

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 801 873**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28	(2006.01)
C12N 15/13	(2006.01)
C12N 5/20	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
C07K 14/705	(2006.01)
A61P 35/02	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.03.2017 PCT/CN2017/075484**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.09.2017 WO17148424**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2017 E 17759275 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 3309177**

54 Título: **Anticuerpo de PDL-1, composición farmacéutica del mismo y sus usos**

30 Prioridad:

04.03.2016 CN 201610122117

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

14.01.2021

73 Titular/es:

**SICHUAN KELUN-BIOTECH
BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
No.666, Xinhua Avenue (section 2), Hai Xia
Industrial Park, Wenjiang District
Chengdu, Sichuan 611138, CN**

72 Inventor/es:

**LI, BAIYONG;
XUE, TONGTONG;
XIA, YU;
WANG, ZHONGMIN MAXWELL;
XIAO, LIANG;
WANG, LICHUN y
WANG, JINGYI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 801 873 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

Anticuerpo de PDL-1, composición farmacéutica del mismo y sus usos

5 **Campo técnico**

La presente divulgación pertenece al campo de la terapia tumoral y la inmunología molecular, y se refiere a un anticuerpo anti-PDL-1, una composición farmacéutica del mismo y su uso. En particular, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo monoclonal anti-PDL-1.

10

Antecedentes de la técnica

La ruta de señalización PD-1/PDL-1 es esencial en la regulación de la inmunotolerancia, la infección microbiana y la inmunoevasión tumoral. PD-1 (muerte celular programada 1) se expresa principalmente sobre los linfocitos T y otras células inmunitarias, y su ligando PDL-1 se expresa mucho en muchos tipos de tumores humanos. Se ha demostrado la presencia de la proteína PDL-1 mediante análisis inmunohistoquímico en cáncer de mama humano, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, carcinoma de células renales, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, glioma y melanoma. Por otra parte, el nivel de expresión de PDL-1 está estrechamente relacionado con el tratamiento clínico y el diagnóstico de un paciente.

15

El bloqueo de la ruta de señalización PD-1/PDL-1 puede activar los linfocitos T inhibidos, e inducir que los linfocitos T activados ataquen a las células cancerosas. El bloqueo de la ruta de señalización PD-1/PDL-1 puede promover la proliferación de los linfocitos T específicos a antígeno tumoral que juegan un papel en matar las células tumorales y, entonces, inhiben el crecimiento del tumor local (Julie R et al., 2012, *N. Engl. J. Med.* 366: 2.455-2.465); el anticuerpo monoclonal de PDL-1 puede regular por aumento la secreción de IFN- γ por linfocitos T CD8+ que infiltran el tumor, indicando que el bloqueo de la ruta de señalización PD-1/PDL-1 juega un papel en la respuesta inmunitaria de las células tumorales para inducir la respuesta inmunitaria (Blank C. et al., 2006, *Int. J. Cancer.* 119:317-327).

20

Además, PDL-1 también puede unirse a B7-1 *in vivo*. Los estudios han demostrado que el complejo PDL-1/B7-1 es una señal negativa para la activación del linfocito T, y la interacción puede conducir a la regulación por disminución de los marcadores de activación de superficie del linfocito T, e inhibir la proliferación de los linfocitos T.

25

La IL-2 (interleuquina-2) es un tipo de linfoquina secretada por los linfocitos T_h, y tiene un amplio rango de actividades inmunitarias: ① estimulación de la proliferación y la diferenciación de los linfocitos T; ② estimulación de la generación de linfocitos T citotóxicos; ③ estimulación de la proliferación y la diferenciación de células NK y aumento de la actividad de las células NK; ④ estimulación de la generación de células asesinas activadas por linfoquina (células LAK) que es un tipo de células inmunitarias que destruyen el tumor transformadas a partir de linfocitos bajo la estimulación de IL-2 durante 3-6 días *in vitro*. El IFN- γ (interferón-gamma) es producido por linfocitos T, y puede inhibir la proliferación de células tumorales, incrementar la presencia de antígeno por MHC, estimular la expresión del factor de necrosis tumoral, y prevenir la angiogénesis tumoral. Estudios recientes publicaron que IFN- γ puede suprimir la capacidad de las células tumorales para evadir los ataques del sistema inmunitario mediante la regulación de la expresión de Fas/FasL de células tumorales y el aumento de la sensibilidad de las células tumorales a apoptosis mediada por Fas, conduciendo a la inhibición de las células tumorales malignas.

30

En la actualidad, generalmente se cree que los anticuerpos que dirigen la ruta de PDL-1 conducirán al avance en el tratamiento de diversos tumores, incluyendo cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de células renales, cáncer de ovario, melanoma (Homet M. B., Parisi G., et al., "Anti-PDI Therapy in Melanoma". *Semin Oncol.* Junio de 2015;42(3):466-473), leucemia y anemia (Held SA, Heine A., et al., "Advances in immunotherapy of chronic myeloid leukemia CML". *Curr. Cancer Drug Targets.* Sep. de 2013;13(7):768-74).

35

Deng et al. (2016, *MABS VOL. 8, N.º 3, 593-603*) describieron la farmacocinéticas preclínica, la farmacodinámica, la distribución de tejido, y la proliferación tumoral del anticuerpo monoclonal anti-PD-L 1 MPDL3280A, un inhibidor del punto de control inmunitario.

40

El documento WO 2013/079174 describió anticuerpos anti-PD-L1 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, el ácido nucleico que codifica los mismos, composiciones terapéuticas de los mismos, y su uso para aumentar la función del linfocito T para regular por aumento las respuestas inmunitarias medidas por célula y para el tratamiento de trastornos disfuncionales de linfocito T, tales como inmunidad tumoral, para el tratamiento del cáncer.

45

El documento WO 2007/005874 describió anticuerpos monoclonales, particularmente los anticuerpos monoclonales humanos que se unen a PD-L1. También se proporcionaron las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la divulgación, los vectores de expresión, las células hospedadoras, los métodos para expresar los anticuerpos de la divulgación, los inmunoconjugados, las moléculas biespecíficas y las composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos de la invención.

50

El documento WO 2010/077634 describió anticuerpos anti-PD-L1, el ácido nucleico que codifica los mismos,

55

composiciones terapéuticas de los mismos, y su uso para aumentar la función del linfocito T para regular por aumento las respuestas inmunitarias medidas por célula y para el tratamiento de trastornos disfuncionales del linfocito T.

5 El documento WO 2016/000619 describió anticuerpos que se unen al ligando de muerte programada-1 (PD1, Pcd-1 o CD279) (PD-L1) e inhiben la señalización celular mediada por PD-L1 y las actividades en las células inmunitarias, uniéndose los anticuerpos a un conjunto de restos de aminoácidos requeridos para su unión a ligando, y los usos de estos anticuerpos para tratar o diagnosticar el cáncer, enfermedades infecciosas u otros trastornos patológicos modulados por funciones mediadas por PD-L1.

10 El documento WO 2015/112805 describió anticuerpos que se unen a la proteína ligando 1 de muerte programada (PDL1) ligando coinhibidor del linfocito T, y los métodos de uso.

15 El documento WO 2011/066389 describió anticuerpos monoclonales dirigidos frente a B7-H1 y los usos de estos anticuerpos en el diagnóstico y para el tratamiento de enfermedades asociadas con la actividad y/o la expresión de B7-H1.

20 El documento WO 2015/195163 describió una molécula anticuerpo de fragmento variable de cadena sencilla (scFv) completamente humana que es capaz de unirse al receptor de PD1 humano e inhibir sus interacciones con su ligando-PD-L1 humano cognado.

Actualmente, es necesario desarrollar un nuevo anticuerpo anti-PDL-1 con mejor afinidad de unión y eficacia de bloqueo (PDL-1 a PD-1) para activar los linfocitos T.

Contenidos de la invención

25 Mediante investigación en profundidad y trabajo creativo, los inventores usaron PDL-1 recombinante expresada por células mamíferas como un antígeno para inmunizar un ratón, y se recogieron las células del bazo del ratón y se fusionaron con células de mieloma para generar hibridomas. Cribando un gran número de hibridomas, se obtuvo la siguiente cepa de célula hibridoma: LT005, la cual se depositó en el "China Center for Type Culture Collection" (CCTCC) el 4 de Agosto de 2015, con un número de acceso de CCTCC N.º C2015133.

30 Los inventores se sorprendieron de encontrar que la cepa de célula hibridoma LT005 podía secretar anticuerpo monoclonal (denominado 5C10) que puede unirse específicamente a PDL-1 y bloquear eficazmente la unión de PDL-1 a PD-1. Además, los inventores también han descubierto otro dos anticuerpos monoclonales denominados 5F10 y 9F6 que bloquean la unión de PDL-1 a PD-1.

Además, los inventores creativamente produjeron anticuerpos humanizados frente a PDL-1, denominados 5C10H1L1, 5C10H1L2, 5C10H2L1 y 5C10H2L2 respectivamente.

40 Aún además, los inventores mutaron creativamente la región constante de 5C10H2L2 y generaron el anticuerpo 5C10H2L2-IgG1mt, para el cual se bajó eficazmente la ADCC (citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo) y/o la CDC (citotoxicidad dependiente de complemento).

45 Aún además, los inventores también encontraron que los anticuerpos de esta divulgación, especialmente 5C10, 5C10H1L1, 5C10H1L2, 5C10H2L1, 5C10H2L2, 5F10, 9F6 y 5C10H2L2-IgG1mt, pueden unirse eficazmente y activar los linfocitos T humanos para inducir la secreción de IFN-γ y IL-2, lo cual indica el potencial para la prevención y el tratamiento de cáncer de pulmón, melanoma, tumores renales, cáncer de ovario, leucemia y anemia.

Por tanto, se proporciona la siguiente divulgación:

50 En un aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que:

dicho anticuerpo monoclonal tiene una región variable de cadena pesada que comprende CDR como se exponen en las SEQ ID NO: 15-17, y/o tiene una región variable de cadena ligera que comprende CDR como se exponen en las SEQ ID NO: 18-20;

o

60 dicho anticuerpo monoclonal tiene una región variable de cadena pesada que comprende CDR como se exponen en las SEQ ID NO: 29-31, y/o tiene una región variable de cadena ligera que comprende CDR como se exponen en las SEQ ID NO: 32-34;

o

65 dicho anticuerpo monoclonal tiene una región variable de cadena pesada que comprende CDR como se exponen en las SEQ ID NO: 35-37, y/o tiene una región variable de cadena ligera que comprende CDR como se exponen

ES 2 801 873 T3

en las SEQ ID NO: 38--40.

Las secuencias de aminoácidos de las CDR de 5C10, 5C10H1L1, 5C10H1L2, 5C10H2L1 o 5C10H2L2 son las mismas, de la siguiente manera:

- 5 HCDR1: GFSLSNYD (SEQ ID NO: 15)
HCDR2: IWTGGAT (SEQ ID NO: 16)
10 HCDR3: VRDSNYRYDEPFTY (SEQ ID NO: 17)
LCDR1: QSIGTN (SEQ ID NO: 18)
LCDR2: YAS (SEQ ID NO: 19)
15 LCDR3: QQSNSWPYD (SEQ ID NO: 20).

Las secuencias de aminoácidos de las CDR de 5F10 son de la siguiente manera:

- 20 HCDR1: GFDIKDTY (SEQ ID NO: 29)
HCDR2: IDPADGNT (SEQ ID NO: 30)
HCDR3: ARGLGAWFAS (SEQ ID NO: 31)
25 LCDR1: QDITNS (SEQ ID NO: 32)
LCDR2: YTS (SEQ ID NO: 33)
30 LCDR3: QQGHTLPPT (SEQ ID NO: 34).

