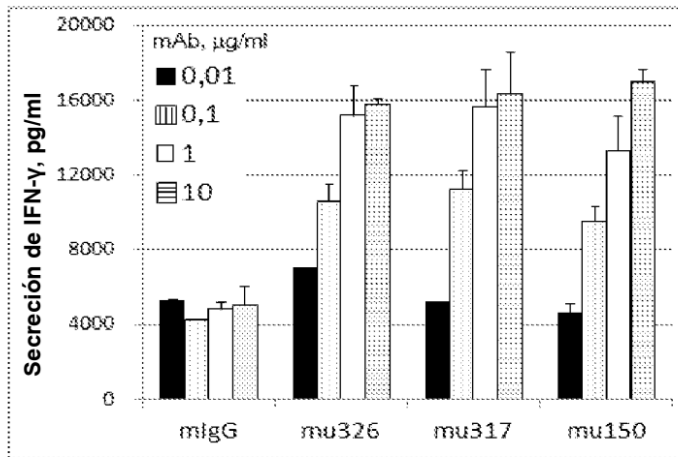


Fig. 6 (A)



(B)

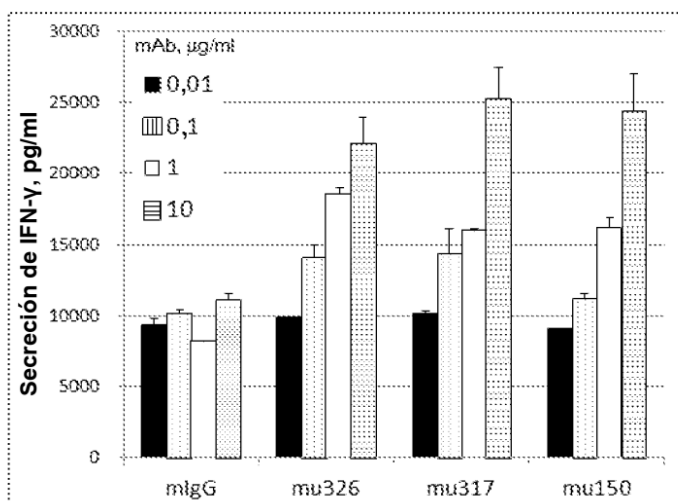


Fig. 7