Las secuencias de aminoácidos de las CDR de 9F6 son de la siguiente manera:

- 35 HCDR1: GFNIKDTY (SEQ ID NO: 35)
HCDR2: IDPANGNT (SEQ ID NO: 36)
HCDR3: SRGPPGGIGEYIYAMDY (SEQ ID NO: 37)
40 LCDR1: SSVSSSY (SEQ ID NO: 38)
LCDR2: STS (SEQ ID NO: 39)
45 LCDR3: HQYHRSPPT (SEQ ID NO: 40)

Las anteriores CDR se pueden obtener a través de estrategias técnicas familiares a los expertos en la técnica. Por ejemplo, analizando la secuencia de aminoácidos de la región variable para la cadena pesada y la cadena ligera usando la definición de IMG2 por la base de datos VBASE2.

- 50 En algunas realizaciones, dicho anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que:

la región variable de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 10, y/o la región variable de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 12;

- 55 o

la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 21, y/o la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 23;

- 60 o

la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 25, y/o la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 27.

- 65 En algunas realizaciones, dicho anticuerpo monoclonal se selecciona de los siguientes puntos (1) a (7):

(1) La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada se muestra en SEQ ID NO: 2, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera se muestra en SEQ ID NO: 4 (5C10);

5 (2) La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada se muestra en SEQ ID NO: 6, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera se muestra en SEQ ID NO: 8 (5C10H1L1);

10 (3) La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada se muestra en SEQ ID NO: 10, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera se muestra en SEQ ID NO: 12 (5C10H2L2 o 5C10H2L2-IgG1mt);

(4) La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada se muestra en SEQ ID NO: 6, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera se muestra en SEQ ID NO: 12 (5C10H1L2);

15 (5) La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada se muestra en SEQ ID NO: 10, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera se muestra en SEQ ID NO: 8 (5C10H2L1);

20 (6) La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada se muestra en SEQ ID NO: 21, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera se muestra en SEQ ID NO: 23 (5F10);

(7) La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada se muestra en SEQ ID NO: 25, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera se muestra en SEQ ID NO: 27 (9F6).

25 En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se selecciona de Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, fragmento de la región determinante de la complementariedad, anticuerpo de cadena sencilla (por ejemplo, scFv), anticuerpo humanizado, anticuerpo quimérico o diacuerpo.

30 En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a PDL-1 con CE₅₀ menor que 100 nM, por ejemplo, menor que 10 nM, 1 nM, 0,9 nM, 0,8 nM, 0,7 nM, 0,6 nM, 0,5 nM, 0,4 nM, 0,3 nM, 0,2 nM, 0,1 nM o menos, preferentemente, la CE₅₀ se determina por método de ELISA indirecto.

35 En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que, el anticuerpo monoclonal comprende una región no CDR y la región no CDR se deriva de una especie distinta de la murina, por ejemplo, deriva de un anticuerpo humano.

Preferentemente, la región constante del anticuerpo monoclonal se selecciona de la región constante de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana;

40 Preferentemente, la región constante del anticuerpo monoclonal es una región constante de IgG1 humana mutada; más preferentemente, la región constante de IgG1 humana mutada tiene 1, 2 o 3 mutaciones en la posición 234, 235 y 237 de acuerdo con el sistema de numeración EU, y las mutaciones se seleccionan de: L234A, L235A y G237A.

45 En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo monoclonal es producido por la cepa de célula hibridoma LT005, y la cepa de célula hibridoma LT005 está depositada en el "China Center for Type Culture Collection" (CCTCC), y el número de acceso es CCTCC N.º: C2015133.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada A, la cual comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo, en la que:

50 dicho anticuerpo tiene una región variable de cadena pesada que comprende CDR como se exponen en las SEQ ID NO: 15-17; preferentemente, la cadena pesada de dicho anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 10; más preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 9;

55 En otra realización de la divulgación, dicho anticuerpo tiene una región variable de cadena pesada que comprende CDR como se exponen en las SEQ ID NO: 29-31, preferentemente, la cadena pesada de dicho anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, más preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 22;

60 En otra realización de la divulgación, dicho anticuerpo tiene una región variable de cadena pesada que comprende CDR como se exponen en las SEQ ID NO: 35-37, preferentemente, la cadena pesada de dicho anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, más preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 26.

65 Otro aspecto adicional de la presente divulgación se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada B, la cual

comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo, en la que:

5 dicho anticuerpo tiene una región variable de cadena ligera que comprende CDR como se exponen en las SEQ ID NO: 18-20,

preferentemente, la cadena ligera de dicho anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 12;

10 más preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 11;

En otra realización de la divulgación, dicho anticuerpo tiene una región variable de cadena ligera que comprende CDR como se exponen en las SEQ ID NO: 32-34,

15 preferentemente, la cadena ligera de dicho anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23, más preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 24;

En otra realización de la divulgación, dicho anticuerpo tiene una región variable de cadena ligera que comprende CDR como se exponen en las SEQ ID NO: 38-40,

20 preferentemente, la cadena ligera de dicho anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27, más preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 28.

25 Otro aspecto adicional de la presente divulgación se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada C, la cual comprende la anterior molécula de ácido nucleico A y la molécula de ácido nucleico B; opcionalmente, la molécula de ácido nucleico C comprende además una secuencia de enlazador para conectar la molécula de ácido nucleico A y la molécula de ácido nucleico B.

Otro aspecto adicional de la presente divulgación se refiere a un vector, el cual comprende la molécula de ácido nucleico aislada A, la molécula de ácido nucleico aislada B o la molécula de ácido nucleico aislada C.

30 Otro aspecto adicional de la presente divulgación se refiere a una célula hospedadora, la cual comprende la molécula de ácido nucleico aislada A, la molécula de ácido nucleico aislada B o la molécula de ácido nucleico aislada C, o el vector.

35 En cuanto a la expresión "molécula de ácido nucleico aislada A", "molécula de ácido nucleico aislada B" o "molécula de ácido nucleico aislada C", la letra A, B o C se usaron solamente con el fin de aclarar, o para distinguir, y la letra en sí misma no tiene significado especial.

40 Otro además de la presente divulgación se refiere al método para preparar el anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo anteriormente descrito, el cual comprende las siguientes etapas: cultivar la célula hospedadora de la divulgación bajo condiciones adecuadas, y recuperar el anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo de los cultivos celulares.

45 Otro aspecto adicional de la presente divulgación se refiere a una cepa de célula hibridoma LT005, la cual está depositada en el "China Center for Type Culture Collection" (CCTCC), y el número de acceso es CCTCC N.º: C2015133.

50 Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo que es capaz de unión competitiva al epítipo antígeno del anticuerpo o un fragmento secretado por la cepa de célula hibridoma LT005. Preferentemente, el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una cualquiera de las siguientes actividades:

un fármaco que bloquea la unión de PDL-1 a PD-1 o B7-1,

55 un fármaco que regula (por ejemplo, regula por disminución) la actividad de PDL-1 o el nivel de PDL-1,

un fármaco que elimina la inmunosupresión por PD-1 o PDL-1 o

un fármaco que aumenta la expresión de IFN- γ y/o IL-2 en linfocitos T.

60 Otro aspecto adicional de la presente divulgación se refiere a un conjugado, que comprende un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno, y una parte de acoplamiento, en el que el anticuerpo monoclonal es uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en la divulgación, y la parte de acoplamiento es un marcador detectable, preferentemente, la parte de acoplamiento es un isótopo radioactivo, una sustancia fluorescente, una sustancia luminiscente, una sustancia coloreada o una enzima.

65

Otro aspecto adicional de la presente divulgación se refiere a un kit, que comprende un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o el conjugado anteriormente descrito;

Preferentemente, el kit además comprende un anticuerpo secundario que reconoce específicamente el anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo; opcionalmente, el anticuerpo secundario está marcado con un marcador detectable, tal como un isótopo radiactivo, una sustancia fluorescente, una sustancia luminiscente, una sustancia coloreada o una enzima.

Otro aspecto adicional de la presente divulgación se refiere a un uso de dichos anticuerpos monoclonales o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un conjugado del mismo en la fabricación de un kit, y dicho kit se usa para detectar la existencia o el nivel de PDL-1 en una muestra.

Otro aspecto adicional de la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica, que comprende un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo o el conjugado de la presente divulgación, opcionalmente, además comprende un portador, y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un uso del anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo o el conjugado de la presente divulgación en la producción de un medicamento para prevenir y/o tratar y/o tratar con adyuvante y/o diagnosticar un tumor o anemia; preferentemente, dicho tumor se selecciona de cáncer de mama, cáncer de pulmón, tal como el cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de hígado, cáncer gástrico, cáncer colorrectal tal como el cáncer de colon o el cáncer rectal, cáncer de esófago, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, glioma, melanoma y leucemia.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un uso del anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo o el conjugado de la presente divulgación en la producción de un fármaco para bloquear la unión de PDL-1 a PD-1 o a B7-1, un fármaco para regular (por ejemplo, regular por disminución) la actividad de PDL-1 o el nivel de PDL-1, un fármaco para eliminar la inmunosupresión por PD-1 o por PDL-1 o un fármaco para aumentar la expresión de IFN- γ y/o IL-2 por un linfocito T.

Otro aspecto adicional de la presente divulgación se refiere a un método *in vivo* o *in vitro*, el cual comprende una etapa de administración a una célula con una cantidad eficaz del anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo o los conjugados de la divulgación, y dicho método es:

un método para bloquear la unión de PDL-1 a PD-1 o a B7-1,

un método para regular (por ejemplo, regular por disminución) la actividad de PDL-1 o el nivel de PDL-1,

un método para eliminar la inmunosupresión por PD-1 o por PDL-1, o

un método para aumentar la expresión de IFN- γ y/o IL-2 en un linfocito T.

En una realización de la presente divulgación, dicho método no es con fin terapéutico.

Otro aspecto adicional de la presente divulgación se refiere a un método para el tratamiento y/o la profilaxis de un tumor o anemia, que comprende una etapa de administración a un sujeto con una cantidad eficaz del anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo o el conjugado de la divulgación; preferentemente, el tumor se selecciona de cáncer de mama, cáncer de pulmón, tal como el cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de hígado, cáncer gástrico, cáncer colorrectal tal como el cáncer de colon o el cáncer rectal, cáncer de esófago, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, glioma, melanoma y leucemia.

En la presente divulgación, a menos que se indique lo contrario, los términos científicos y técnicos usados en la presente divulgación tendrán el significado comúnmente entendido por los expertos en la técnica. Además, los procedimientos de laboratorio relacionados con el cultivo celular, la genética molecular, la química del ácido nucleico, y la inmunología usados en esta divulgación son los procedimientos generales usados en los campos relevantes. Mientras tanto, para mejor entendimiento de la divulgación, a continuación se proporcionan las definiciones e interpretaciones de los términos relevantes.

Como se usa en la presente divulgación, cuando se refiere a la secuencia de aminoácidos de la proteína PDL-1 (ligando 1 de muerte programada, NCBI GenBank ID: NP_054862.1), incluyendo la proteína PDL-1 de longitud completa, o el dominio extracelular de PDL-1 (PDL-1 ECD) o fragmento que contiene PDL-1ECD; también se incluye la proteína de fusión de PDL-1ECD, por ejemplo, fragmento fusionado con Fc de IgG de ratones o humano (mFc o hFc). Por otra parte, como lo entiende un experto en la técnica, la proteína PDL-1 también incluiría aquellas dentro de las cuales se introducen de manera natural o artificial mutaciones de la secuencia de aminoácidos (incluyendo, pero sin limitación, reemplazo, delección y/o adición) sin afectar las funciones biológicas. Por lo tanto, en la presente divulgación, la expresión "proteína PDL-1" debería incluir todas dichas secuencias, incluyendo el listado de secuencia

anterior y sus variantes naturales o artificiales. Además, cuando se refiere al fragmento de secuencia de la proteína PDL-1, no significa solamente el anterior fragmento de secuencia, sino también el correspondiente fragmento de secuencia de las variantes naturales o artificiales.

- 5 El término CE₅₀ se usa en el presente documento para referirse a la concentración para el 50 % del efecto máximo, es decir, la concentración que puede causar el 50 % del efecto máximo.

El término "anticuerpo" se usa en el presente documento para referirse a una molécula de inmunoglobulina que está normalmente compuesta de dos pares de cadenas polipeptídicas (cada par con una cadena "Ligera" (L) y una cadena "Pesada" (H)). Las cadenas ligeras del anticuerpo se pueden clasificar como cadena κ y λ . Las cadenas pesadas pueden clasificarse como: μ , δ , γ , α o ϵ , y los correspondientes anticuerpos se definen como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. En las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes se unen por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, y la cadena pesada también comprende regiones "D" de aproximadamente 3 o más aminoácidos. Cada cadena pesada consiste en una región variable de cadena pesada (V_H) y una región constante de cadena pesada (C_H). La región constante de cadena pesada consiste en 3 dominios (C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}). Cada cadena ligera consiste en una región variable de cadena ligera (V_L) y una región constante de cadena ligera (C_L). La región constante de cadena ligera consiste en un dominio (C_L). La región constante del anticuerpo puede mediar la unión de inmunoglobulinas al tejido o factores del hospedador, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. Las regiones V_H y V_L además se pueden subdividir en regiones altamente variables (denominadas Región determinante de la complementariedad, CDR) y regiones conservativas denominadas marco (FR) que se distribuyen entre las CDR. Cada V_H y V_L consiste en 3 CDR y 4 FR dispuestos en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4, desde el extremo amino al extremo carboxilo. Las regiones variables (V_H y V_L) de la cadena pesada y la cadena ligera forman el sitio de unión a antígeno. La asignación de los aminoácidos a cada región o dominio siguió la definición de Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), o Chothia & Lesk (*J. Mol. Biol.* 196:901-917(1987); Chothia et al. *Nature* 342:878-883 (1989)). El término "anticuerpo" no está restringido por ningún método de generación de anticuerpo específico. Por ejemplo, incluye, en particular, anticuerpos recombinantes, anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales. Los anticuerpos pueden ser diferentes isotipos o subisotipos, por ejemplo, anticuerpos IgG (por ejemplo, subtipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE o IgM.

La expresión "fragmento de unión a antígeno" del anticuerpo se usa en el presente documento para referirse al polipéptido que contiene el fragmento de anticuerpo de longitud completa, conserva la capacidad para unirse específicamente al mismo antígeno que el anticuerpo de longitud completa, y/o compite con el anticuerpo de longitud completa por la unión específica a antígeno, que también se conoce como la "parte de unión a antígeno". Visto a menudo en el texto de "Fundamental Immunology", Cap. 7 (Paul, W., ed., segunda edición, Raven Press, N.Y. (1989)), se introduce en la divulgación como referencia, para todos los fines. Los fragmentos de unión a antígeno se pueden producir mediante la tecnología de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. En algunos casos, los fragmentos de unión a antígeno incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, y fragmentos de la región determinante de la complementariedad (CDR), fragmento de anticuerpo de cadena sencilla (por ejemplo, scFv), anticuerpos quiméricos, diacuerpos y tales polipéptidos, que comprenden al menos una porción del polipéptido que es suficiente para conferir la capacidad de unión específica a antígeno del anticuerpo.

Como se usa en la presente divulgación, la expresión "fragmento Fd" significa un fragmento de anticuerpo que consiste en los dominios V_H y C_{H1}; la expresión "fragmento Fv" significa un fragmento de anticuerpo que consiste en los dominios V_L y V_H de cadena sencilla del anticuerpo; la expresión "fragmento dAb" significa un fragmento de anticuerpo que consiste en el dominio V_H (Ward et al., *Nature* 341:544-546 (1989)); la expresión "fragmento Fab" significa un fragmento de anticuerpo que consiste en los dominios V_L, V_H, C_L y C_{H1}; la expresión "fragmento F(ab')₂" significa un fragmento de anticuerpo que contiene dos fragmento Fab que están conectados por puentes de enlace disulfuro en la región bisagra.

En algunos casos, el fragmento de unión a antígeno del anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla (por ejemplo, scFv), del cual los dominios V_L y V_H forman moléculas monovalentes mediante un enlazador para formar cadena polipeptídica sencilla (como referencia, por ejemplo, Bird et al., *Science* 242:423-426 (1988) y Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5.879-5.883 (1988)). Tales moléculas scFv pueden tener una estructura general: NH₂-V_L-Enlazador-V_H-COOH o NH₂-V_H-Enlazador-V_L-COOH. La reciente tecnología apropiada de enlazador se compone de una secuencia de aminoácidos GGGGS repetitiva o sus variantes. Por ejemplo, (GGGGS)₄, pero también se puede usar su variante (Holliger et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6.444-6.448). Otros enlazadores que se pueden usar en esta divulgación están descritos por Alfthan et al. (1995), *Protein Eng.* 8:725-731, Choi et al. (2001) *Eur. J. Immunol.* 31: 94-106, Hu et al. (1996), *Cancer Res.* 56: 3.055-3.061, Kipriyanov et al. (1999), *J. Mol. Biol.* 293:41-56 y Roovers et al. (2001), *Cancer Immunol.*

En algunos casos, el fragmento de unión a antígeno del anticuerpo es diacuerpo, es decir, un anticuerpo bivalente, del cual V_H y V_L se expresan en una cadena polipeptídica sencilla, sin embargo, se usó un enlazador muy corto para prevenir el emparejamiento de dos dominios de la misma cadena, por tanto, el dominio se fuerza en emparejarse con el dominio complementario de la otra cadena, y se forman dos sitios de unión a antígeno (como referencia, por ejemplo,

Holliger P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6.444-6.448 (1993), y Poljak R. J. et al., *Structure* 2:1.121-1.123 (1994)).

En otros casos, el fragmento de unión a antígeno del anticuerpo es "anticuerpo biespecífico", definido por el primer anticuerpo (fragmento) y el segundo anticuerpo (fragmento) o el mimético de anticuerpo acoplado por el brazo de acoplamiento, los métodos de acoplamiento incluyen, pero sin limitación, reacción química, fusión de gen y reacción enzimática. Los fragmentos de unión a antígeno del anticuerpo pueden ser "anticuerpos multiespecíficos" tales como: Anticuerpo trispecífico y tetraespecífico, el primero puede unirse específicamente a 3 antígenos diferentes, el último puede unirse específicamente a 4 antígenos diferentes. Por ejemplo, las proteínas de repetición de anquirina diseñadas (DARPin), se unieron o asociaron a anticuerpos IgG, fragmentos de anticuerpo scFv-Fc, tal como en el documento CN104341529A; anti-IL-17a fynomer con anticuerpo anti-IL-6R, tal como en el documento WO2015141862A1.

En otros casos, el fragmento de unión a antígeno del anticuerpo es "conjugado de anticuerpo biespecífico", definido por el primer anticuerpo (fragmento) y el segundo fragmento de función biológica (no anticuerpo ni su mimético) acoplados por el brazo de acoplamiento, los métodos de acoplamiento incluyen, pero sin limitación, reacción química, fusión de gen y reacción enzimática, los segundos fragmentos de función biológica incluyen péptidos con actividad de unión, proteínas, polietilenglicol (PEG), radionúclidos, ácidos nucleicos, toxinas de molécula pequeña, receptores o ligandos, etc., el conjugado conservaba las actividades de cada fragmento, por tanto, doble funciones/biespecífico.

El fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, el fragmento de anticuerpo anteriormente descrito) se puede obtener de un anticuerpo dado (por ejemplo, 5C10, 5C10H1L1, 5C10H1L2, 5C10H2L1 y 5C10H2L2 en esta divulgación mediante tecnologías convencionales conocidas por los expertos en la técnica (por ejemplo, métodos de ADN recombinante o escisión enzimática o química) y el mismo método de cribado específico se puede aplicar al fragmento de unión a antígeno como anticuerpo intacto.

En esta divulgación, a menos que se mencione específicamente, el término "anticuerpo" no incluye solamente el anticuerpo intacto, sino también el fragmento de unión a antígeno del anticuerpo.

Las expresiones "mAb" y "anticuerpo monoclonal" se usan en el presente documento para referirse a un fragmento de un anticuerpo o moléculas de anticuerpo en un grupo altamente homólogo, es un grupo de moléculas de anticuerpo idénticas, a menos que ocurran mutaciones naturales. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos frente a epítipo único sobre el antígeno. Los anticuerpos policlonales son diferentes de los anticuerpos monoclonales, los anticuerpos policlonales normalmente contienen al menos 2 o más anticuerpos diferentes que reconocen diferentes epítopos sobre el mismo antígeno. Los anticuerpos monoclonales normalmente se pueden obtener mediante tecnología de hibridoma, lo cual fue publicado por primera vez por Kohler et al (*Nature*, 256:495, 1975), pero también se puede obtener mediante tecnología de ADN recombinante (véase también el documento U.S.P 4.816.567).

La expresión "anticuerpo quimérico" se usa en el presente documento para referirse al anticuerpo, del cual parte de la cadena ligera y/o la cadena pesada de un anticuerpo (el cual puede ser derivado de una especie específica o pertenecer a una clase o subclase de anticuerpo específica), y la otra parte de la cadena ligera y/o la cadena pesada de otro anticuerpo (el cual se puede derivar de la misma especie o diferente o pertenecer a las mismas clases o subclases de anticuerpo o diferentes), No obstante, aún conserva la actividad de unión al antígeno diana (documento U.S.P 4.816.567 de Cabilly et al.; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81:6.851 6.855 (1984)).

La expresión "anticuerpo humanizado" se usa en el presente documento para referirse a una inmunoglobulina humana (anticuerpo aceptor) en la cual todas o parte de las CDR están reemplazadas por regiones CDR de un anticuerpo no humano (anticuerpo donante), el anticuerpo donante puede ser un anticuerpo no humano (por ejemplo, ratón, rata o conejo) con especificidad, afinidad o reactividad esperada. Además, los restos de aminoácidos de la región marco (FR) del anticuerpo aceptor pueden estar reemplazados por aminoácidos de anticuerpos no humanos, o aminoácidos de otros anticuerpos para mejorar más la actuación del anticuerpo. Para más detalles sobre los anticuerpos humanizados, véase los ejemplos, Jones et al., *Nature*, 321:522 525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332:323 329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593 596 (1992); y Clark, *Immunol. Today* 21: 397 402 (2000).

El método de humanización se basa en la combinación de uno o más de los métodos comúnmente usados para la humanización. Por ejemplo, usando los métodos descritos más adelante.

La humanización se podía realizar por injerto de CDR. En este método, primero se determinaron las regiones de CDR de anticuerpo de ratón s y, a continuación, las 6 CDR de la cadena pesada y la cadena ligera de ratón se injertaron sobre el molde de fuente humana con alta homología a la región FR de ratón. El molde de fuente humana se puede seleccionar de la secuencia de la línea germinal original (línea germinal), tal como la secuencia de la línea germinal derivada de la base de datos IMGT, y también se puede seleccionar de las secuencias de anticuerpo maduro, tales como la secuencia de anticuerpo derivada del Gene bank. La retromutación se puede introducir en el anticuerpo injertado con CDR. Algunos aminoácidos del molde humano se pueden someter retromutación a aminoácidos del patrón de ratón, para mejorar la afinidad del anticuerpo.