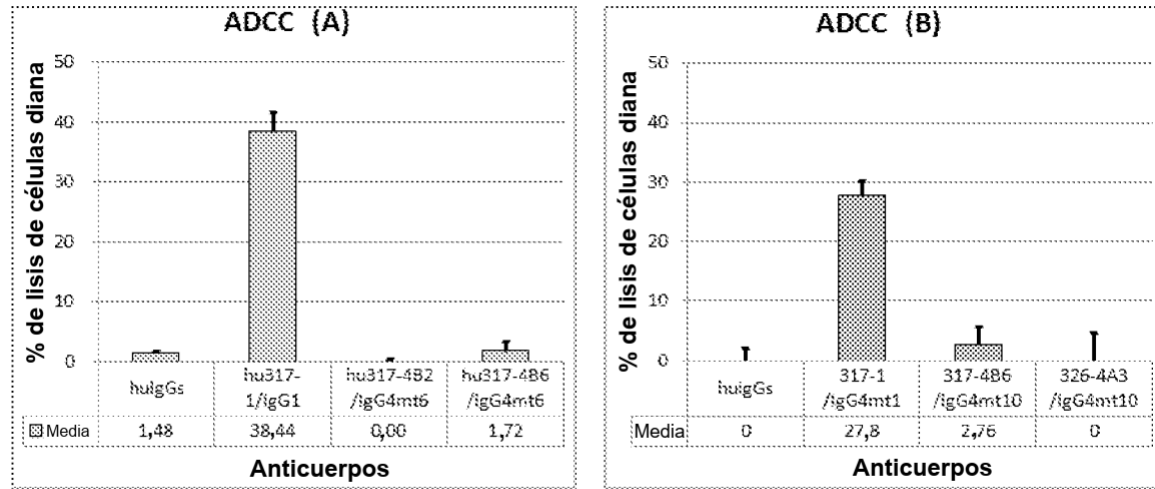


Fig. 8

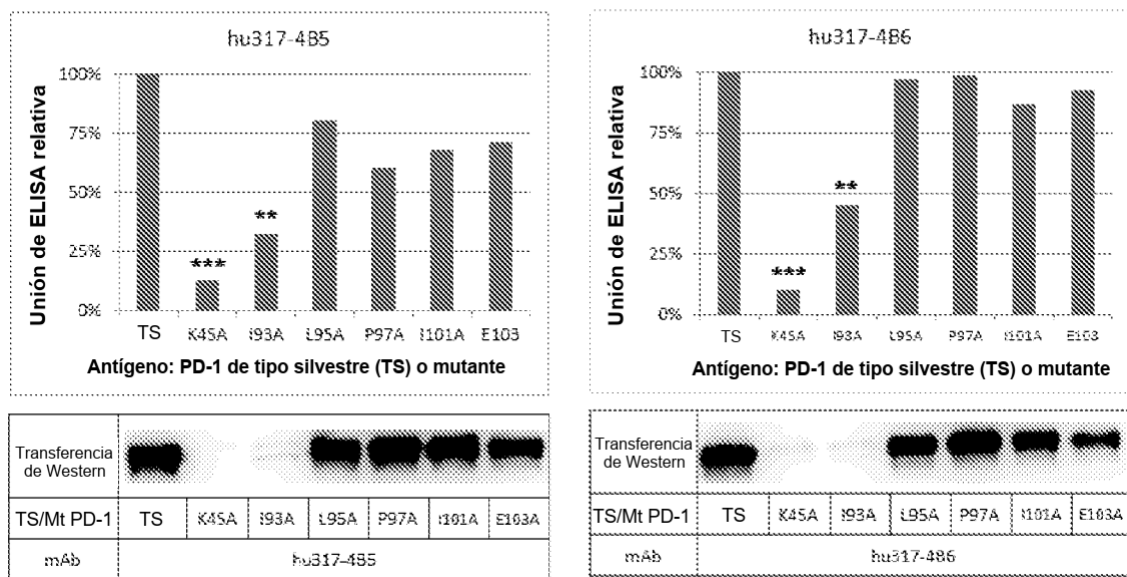


Fig 8 (continuación)