La humanización también se podía realizar por injerto de SDR. En este método, las regiones SDR del anticuerpo de

ratón necesitan ser determinadas en primer lugar. Las regiones SDR se pueden determinar mediante métodos tales como barrido de alanina. A continuación, las regiones SDR de ratón se injertaron sobre el molde humano con alta homología al molde de ratón. El molde de fuente humana se puede seleccionar de la secuencia de la línea germinal original (línea germinal), tal como la secuencia de la línea germinal derivada de la base de datos IMGT, y también se puede seleccionar de las secuencias de anticuerpo maduro, tales como la secuencia de anticuerpo derivada del Gene bank. La retromutación se puede introducir en el anticuerpo injertado con SDR. Algunos aminoácidos del molde humano se pueden someter retromutación a aminoácidos del patrón de ratón, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Tamura, M., D. E. Milenic, M. Iwahashi, E. Padlan, J. Schlom & S. V. Kashmiri: "Structural correlates of an anti-carcinoma antibody: identification of specificity determining residues (SDRs) and development of aminimally immunogenic antibody variant by retention of SDRs only". *J. Immunol.*, 164, 1.432-41 (2000).

La humanización también se podía realizar por remodelación de superficie (*resurfacing*). En este método, el modelo de anticuerpo de ratón se podía obtener mediante modelado por homología por ordenador o análisis de la estructura cristalina de la proteína. Los aminoácidos sobre la superficie del anticuerpo se pueden determinar según el modelo, y estos aminoácidos se mutaron a los aminoácidos correspondientes del anticuerpo humano. Se podían seleccionar los aminoácidos de los anticuerpos humanos con alta frecuencia al mismo sitio. Padlan, E. A.: "A Possible Procedure For Reducing The Immunogenicity Of Antibody Variable Domains While Preserving Their Ligand-Binding Properties". *Mol. Immunol.*, 28, 489-98 (1991).

La humanización también se podía realizar por superhumanización. En este método, primero se determinaron las regiones CDR del anticuerpo de ratón, la secuencia humana con alta homología a las 6 CDR se eligió como el molde sobre el cual se injertaron las 6 CDR de ratón. El molde de fuente humana se puede seleccionar de la secuencia de la línea germinal original (línea germinal), tal como la secuencia de la línea germinal derivada de la base de datos IMGT, y también se puede seleccionar de las secuencias de anticuerpo maduro, tales como la secuencia de anticuerpo derivada del Gene bank. La retromutación se puede introducir en el anticuerpo injertado con CDR. Algunos aminoácidos del molde humano se pueden someter retromutación a aminoácidos del patrón de ratón, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Tan, P., D. A. Mitchell, T. N. Buss, M. A. Holmes, C. Anasetti & J. Foote: "Superhumanized" antibodies: reduction of immunogenic potential by complementarity determining region grafting with human germline sequences: application to an anti-CD28. *J. Immunol.*, 169, 1.119-25 (2002).

El término "separado" o "estar separado" se refiere a la adquisición de algo por medios artificiales en un estado natural. Si existe un tipo de sustancias o ingredientes "separados" en la naturaleza, puede ser el ambiente natural en el que las sustancias o los ingredientes establecidos se han cambiado, o se separaron bajo el ambiente natural, o se han dado los dos casos. Por ejemplo, en un animal vivo, existe un polinucleótido o polipéptido natural que no se ha separado, y el proceso por el que la alta pureza del mismo polinucleótido o polipéptido aislado bajo este estado natural es denominado estar separado. El término "separado" o "estar separado" no excluye la presencia de sustancias artificiales o sintéticas, y no excluye la presencia de otras impurezas que no afectan a la actividad.

El término "vector" se usa en el presente documento para referirse a un vehículo de ácido nucleico que se puede insertar por un polinucleótido. El vector de expresión es un vector que puede expresar la proteína codificada por el polinucleótido insertado. El vector se puede introducir en las células hospedadoras mediante transformación, transducción o transfección para expresar los elementos genéticos portados en las células hospedadoras. Los vectores son bien conocidos por un experto en la técnica, incluyendo, pero sin limitación: plásmido; fagémido; cósmido; cromosomas artificiales, tales como el cromosoma artificial de levadura (YAC), el cromosoma artificial bacteriano (BAC) o el cromosoma artificial derivado de P1 (PAC); fago, tal como el fago λ o el fago M13 y virus animales. Los virus animales que se pueden usar como vectores incluyen, pero sin limitación, retrovirus (incluyendo lentivirus), adenovirus, virus adenoasociado, virus del herpes (tales como el virus del herpes simplex), poxvirus, baculovirus, virus del papiloma, papovavirus (tal como SV40). Un vector puede contener diversos elementos de control de la expresión, incluyendo, pero sin limitación, secuencias promotoras, secuencias de iniciación de la transcripción, secuencias potenciadoras, elementos de selección, y genes indicadores. Además, el vector también puede contener el origen de replicación.

La expresión "célula hospedadora" se usa en el presente documento para referirse a células que se pueden usar para la introducción de vectores, incluyendo, pero sin limitación, células procariotas tales como *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*, células fúngicas tales como células de levadura o *Aspergillus*, células de insecto tales como células de *Drosophila* S2 o Sf9 o células animales tales como fibroblastos, células CHO, células COS, células NS0, células HeLa, células BHK, células HEK 293 o células humanas.

La expresión "unión específica" se usa en el presente documento para referirse a la reacción de unión no aleatoria entre dos moléculas, tal como la reacción entre un anticuerpo y su antígeno diana. En algunas realizaciones, la unión específica de un anticuerpo a un antígeno (o anticuerpo con especificidad a un antígeno) se usa en el presente documento para referirse a anticuerpo con afinidad de unión (K_D) a antígeno de menos de 10^{-5} M, por ejemplo, menos de 10^{-6} , 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M o incluso menos.

El término " K_D " se usa en el presente documento para referirse a la constante de equilibrio de disociación de la interacción específica anticuerpo-antígeno, la cual se usa para describir la afinidad de unión entre el anticuerpo y el antígeno. Cuando la constante de disociación de equilibrio es menor, la unión de antígeno a anticuerpo es más

estrecha, y la afinidad entre el anticuerpo y el antígeno es mayor. Normalmente, el anticuerpo (por ejemplo, los anticuerpos monoclonales 5C10, 5C10H1L1, 5C10H1L2, 5C10H2L1 y 5C10H2L2 de esta divulgación) se unen a antígeno (por ejemplo, proteína PDL-1) con K_D de menos de 10^{-5} M, por ejemplo, menos de 10^{-6} , 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M o incluso menos medida por el detector de interacción molecular Fortebio.

5 Las expresiones "anticuerpo monoclonal" y "mAb" tienen el mismo significado y se usan indistintamente; las expresiones "anticuerpo policlonal" y "pAb" tienen el mismo significado y se usan indistintamente; los términos "polipéptido" y "proteína" tienen el mismo significado y se usan indistintamente. También, en esta divulgación, los aminoácidos normalmente están representados por una abreviatura de una única letra o de tres letras aceptada en este campo técnico. Por ejemplo, la alanina se puede expresar por A o Ala.

10 Las expresiones "hibridoma" y "cepa de célula hibridoma" se usan indistintamente, y cuando se mencionan las expresiones "hibridoma" y "cepa de célula hibridoma", también se incluyen el subclon y las células progenie del hibridoma. Por ejemplo, cuando se menciona la cepa de célula hibridoma LT005, también se usa en el presente documento para referirse al subclon y a las células progenie de la cepa de célula hibridoma LT005.

15 La expresión "vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable" se usa en el presente documento para referirse al vehículo y/o excipiente que son compatibles con los receptores y el principio activo en farmacología y/o fisiología, que es bien conocido en este campo técnico (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences". Editado por Gennaro AR, 19ª ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995), incluyendo, pero sin limitación: moduladores de pH, tensioactivos, adyuvantes, potenciadores de la fuerza iónica. Por ejemplo, los moduladores de pH incluyen, pero sin limitación, solución salina tampón fosfato; los tensioactivos incluyen, pero sin limitación, tensioactivos catiónicos, aniónicos o no iónicos, tales como Tween-80; el potenciador de la fuerza iónica incluye, pero sin limitación, cloruro sódico.

20 El término "adyuvante" se usa en el presente documento para referirse a un agente inmunoestimulante no específico que aumenta la respuesta inmunitaria a un antígeno o cambia el tipo de respuesta inmunitaria cuando se administra al cuerpo previamente o junto con el antígeno. Existen muchos tipos de adyuvantes, incluyendo, pero sin limitación, adyuvantes de aluminio (por ejemplo, hidróxido de aluminio), adyuvante de Freund (por ejemplo, adyuvante de Freund completo y adyuvante de Freund incompleto), *Corynebacterium parvum*, lipopolisacárido, citoquinas, etc. El adyuvante de Freund es el adyuvante más comúnmente usado en los experimentos con animales. El adyuvante de hidróxido de aluminio se usa con más frecuencia en los ensayos clínicos.

25 La expresión "dosis eficaz" se usa en el presente documento para referirse a la suficiente cantidad para obtener u obtener al menos algo del efecto deseado. Por ejemplo, la dosis eficaz de prevención de enfermedad, tal como un tumor, se usa en el presente documento para referirse a la cantidad que es suficiente para prevenir, impedir, o retrasar la ocurrencia de una enfermedad, tal como un tumor; La dosis eficaz para tratar una enfermedad se usa en el presente documento para referirse a la cantidad que es suficiente para curar o al menos impedir parcialmente que el paciente tenga la enfermedad y sus complicaciones. La determinación de tal dosis eficaz está dentro del alcance del experto de este campo técnico. Por ejemplo, la dosis eficaz para tratar la enfermedad dependerá de la gravedad de la enfermedad, el estado general del sistema inmunitario del paciente, las condiciones generales del paciente tal como la edad, el peso corporal y el sexo, la administración de fármaco, y también otro tratamiento aplicado al mismo tiempo.

45 **Ventajas de la presente invención**

El anticuerpo monoclonal 5C10 en la presente es capaz de unirse a PDL-1 específicamente, bloquear PDL-1 de la interacción con PD-1 muy eficazmente, eliminar la inmunosupresión al sistema inmunitario por PDL-1 específicamente, y activar los linfocitos T.

50 **Breve descripción de los dibujos**

55 **FIG. 1** Análisis SDS-PAGE de la proteína de fusión PDL-1ECD-mFc. Las muestras y la cantidad de carga de las mismas de izquierda a derecha: Marcador (10 μ l); Muestra cargada sobre la columna cromatográfica (10 μ l); Flujo continuo (10 μ l); Elución (10 μ l).

FIG. 2 Análisis SDS-PAGE de la proteína de fusión PD-1-hFc. Las muestras y la cantidad de carga de las mismas de izquierda a derecha: Muestra cargada sobre la columna cromatográfica (10 μ l); Marcador (10 μ l).

60 **FIG. 3** Análisis SDS-PAGE de la proteína de fusión B7-1-hFc. Las muestras y la cantidad de carga de las mismas de izquierda a derecha: Muestra cargada sobre la columna cromatográfica (10 μ l); Marcador (10 μ l).

FIG. 4 Análisis SDS-PAGE del anticuerpo 5C10. Las muestras y la cantidad de carga de las mismas de izquierda a derecha: Marcador (10 μ l); muestra de proteína reducida (1 μ g); Flujo continuo de la columna cromatográfica; muestra de proteína no reducida (1 μ g).

65 **FIG. 5** Análisis SDS-PAGE del 5C10H1L1 (anticuerpo humanizado de 5C10). Las muestras y la cantidad de carga

de las mismas de izquierda a derecha: Marcador (10 µl); Elución de la columna cromatográfica (10 µl); Flujo continuo (10 µl); Muestra cargada sobre la columna cromatográfica (10 µl).

5 **FIG. 6** Análisis SDS-PAGE del 5C10H1L2 (anticuerpo humanizado de 5C10). Las muestras y la cantidad de carga de las mismas de izquierda a derecha: Marcador (10 µl); Elución de la columna cromatográfica (10 µl); Flujo continuo (10 µl); Muestra cargada sobre la columna cromatográfica (10 µl).

10 **FIG. 7** Análisis SDS-PAGE del 5C10H2L1 (anticuerpo humanizado de 5C10). Las muestras y la cantidad de carga de las mismas de izquierda a derecha: Marcador (10 µl); Elución de la columna cromatográfica (10 µl); Flujo continuo (10 µl); Muestra cargada sobre la columna cromatográfica (10 µl).

15 **FIG. 8** Análisis SDS-PAGE del 5C10H2L2 (anticuerpo humanizado de 5C10). Las muestras y la cantidad de carga de las mismas de izquierda a derecha: Marcador (10 µl); Elución de la columna cromatográfica (10 µl); Flujo continuo (10 µl); Muestra cargada sobre la columna cromatográfica (10 µl).

FIG. 9 Parámetros de la cinética de unión del anticuerpo 5C10H2L2 a PDL-1.

FIG. 10 Parámetros de la cinética de unión del anticuerpo HpLp a PDL-1.

20 **FIG. 11** Parámetros de la cinética de unión del anticuerpo PCAB a PDL-1.

FIG. 12 Bloqueo de PDL-1 de la interacción con PD-1 por el anticuerpo 5C10, 5C10H2L2 y HpLp (Fortebio).

25 **FIG. 13** Unión de 5C10H1L1 a células 293T PDL-1 positivas.

FIG. 14 Unión de 5C10H1L2 a células 293T PDL-1 positivas.

FIG. 15 Unión de 5C10H2L1 a células 293T PDL-1 positivas.

30 **FIG. 16** Unión de 5C10H2L2 a células 293T PDL-1 positivas.

FIG. 17 Unión de HpLp a células 293T PDL-1 positivas.

35 **FIG. 18** Unión de PCAB a células 293T PDL-1 positivas.

FIG. 19 Unión de 5C10H1L1, 5C10H1L2, 5C10H2L2 o 5C10H2L1 a proteína recombinante PDL-1 humana mediante ELISA indirecto.

40 **FIG. 20** Unión de 5C10H2L2 o HpLp a proteína recombinante PDL-1 de mono mediante ELISA indirecto.

FIG. 21 Unión de 5C10H2L2 a proteína recombinante PDL-1 humana, PDL-2 humana o PDL-1 de ratón mediante ELISA.

45 **FIG. 22** 5C10H1L1, 5C10H1L2, 5C10H2L2 o 5C10H2L1 compitió con PD-1 por la unión a PDL-1 (ELISA competitivo).

FIG. 23 5C10H2L2 compitió con B7-1 por la unión a PDL-1 (ELISA competitivo).

50 **FIG. 24** 5C10H2L2 incrementó la secreción de IFN-γ mediante el bloqueo de PDL-1 de la interacción con PD-1.

FIG. 25 5C10H2L2 incrementó la secreción de IL-2 mediante el bloqueo de PDL-1 de la interacción con PD-1.

FIG. 26A Afinidad de unión y constantes cinéticas de 5C10H2L2-IgG1mt a FcγRIIIa por Biacore.

55 **FIG. 26B** Afinidad de unión y constantes cinéticas de Tecentriq® a FcγRIIIa por Biacore.

FIG. 27A Afinidad de unión y constantes cinéticas de 5C10H2L2-IgG1mt a C1q por Biacore.

60 **FIG. 27B** Afinidad de unión y constantes cinéticas de Tecentriq® a C1q por Biacore.

FIG. 28 Efecto curativo de 5C10H2L2-IgG1mt a células cancerosas de pulmón no microcítico.

Descripción de la conservación del material biológico

65 La célula hibridoma LT005 se depositó en el "China Center for Type Culture Collection" (CCTCC) en Wuhan University (Código postal: 430072) el 4 de Agosto de 2015 con un número de acceso de CCTCC N.º C2015133.

Modos específicos para llevar a cabo la invención

- 5 Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completa de cómo realizar y usar los métodos y las composiciones de la divulgación, y pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su divulgación. Las técnicas o condiciones no indicadas en los ejemplos se pueden llevar a cabo de acuerdo con la bibliografía o las especificaciones del producto. Los reactivos o instrumentos de los cuales no se indican los fabricantes son productos convencionales que se pueden comprar en el mercado.
- 10 Los ratones BALB/c en la presente divulgación se compraron al "Guangdong Medical Lab Animal Center". Los linfocitos T usados en la presente divulgación eran de Akeso Biopharma Co., Ltd.

Ejemplo de preparación 1: proteína recombinante PDL-1ECD-mFc**15 1. Síntesis del gen de PDL-1ECD-mFc**

Se diseñó el gen quimera para comprender el dominio extracelular de PDL-1 (ligando 1 de muerte celular programada 1 NCBI GenBank ID: NP_054862.1), denominado PDL-1ECD y el fragmento Fc (mFc) de IgG de ratón. Para mejorar la eficacia de expresión del gen diana en células 293F, la secuencia de nucleótidos se optimizó por codón y se sintetizó por GenScript Biotech Co., Ltd. En la bibliografía científica, PDL-1 y PD-L1 se pueden usar indistintamente, y esta divulgación unificó el uso de PDL-1.

20

2. Generación del plásmido pUC57simple-PDL-1ECD-mFc

25 El gen de fusión PDL-1ECD-mFc sintetizado por GenScript Biotech Co., Ltd. se clonó en el vector de expresión pUC57simple (suministrado por GenScript Biotech Co., Ltd.) para obtener el plásmido pUC57simple-PDL-1ECD-mFc.

3. Construcción del plásmido recombinante de pcDNA3.1-PDL-1ECD-mFc

30 El plásmido pUC57simple-PDL-1ECD-mFc se sometió a digestión enzimática (*Xba* I y *Bam*H I), y, a continuación, a electroforesis. El fragmento de gen de PDL-1ECD-mFc recuperado se clonó en el vector de expresión pcDNA3.1 (comprado a Invitrogen) mediante ligación para obtener los plásmidos pcDNA3.1-PDL-1ECD-mFc. A continuación, los productos de ligación se transformaron dentro de la cepa DH5a de *E. coli* (comprada a TIANGEN BIOTECH CO. LTD) según las instrucciones. Las colonias pcDNA3.1-PDL-1ECD-mFc positivas se obtuvieron por cribado, a continuación, se amplificaron con método convencional. El plásmido recombinante se extrajo usando un kit (TIANGEN BIOTECH (Beijing)CO. LTD.; DP103-03) según las instrucciones del kit.

35

4. El plásmido recombinante pcDNA3.1-PDL-1ECD-mFc se sometió a transfección en células 293F (Invitrogen) según el kit de transfección de lipofectamina (Invitrogen).

40

5. Las células 293F transfectadas se cultivaron durante 7 días. A continuación, el sobrenadante del cultivo que contenía la proteína recombinante se purificó mediante centrifugación a alta velocidad, filtración al vacío por membrana microporosa y columna HP de proteína A HiTrap para obtener la proteína de fusión PDL-1ECD-mFc, la cual se sometió a análisis por electroforesis SDS-PAGE con la adición de tampón de carga de electroforesis bajo condiciones reducidas. Como se muestra en la Fig. 1, el peso molecular de la proteína diana es de aproximadamente 53 kD.

45

Ejemplo de preparación 2: Preparación de la proteína recombinante PD-1-hFc**50 1. Síntesis del gen de PD-1-hFc**

Se diseñó el gen quimera para comprender el dominio extracelular de PD-1 (proteína de muerte celular programada 1, NCBI GenBank ID: NP_005009.2), denominado PD-1ECD y el fragmento Fc (hFc) de IgG humana. Para mejorar la eficacia de expresión del gen diana en células 293F, la secuencia de nucleótidos se optimizó por codón y se sintetizó por GenScript Biotech Co., Ltd.

55

2. Generación del plásmido pUC57simple-PD-1ECD-TEV-hFc

El gen de PD-1ECD-TEV-hFc se clonó en el vector de expresión pUC57simple (suministrado por GenScript Biotech Co., Ltd.) para obtener el plásmido pUC57simple-PD-1ECD-TEV-hFc.

60

3. Construcción del plásmido pcDNA3.1-PD-1ECD-TEV-hFc

El plásmido pUC57simple-PD-1ECD-TEV-hFc se digirió con la enzima (*Xba* I y *Bam*H I). El fragmento de gen de PD-1ECD-TEV-hFc purificado se clonó en el vector de expresión pcDNA3.1 (comprado a Invitrogen) para obtener pcDNA3.1-PD-1ECD-TEV-hFc el cual se transformó dentro de la cepa DH5a de *E. coli* (comprado a TIANGEN). Las colonias positivas se obtuvieron por cribado, las cuales, a continuación, se amplificaron mediante técnicas de cultivo

65

de *E. coli* DH5a, y el plásmido recombinante se extrajo según la instrucción del kit (TIANGEN BIOTECH (Beijing) CO. LTD.; DP103-03).

4. El plásmido recombinante pcDNA3.1-PD-1ECD-TEV-hFc se sometió a transfección en células 293F (Invitrogen) según el kit de transfección de lipofectamina (Invitrogen).

5. Las células 293F se sometieron a transfección con pcDNA3.1-PD-1ECD-TEV-hFc y se cultivaron durante 7 días. A continuación, el sobrenadante del cultivo que contenía la proteína recombinante se purificó mediante centrifugación a alta velocidad, filtración al vacío por membrana microporosa y columna Mabselect SuRe para obtener la proteína de fusión PD-1ECD-TEV-hFc, la cual se sometió a análisis por electroforesis SDS-PAGE con la adición de tampón de carga de electroforesis bajo condiciones reducidas (Fig. 2).

Ejemplo de preparación 3: Preparación de la proteína recombinante B7-1-hFc

1. Síntesis del gen de B7-1-hFc

El gen quimera se diseñó para comprender el dominio extracelular de B7-1 (B7-1ECD; Grupo de Diferenciación 80 (también CD80 y B7-1), NCBI GenBank ID: NP_005182.1), y el fragmento Fc (hFc) de IgG humana. Para mejorar la eficacia de expresión del gen diana en células 293F, la secuencia de nucleótidos se optimizó por codón y se sintetizó por GenScript Biotech Co., Ltd.

2. Generación del plásmido pUC57simple-B7-1ECD-hFc

El gen de B7-1ECD-hFc se clonó en el vector de expresión pUC57simple (suministrado por GenScript Biotech Co., Ltd.) para obtener el plásmido pUC57simple-B7-1ECD-hFc.