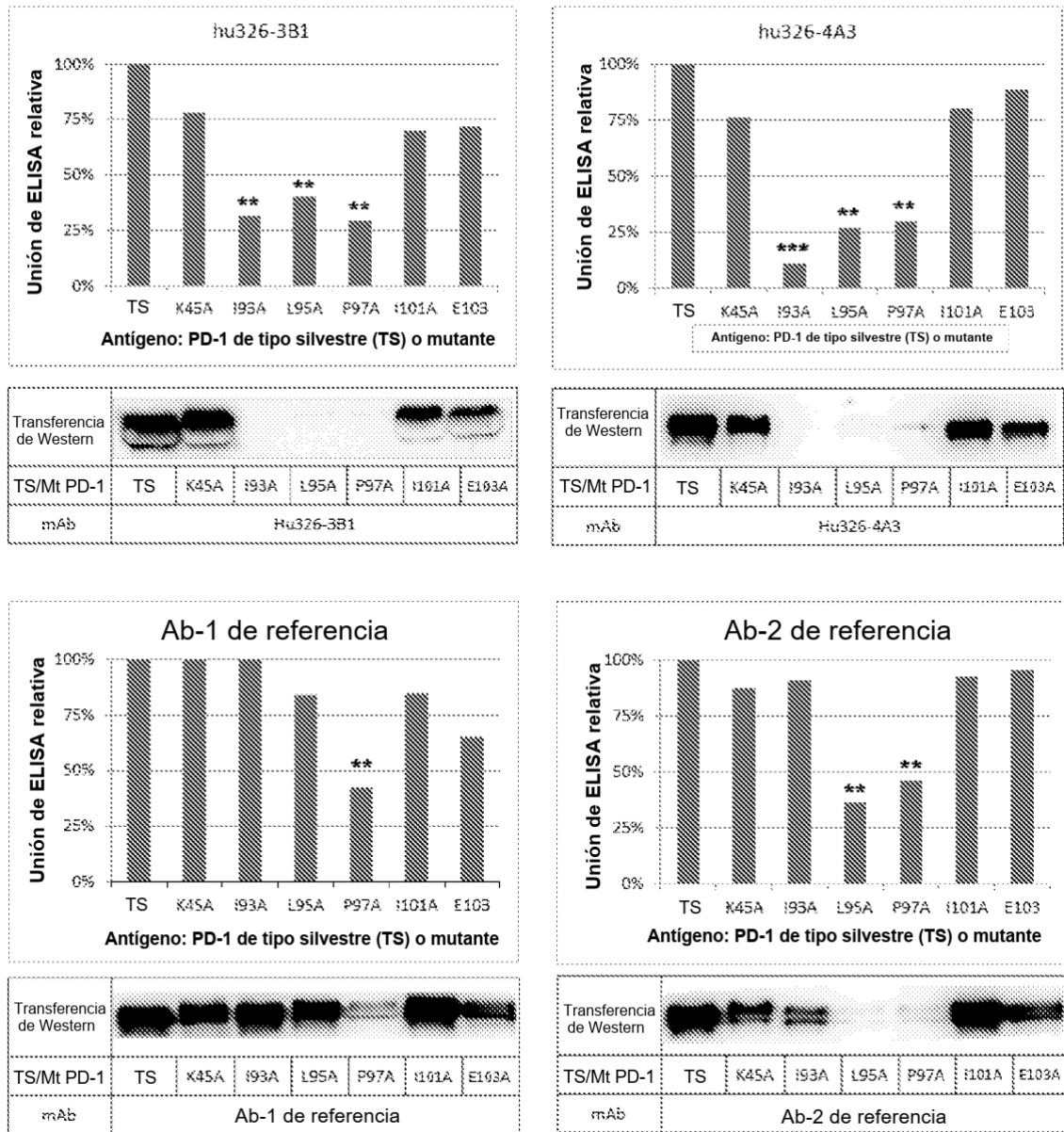


Fig. 9.