3. Construcción del plásmido pcDNA3.1-B7-1ECD-hFc

El plásmido pUC57simple-B7-1ECD-hFc se digirió con la enzima (*Xba* I y *Bam*H I). El fragmento de gen de B7-1ECD-hFc purificado se clonó en el vector de expresión pcDNA3.1 (comprado a Invitrogen) mediante ligación para obtener pcDNA3.1-B7-1ECD - hFc. A continuación, los productos de ligación se transformaron dentro de la cepa DH5a de *E. coli* (comprada a TIANGEN). Se llevó a cabo el cribado de colonia y se obtuvieron clones positivos de pcDNA3.1-B7-1ECD - hFc, a continuación, los clones se amplificaron mediante técnicas de cultivo de *E. coli* DH5a, y el plásmido recombinante se extrajo según las instrucciones del kit (TIANGEN BIOTECH (Beijing) CO. LTD.; DP103-03).

4. El plásmido recombinante pcDNA3.1-B7-1ECD-hFc se sometió a transfección en células 293F (Invitrogen) según el kit de transfección de lipofectamina (Invitrogen).

5. Las células 293-F se sometieron a transfección con plásmidos pcDNA3.1-PD-1ECD-TEV-hFc y, a continuación, se cultivaron durante 7 días. A continuación, el sobrenadante del cultivo que contenía la proteína recombinante se purificó mediante centrifugación a alta velocidad, filtración al vacío por membrana microporosa y columna Mabselect SuRe para obtener la proteína de fusión B7-1ECD-hFc, la cual se sometió a análisis por electroforesis SDS-PAGE con la adición de tampón de carga de electroforesis bajo condiciones reducidas (Fig. 3).

Ejemplo 1: Generación de la cepa de célula hibridoma LT005 y el anticuerpo monoclonal 5C10, 5F10 y 9F6.

La proteína PDL-1ECD-mFc recombinante expresada por células mamíferas se usó como inmunógeno para inmunizar ratones. Se recogieron esplenocitos de ratones inmunizados y se fusionaron con células de mieloma para generar células hibridoma. Después del cribado de un gran número de muestras, entonces, se obtuvo una cepa de célula hibridoma LT005, la cual producía anticuerpo monoclonal 5C10 que podía unirse específicamente a PDL-1. También se obtuvieron otros dos anticuerpos monoclonales 5F10 y 9F6 en la presente divulgación.

Los detalles son de la siguiente manera:

1. Generación de células hibridoma

La proteína de fusión PDL-1ECD-mFc recombinante obtenida en el Ejemplo de preparación 1 se usó como inmunógeno para inmunizar ratones BALB/C (Guangdong Medical Lab Animal Center.). Se recogieron esplenocitos de ratones inmunizados y se fusionaron con células de mieloma de ratón para generar células hibridoma según los métodos generales (por ejemplo, Stewart, S.J., "Monoclonal Antibody Production", en Basic Methods in antibody Production and Characterization, Eds. G.C. Howard and D.R. Bethell, Boca Raton: CRC Press, 2000).

Se realizó análisis ELISA indirecto usando PDL-1ECD-mFc como antígeno de recubrimiento para obtener células hibridoma que producen anticuerpos que pueden unirse específicamente a PDL-1ECD-mFc. Posteriormente las células hibridoma se sometieron a ELISA competitivo, y se seleccionaron aquellas que secretaban los anticuerpos monoclonales que competían con PD-1 (PD-1-hFc obtenido a partir del ejemplo de preparación 2) en la unión a PDL-

1. Y además se obtuvo la cepa de célula hibridoma estable LT005 que producía anticuerpo monoclonal 5C10 mediante dilución limitante.

5 La cepa de célula hibridoma LT005 se depositó en el "China Center for Type Culture Collection" (CCTCC) en Wuhan University (Código postal: 430072) el 4 de Agosto de 2015 con un número de acceso de CCTCC N.º C2015133.

Similarmente, también se obtuvieron dos cepas de célula hibridoma adicionales que producían anticuerpos murinos (denominados 5F10 y 9F6, respectivamente).

10 **2. Preparación del anticuerpo monoclonal 5C10, 5F10 y 9F6**

La cepa de célula hibridoma PDL-1-5C10 se cultivó en medio que contenía suero fetal bovino (FBS) al 10 % (baja IgG) durante 7 días y el sobrenadante del cultivo celular, a continuación, se recogió y purificó para conseguir el anticuerpo 5C10.

15

Similarmente, los anticuerpos 5F10, 9F6 se prepararon según el método anterior.

3. Análisis SDS-PAGE del anticuerpo 5C10

20 Se añadieron muestras de la proteína purificada con tampón de carga reducido y tampón de carga no reducido respectivamente. Junto con el flujo continuo de la purificación, todas las muestras se hirvieron y se cargaron al gel de SDS-PAGE para el análisis. Los resultados mostraron que los pesos moleculares de las proteínas reducidas eran de aproximadamente 50 kD y 25 kD, y la proteína no reducida era de aproximadamente 150 kD (Fig. 4)

25 **4. Determinación de la afinidad, la afinidad competitiva y la afinidad celular sobre anticuerpos murinos 5C10, 5F10 y 9F6:**

30 La afinidad del anticuerpo se determinó mediante ELISA y ELISA competitivo usando los métodos descritos en el Ejemplo 9: y el Ejemplo 13, respectivamente, y la afinidad a las células se determinó mediante FACS usando el método descrito en el Ejemplo 8.

Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Afinidad, afinidad competitiva y afinidad celular de los anticuerpos murinos 5C10, 5F10 y 9F6

Anticuerpo	Afinidad mediante ELISA (nM)	Afinidad mediante ELISA competitivo (nM)	Afinidad celular mediante FACS (nM; % positivo)
5C10	0,031	0,785	2,3, 100 %
5F10	0,029	0,838	1,48, 60,3 %
9F6	0,029	0,767	2,93, 80,2 %
PCAB	0,031	0,799-1,026	2,12, 70,5 %

35

Los resultados mostraron que tres anticuerpos murinos no eran inferiores al anticuerpo de referencia PCAB (obtenido en el Ejemplo 5) en términos de afinidad y afinidad competitiva. 5C10 tenía la mejor actuación en la afinidad celular y la tasa positiva. La afinidad celular de 5F10 es mejor que PCAB, y la tasa positiva de 9F6 es mejor que PCAB.

40 **Ejemplo 2: Adquisición de las secuencias de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras de los anticuerpos monoclonales 5C10, 5F10 y 9F6.**

El ARNm total se extrajo de la cepa de célula hibridoma LT005 obtenida en el Ejemplo 1 usando el kit de aislamiento de ARN (TIANGEN, DP430) según las instrucciones del fabricante.

45

El ADNc se sintetizó usando el kit SuperMix de síntesis de ADNc de primera hebra TransGen Biotech TransScript según las instrucciones del fabricante, y se amplificó mediante PCR. La clonación TA se realizó sobre los productos de la PCR según las instrucciones del kit de clonación pEASY-T1 (Transgen CT101). Los productos de clonación TA se sometieron a secuenciación, y los resultados son de la siguiente manera:

50

Secuencia de nucleótidos que codifica VH del anticuerpo 5C10 (360 pb):

CAGGTGCAACTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAACCT
GTCCATTACCTGCACTGTCTCTGGGTTCTCATTAAAGCAACTATGATATAAGCTGGAT
TCGCCAGCCACCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTCGGAGTAATATGGACTGGTGGAG
CCACAAATTATAATTCAGCTTTCATGTCCAGACTGAGCATCAGTAGGGACAACCTCC
AAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACCTGATGACACAGCCATATA
TTACTGTGTGAGAGATTCGAACTATAGGTACGACGAGCCGTTTACTTACTGGGGCC
AAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 1)

Secuencia de aminoácidos de VH del anticuerpo 5C10 (120 aa):

QVQLKESGPGLVAPSQNLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEWLGVIWTGGA
TNYNSAFMSRLSISRDNLSKQVFLKMNSLQDDTAIYYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGT
LVTVSA (SEQ ID NO: 2)

5

Secuencia de nucleótidos que codifica VL del anticuerpo 5C10 (318 pb):

GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGA
GTCAGTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGCATTGGCACAAACATACACTGGTTTCA
GCAAAGAACAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTC
TGGGATCCCTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCAT
CAACAGTGTGGAGTCTGAAGATATTGCAGATTACTACTGTCAACAAAGTAATAGCT
GGCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATA (SEQ ID NO: 3)

10

Secuencia de aminoácidos de VL del anticuerpo 5C10 (106 aa):

DILLTQSPAILSVSPGERVSLSCRASQSIGTNIHWFQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPS
RFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQNSNSWPYTFGGGTKLEI (SEQ ID NO: 4)

15

Similarmente, se obtuvieron secuencias de la cadena ligera y pesada del anticuerpo monoclonal 9F6 y 5F10.
Secuencia de aminoácidos de VH del anticuerpo 5F10 (117 aa):

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFDIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGRIDPAD
GNTRYDPKFQDKTTITDTSSNTAHLQLSSLTSEDYAVYYCARGLGAWFASWGQGLTV
TVSA (SEQ ID NO: 21)

20

Secuencia de nucleótidos que codifica VH del anticuerpo 5F10 (351 pb):

GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGT
CAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCGACATTAAGACACCTATATCCACTGGGT
GAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGGAC
GGTAATACTAGGTATGACCCGAAGTTCAGGACAAGACCACTATAACAACCGACAC
ATCCTCCAACACAGCCCACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCG
TCTATTACTGTGCTAGAGGCCTCGGAGCTTGGTTTGCTTCTGGGGCCAAGGGACTC
TGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 22)

Secuencia de aminoácidos de VL del anticuerpo 5F10 (106 aa):

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDITNSLNWYQQKPDGTVKLLIHYSRLHSG
5 VPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGHTLPPTFGGGTKLEI (SEQ ID NO: 23)

Secuencia de nucleótidos que codifica VL del anticuerpo 5F10 (318 pb):

GATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGA
GTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTACCAATTCCTTAAACTGGTATCA
GCAGAAACCAGATGGAAGTGTAAACTCCTGATCCACTACACATCAAGATTACACT
CAGGAGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACC
ATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTCATAC
GCTTCCTCCGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATC (SEQ ID NO: 24)

10 Secuencia de aminoácidos de VH del anticuerpo 9F6 (124 aa):

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMYWVKQRPEQGLEWIGRIDPAN
GNTKYDPKFQGKATITADTSANTAYLQLSSLTSEDVAVYYCSRGPFGGIGEYIYAMDY
WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 25)

15 Secuencia de nucleótidos que codifica VH del anticuerpo 9F6 (372 pb):

GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGT
CAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAGACACCTATATGTAAGTGGGT
GAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAAT
GGTAATACTAAATATGACCCGAAGTTCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACAC
ATCCGCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCG
TCTATTACTGTTCTAGAGGCCCTCCAGGAGGTATCGGCGAGTATATCTATGCTATGG
ACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 26)

Secuencia de aminoácidos de VL del anticuerpo 9F6 (107 aa):

QIVLTQSPAIMASASLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSNLAS
 GVPARFSGSGSGTSSYSLTISSMEAEDAATYYCHQYHRSPPTFGGGTKLEI (SEQ ID NO:
 27)

Secuencia de nucleótidos que codifica VL del anticuerpo 9F6 (321 pb):

5

CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCTAGGGGAACGG
 GTCACCATGACCTGCACTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTCCAGTTACTTGCCTGGTAC
 CAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAACTCTGGATTTATAGCACATCCAACCTGGC
 TTCTGGAGTCCCAGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCAC
 AATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCACCAGTATCATC
 GTTCCCCACCCACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATC (SEQ ID NO: 28)

Ejemplo 3: Diseño de las secuencias de la cadena ligera y pesada del anticuerpo humanizado 5C10H1L1, 5C10H1L2, 5C10H2L1 y 5C10H2L2

10

La estructura cristalina tridimensional de la proteína PDL-1 (PDB Código 3BIK, Lin, DY. et al., *PNAS USA* 105(8):3.011-6 (2008)) y la estructura de 5C10 obtenida por modelado computacional basado en la secuencia del Ejemplo 2, se usaron para el diseño de la mutación, a continuación, se generaron las secuencias de la región variable del anticuerpo mutadas de 5C10H1L1, 5C10H1L2, 5C10H2L1, 5C10H2L2 (la región constante de cadena pesada era la región C de la cadena gamma-1 de Ig, Acceso: P01857; la región constante de cadena ligera era la región C de la cadena Kappa de Ig, Acceso: P01834). A continuación, se muestran las secuencias de la región variable:

15

1. Las secuencias de la cadena ligera y pesada del anticuerpo monoclonal humanizado 5C10H1L1

20

Secuencia de nucleótidos de VH del anticuerpo 5C10H1L1 (360 pb):

CAGGTCCAGCTGCAGGAGTCAGGCCCGGCCTGGTGAAGCCCAGTGAGAACCT
 GTCAATCACCTGCACAGTCTCTGGCTTCTCACTGAGCAATTACGACATCAGTTGGAT
 TCGACAGCCCCCTGGAAAGGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATCTGGACAGGCGGG
 GCAACTAACTATAATCCAGCCTTTAAAAGCCGGCTGACCATTTCCAGAGACAATC
 CAAGTCTCAGGTGTCTCTGAAAATGAGCTCCCTGCAGGCCGCTGATACCGCTGTGTA
 CTATTGTGTCAGGGACAGCAATTACCGCTATGATGAGCCCTTCACATACTGGGGGC
 AGGGA ACTCTGGTGACCGTCTCTAGT (SEQ ID NO: 5)

Secuencia de aminoácidos de VH del anticuerpo 5C10H1L1 (120 aa):

25

QVQLQESGPGLVKPSNLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEWLGVIWTGGA
 TNYNPAFKSRLTISRDNKSKVSLKMSSLQAADTAVYYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGT
 LVTVSS (SEQ ID NO: 6)

Secuencia de nucleótidos que codifica VL del anticuerpo 5C10H1L1 (321 pb):

GAAATCGTGCTGACACAGAGCCCTGACACACTGAGCGTGACTCCCAAGGAGAA
AGTCACCCTGACATGCCGGGCATCACAGAGCATCGGAACAAACATTCACTGGTTCC
AGCAGAGACCAGGCCAGAGCCCCAAGCTGCTGATCAAATACGCCTCCGAATCTATC
AGTGGCATTCCCTCCCGATTCTCAGGCAGCGGGTCCGGAACCGACTTTACTCTGACC
ATTA ACTCTGTGGAGGCTGAAGATGCCGCTACATACTATTGCCAGCAGTCTAATAGT
TGGCCTTATACCTTCGGCCAGGGGACAAAGCTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 7)

Secuencia de aminoácidos de VL del anticuerpo 5C10H1L1 (107 aa):

EIVLTQSPDLSVTPKEKVTLTCRASQSIGTNIHWFQQRPGQSPKLLIKYASESISGIP
5 SRFSGSGSGTDFLTINSVEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGQGKLEIK (SEQ ID NO: 8)

2. Las secuencias de la cadena ligera y pesada del anticuerpo monoclonal humanizado 5C10H2L2

Secuencia de nucleótidos que codifica VH del anticuerpo 5C10H2L2 (360 pb):

10

CAGGTCCAGCTGCAGGAGTCCGGCCCCGGCCTGGTGAAGCCCTCCGAGACACT
GTCTATCACCTGCACAGTCAGCGGCTTCTCACTGAGCAACTACGACATCTCCTGGAT
TCGACAGCCCCCTGGAAAGGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATCTGGACAGGCGGG
GCAACTAACTATAATCCAGCCCTGAAATCTCGGCTGACTATTAGTAGAGACAATC
AAAGAATCAGGTGTCCCTGAAAATGAGCTCCGTCACCGCCGCTGATACAGCTGTGT
ACTATTGTGTCAGGGACAGCAATTACCGCTATGATGAGCCCTTTACCTACTGGGGGC
AGGGA ACTCTGGTGACCGTCTCTAGT (SEQ ID NO: 9)

Secuencia de aminoácidos de VH del anticuerpo 5C10H2L2 (120 aa):

15

QVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQPPGKLEWLGVIIWTGGAT
NYNPALKSRLTISRDN SKNQVSLKMSSVTAADTAVYYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGT
LVTVSS (SEQ ID NO: 10)

Secuencia de nucleótidos que codifica VL del anticuerpo 5C10H2L2 (321 pb):

20

GAAATCGTGCTGACACAGTCTCCTGATACCCTGAGCGTGACTCCCAAGGAGAA
AGTCACCCTGACATGCAGGGCATCACAGAGCATCGGAACAAACATTCACTGGTTCC
AGCAGAAGCCAGGCCAGAGCCCCAAGCTGCTGATCAAATACGCCTCCGAATCTATT
AGTGGAGTGCCTTCCCGCTTCTCAGGCAGCGGGTCCGGAACCGACTTTACTCTGACC
ATCAACTCTGTGGAGGCTGAAGATGCCGCTACATACTATTGCCAGCAGTCTAATAG
TTGGCCTTATACCTTCGGCCAGGGGACAAAGCTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 11)

Secuencia de aminoácidos de VL del anticuerpo 5C10H2L2 (107 aa):

EIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLTTCRASQSIGTNIHWFQQKPGQSPKLLIKYASESISGV
PSRFSGSGSGTDFTLTINSVEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGQGKLEIK (SEQ ID NO:
12)

5 **3. Las secuencias de la cadena ligera y pesada del anticuerpo monoclonal humanizado 5C10H1L2**

Secuencia de nucleótidos que codifica VH del anticuerpo 5C10H1L2: SEQ ID NO: 5

Secuencia de aminoácidos de VH del anticuerpo 5C10H1L2: SEQ ID NO: 6

10

Secuencia de nucleótidos que codifica VL del anticuerpo 5C10H1L2: SEQ ID NO: 11

Secuencia de aminoácidos de VL del anticuerpo 5C10H1L2: SEQ ID NO: 12

15 **4. Las secuencias de la cadena ligera y pesada del anticuerpo monoclonal humanizado 5C10H2L1**

Secuencia de nucleótidos que codifica VH del anticuerpo 5C10H2L1: SEQ ID NO: 9

Secuencia de aminoácidos de VH del anticuerpo 5C10H2L1: SEQ ID NO: 10

20

Secuencia de nucleótidos que codifica VL del anticuerpo 5C10H2L1: SEQ ID NO: 7

Secuencia de aminoácidos de VL del anticuerpo 5C10H2L1: SEQ ID NO: 8

25 **Ejemplo 4:** Preparación del anticuerpo humanizado de 5C10 5C10H1L1, 5C10H1L2, 5C10H2L1, 5C10H2L2 y análisis por SDS-PAGE del mismo

El ADNc de la cadena pesada (VH: SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 9; CH: hlgG1) y la cadena ligera (VL: SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 11; CL:secuencia kappa humana) para 5C10H1L1, 5C10H1L2, 5C10H2L1 y 5C10H2L2 se clonaron en el vector pUC57simple (GenScript Biotech Co., Ltd) para obtener el plásmido pUC57simple-5C10H1, pUC57simple5C10L1, pUC57simple-5C10H2 y pUC57simple-5C10L2.

30

Las secuencias se clonaron más en el vector pcDNA3.1 según el método descrito en el Ejemplo de preparación 1. Los plásmidos recombinantes se extrajeron y se sometieron a transfección conjunta en células 293F. Después de cultivo durante 7 días, a continuación, el sobrenadante del cultivo se purificó mediante centrifugación a alta velocidad, filtración al vacío de membrana microporosa y columna HP de proteína A HiTrap.

35

Se añaden muestras de proteína purificada con tampón de carga reducido o no reducido por separado, todas las muestras se hierven y se cargan en el gel de SDS-PAGE para el análisis. Los resultados se muestran en la Fig. 5, la Fig. 6, la Fig. 7 y la Fig. 8, en las que la muestra reducida tienen dos bandas sobre el gel, correspondientes a las bandas de 50 kD y 25 kD sobre el marcador de proteína respectivamente, y la proteína no reducida tiene una banda en 150 kD.

40

45 **Ejemplo 5:** Análisis de los parámetros de la cinética de unión del anticuerpo humanizado 5C10H2L2

Los parámetros de la cinética de unión del anticuerpo humanizado 5C10H2L2 al antígeno PDL-1 (NCBI GenBank ID: NP_054862.1, secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO: 13; secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 14) se determinaron por Fortebio.

45

50 **1. Preparación de la muestra**

(1) La proteína PDL-1-mFc se preparó mediante el método descrito en el Ejemplo de preparación 1 y, a continuación, la proteína PDL-1-mFc se digirió con proteasa TEV y se purificó mediante cromatografía en columna para obtener el antígeno PDL-1.

55

La secuencia de ADN de PDL-1 (870 pb):

ATGAGGATTTTCGCCGTCTTTATCTTTATGACCTACTGGCATCTGCTGAACG
CTTTTACTGTGACCGTCCCCAAGGATCTGTATGTGGTGGAGTACGGAAGCAACA
TGACTATCGAGTGCAAGTTCCCCGTGGAAAAACAGCTGGACCTGGCCGCTCTGA
TTGTCTATTGGGAGATGGAAGATAAGAATATCATTTCAGTTTGTGCACGGCGAGG
AAGACCTGAAAGTCCAGCATAGCTCCTACAGGCAGCGCGCCCGACTGCTGAAG
GATCAGCTGTCCCTGGGGAACGCAGCCCTGCAGATCACCGACGTGAAACTGCAG
GATGCTGGAGTCTACAGGTGCATGATCTCTTACGGCGGGGCTGATTATAAGCGC
ATTACAGTGAAAGTCAATGCACCTTATAACAAGATCAATCAGAGAATTCTGGTG
GTCGACCCAGTGACCAGTGAGCACGAACTGACATGTCAGGCTGAGGGCTACCCC
AAGGCAGAAGTGATCTGGACCTCTAGTGATCATCAGGTCCTGTCAGGGAAAACC
ACAACCTACCAACAGCAAGCGAGAGGAAAAACTGTTCAATGTGACATCCACTCTG
AGGATCAACACAACCTACCAATGAGATTTTCTATTGCACTTTTTCGGAGACTGGAC
CCTGAGGAAAACCACACCGCAGAGCTGGTCATCCCAGAACTGCCACTGGCACAC
CCACCTAATGAGCGAACACACCTGGTCATCCTGGGAGCCATTCTGCTGTGCCTG
GGCGTCGCTCTGACTTTCATTTTTTCGGCTGAGAAAGGGGCGGATGATGGACGTG
AAAAAGTGTGGCATTTCAGGATACTAACTCAAAAAAGCAGTCCGATACCCATCTG
GAAGAAACC (SEQ ID NO: 13)

La secuencia de aminoácidos de PDL-1 (290 aa):

MRIFAVFIFMTYWHELLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAAL
IVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDA
GVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPTSEHELTCQAEGYPKAEV
IWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAE
LVIPELPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKK
QSDTHLEET (SEQ ID NO: 14)

5

(2) Preparación del anticuerpo control positivo HpLp y PCAB

10 En la presente divulgación, se seleccionó HpLp o PCAB como control positivo, en la que HpLp es Atezolizumab (nombre comercial Tecentriq®) en el mercado, y PCAB es el anticuerpo de PDL-1 en el ensayo clínico.