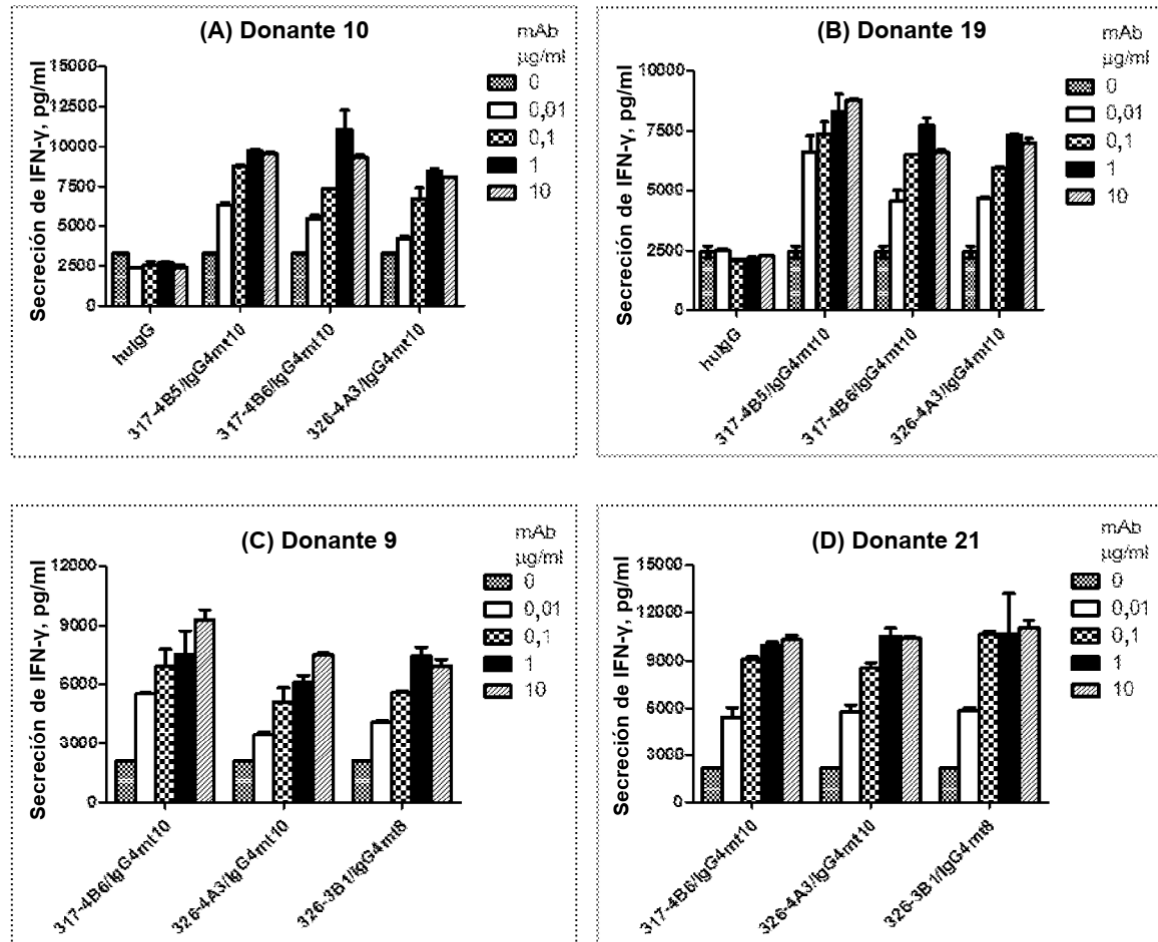


Fig. 10

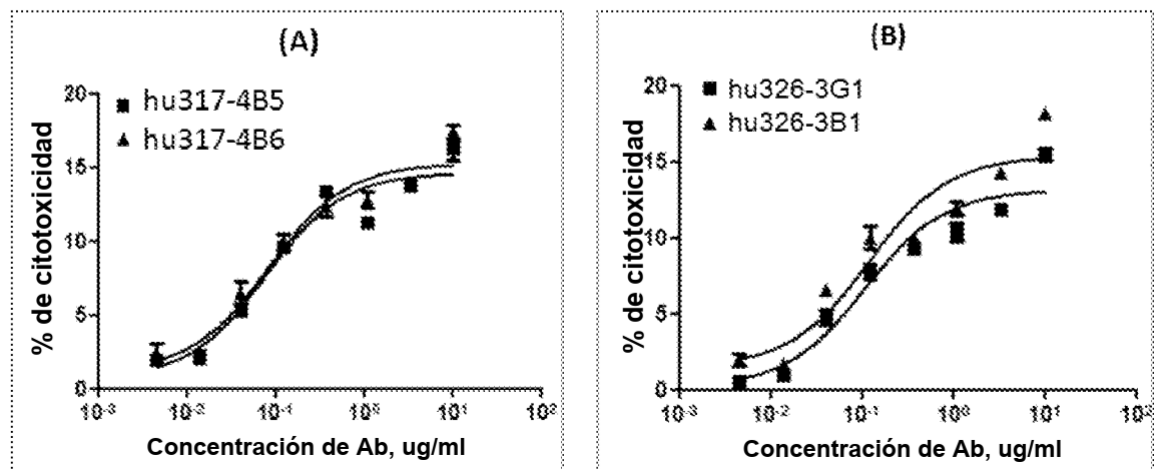


Fig. 11