15 Atezolizumab (nombre comercial Tecentriq®) se compró a Roche. El método para generar HpLp (también denominado KF025HpLp) se encontró en el documento US 2010/0203056 A1 (por ejemplo, Ejemplo 10), en el que la secuencia de VH del anticuerpo HpLp estaba descrita en SEQ ID NO: 20 mientras que la secuencia de VL estaba descrita en SEQ ID NO: 21.

El método para generar PCAB se encontró en el documento US 7.943.743 B2 (por ejemplo, Ejemplo 1), en el que la secuencia de VH del anticuerpo estaba descrita en SEQ ID NO: 1 y la secuencia de VL estaba descrita en SEQ ID NO: 11.

5 **2. Métodos**

Para detectar la afinidad de unión de 5C10H2L2, HpLp y PCAB al antígeno PDL-1, el antígeno PDL-1 (5 µg/ml) se recubrió sobre la superficie del sensor AR2G mediante acoplamiento de amino seguido de bloqueo con etanolamina. Después del calibrado en PBST, se llevó a cabo la unión entre el antígeno capturado sobre el biosensor y el anticuerpo, y el anticuerpo se diluyó en serie con dilución 1:3 (concentración inicial: 200 nM) con PBST (10 mM). Las afinidades de unión de 5C10H2L2, HpLp y PCAB al antígeno PDL-1 se analizaron mediante el Análisis de Datos Fortebio 7.0.

15 **3. Resultados**

La afinidad de unión y las constantes cinéticas de 5C10H2L2, HpLp y PCAB a PDL-1 se mostraron en la Tabla 2 y las Fig. 9-11.

Tabla 2: La afinidad de unión y las constantes cinéticas de 5C10H2L2, HpLp y PCAB a PDL-1

Anticuerpo	K_D (M)	K_{on} (1/Ms)	SD (K_{on})	K_{dis} (1/S)	SD (K_{dis})
5C10 H2L2	8,08E-11	5,58E+06	2,06E+05	4,51E-04	1,66E-05
HpLp	3,68E-11	4,07E+06	1,02E+05	1,50E-04	9,99E-06
PCAB	1,28E-10	6,55E+06	3,88E+05	8,37E-04	2,25E-05

K_D : Constante de disociación; K_{on} : Constante tasa de asociación; K_{dis} : constante tasa de disociación; $K_D=K_{dis}/K_{on}$.

20 Los resultados mostraron que todos los tres anticuerpos se unían a antígeno con muy alta afinidad. Y la afinidad de unión de 5C10H2L2 y HpLp eran mayores que la de PCAB a antígeno.

Ejemplo 6: Bloqueo de PDL-1 de la interacción con PD-1 por el anticuerpo 5C10, 5C10H2L2 y HpLp (Fortebio)

25 Para detectar la capacidad de 5C10, 5C10H2L2 y HpLp para bloquear PDL-1 de la interacción con PD-1, el antígeno PDL-1 (5 µg/ml) se recubrió sobre la superficie del sensor AR2G mediante acoplamiento de amino seguido de bloqueo con etanolamina. Después del calibrado en PBST, se llevó a cabo la unión entre el antígeno capturado sobre el biosensor y el anticuerpo y el anticuerpo se diluyó en serie con dilución 1:3 (concentración inicial: 33,33 nM) con PBST (10 mM). A continuación, las puntas del biosensor se sumergieron en la solución que contenía la proteína PD-1 (10 µg/ml) durante 420 s.

Como se muestra en la Fig. 12, cada anticuerpo era capaz de inhibir eficazmente la unión de PDL-1 humano a PD-1 de una manera dependiente de la dosis, la intensidad de fluorescencia de cada dosis y la CE_{50} ajustada se mostraron en la Tabla 3.

35

Tabla 3: Bloqueo de PDL-1 de la interacción con PD-1 por el anticuerpo 5C10, 5C10H2L2 y HpLp

Anticuerpo (nM)	5C10	5C10 H2L2	HpLp
33,33	0,0058	-0,0109	0,0127
11,11	0,0038	-0,0078	0,0149
3,704	0,0088	-0,0007	0,0073
1,235	0,0289	0,0103	0,0268
0,4115	0,0599	0,0425	0,0697
0,1372	0,0739	0,0732	0,0867
0,04572	0,0773	0,0601	0,0947
CE_{50} (nM)	0,817	0,654	0,625

Los resultados muestran que todos los tres anticuerpos eran capaces de inhibir eficazmente la unión del PDL-1 humano a PD-1 de una manera dependiente de la dosis.

40

Ejemplo 7: Bloqueo de PDL-1 de la interacción con PD-1 por el anticuerpo 5C10H2L2 y HpLp

La capacidad de 5C10H2L2 para bloquear la interacción PD1/PDL-1 se comparó con HpLp mediante HTRF usando el kit del ensayo de unión PD1/PDL-1 (CISBIO; 63ADK000CPLPEH). El anticuerpo 5C10H2L2 y HpLp se diluyeron en serie con dilución 1:3 (concentración inicial: 100 µg/ml; 10 gradientes) con tampón de dilución. Se añadieron 2 µl de muestra, 4 µl de PDL-1-EuK y 4 µl de Tag-PDI a las soluciones seguido de centrifugación transitoria e incubación (20 min a temperatura ambiente). A continuación, además se añadió 10 µl de anti-Tag-XL665 a las soluciones seguido de centrifugación transitoria e incubación (2 horas a temperatura ambiente). Por último, el valor se leyó por PHERA star Fs (BMG) y los datos se analizaron por Graph Prism.

Los resultados mostraron que HpLp y 5C10H2L2 tenían capacidad similar para bloquear la interacción de PD1/PDL-1 (67,29 ng/ml y 68,97 ng/ml respectivamente). Ambos anticuerpos podían inhibir eficazmente la unión de PDL-1 humano a PD-1.

Ejemplo 8: La unión de los anticuerpos anti-PDL-1 humanizados a células que expresan PDL-1 determinada por FACS.

Primero se construyeron células 293T que expresaban PDL-1, a continuación, las células hospedadoras se marcaron por anticuerpos humanizados 5C10H1L1, 5C10H1L2, 5C10H2L2, 5C10H2L1 y anticuerpos de control positivo (HpLp y PCAB). La unión específica de los anticuerpos 5C10H1L1, 5C10H1L2, 5C10H2L2, 5C10H2L1 y los anticuerpos de control positivo (HpLp y PCAB) al antígeno con conformación natural sobre la superficie celular se analizó por FACS.

Los detalles son de la siguiente manera:

1. Construcción de células 293T que expresan PDL-1

El vector pLenti6.3-PDL-1 (Comprado a Invitrogen) que contenía PDL-1 se sometió a transfección en células 293T según el manual del kit de transfección de lipofectamina (comprado a Invitrogen). Las células que de manera estable expresan PDL-1 se obtuvieron después del cribado.

2. Marcación del anticuerpo y análisis por FACS

Las células 293T se recogieron después del tratamiento con tripsina convencional, y el número de células por tubo de colección era de 2×10^5 . Cada dilución de anticuerpo se preparó con PBS (BSA al 1 %) a concentraciones de 50 nM, 20 nM, 10 nM, 3 nM, 1 nM, 0,1 nM, 0,01 nM y 0 nM, respectivamente. A continuación, se incubaron las diluciones de anticuerpo con las células 293 T que expresaban PDL-1 sobre hielo durante 2 horas seguido de lavado con PBS 3 veces. Anti-IgG humana de cabra con FITC se diluyó (1:100) con PBS y se añadió a cada tubo durante 100 µl, lo cual a continuación se incubó durante 1 hora en hielo. Después de lavado con PBS 3 veces, las células se resuspendieron por 300 µl de PBS y las señales de fluorescencia se detectaron por canales FITC de citometría de flujo.

3. Resultados

La unión del anticuerpo 5C10H1L1, 5C10H1L2, 5C10H2L1, 5C10H2L2 y los anticuerpos para el control positivo (HpLp y PCAB) a células 293T que expresaban PDL-1 se mostraron en las Fig. 13-18.

Los resultados mostraron que todos los anticuerpos podían unirse eficazmente al PDL-1 sobre la superficie de la célula 293T de una manera dependiente de la dosis. Después del análisis de cuantificación fluorescente en los anticuerpos unidos, las curvas de unión se ajustan con el modelo patrón y se calcula, la eficacia de unión CE_{50} de cada anticuerpo, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4: Análisis de la intensidad de fluorescencia sobre la unión del anticuerpo 5C10H1L1, 5C10H1L2, 5C10H2L2, 5C10H2L1, HpLp, PCAB al antígeno PDL-1 de superficie de 293-T por FACS

Anticuerpo/nM	Intensidad de fluorescencia media (IFM)							CE_{50} (nM)
	0,01	0,10	1,00	3,00	10,00	20,00	50,00	
5C10H1L1	4,84	15,27	113,99	245,65	256,56	247,63	194,04	1,084
5C10H1L2	7,25	12,63	74,81	202,24	294,53	264,22	260,09	1,771
5C10H2L2	4,85	12,92	83,59	199,45	263,95	285,02	299,63	1,962
5C10H2L1	4,64	13,54	94,70	209,32	264,17	283,13	255,58	1,504
HpLp	4,48	10,48	75,788	173,52	243,03	251,81	241,14	1,804
PCAB	5,55	11,82	61,12	99,86	131,66	130,95	104,43	1,108

Los resultados mostraron que todos los anticuerpos podían unirse eficazmente a la proteína diana (PDL-1) sobre la superficie de la célula 293T de una manera dependiente de la dosis.

5 **Ejemplo 9:** Determinación de la afinidad de unión de los anticuerpos anti-PDL-1 humanizados a PDL-1 mediante ELISA indirecto

10 El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) indirecto se realizó para evaluar la afinidad de unión de 5C10H1L1, 5C10H1L2, 5C10H2L2, 5C10H2L1, y los anticuerpos de control positivo (HpLp y PCAB) a PDL-1 humano. La placa de ELISA se recubrió con PDL-1 humano y se incubó a 4 °C durante una noche, seguido de bloqueo con BSA al 1 % a 37 °C durante 2 horas. A continuación, los anticuerpos se añadieron a cada pocillo y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Se añadió un anticuerpo secundario, anti-IgG humana de cabra conjugado con HRP (H+L) (Jackson, 109-035-088). El sustrato TMB (Neogen, 308177) se añadió para la reacción cromógena y se incubó durante 5 minutos. La absorbancia se leyó a 450 nm.

15 Los resultados se muestran en la Fig. 19. Como la figura indica, 5C10H1L1, 5C10H1L2, 5C10H2L2, 5C10H2L1, HpLp y PCAB pueden unirse eficazmente a PDL-1 humano de una manera dependiente de la dosis. La intensidad fluorescente de cada dosis y la eficacia de unión calculada representada por CE_{50} después del ajuste de curva se enumeran en la Tabla 5.

20

Tabla 5: Unión del anticuerpo 5C10H1L1, 5C10H1L2, 5C10H2L2, 5C10H2L1, HpLp y PCAB a PDL-1 humano (ELISA indirecto)

Antígeno recubierto: PDL-1-mFc (1 µg/ml)												
Anticuerpo (µg/ml)	5C10H1L1		5C10 H2L2		5C10H1L2		5C10H2L1		HpLp		PCAB	
1,000	3,168	2,923	2,914	3,010	3,075	2,983	2,839	2,985	3,023	2,934	3,017	3,177
0,333	3,153	3,044	3,176	2,974	2,992	3,089	3,004	2,997	2,854	3,099	3,006	3,158
0,111	2,958	2,926	3,084	2,899	3,006	2,999	3,001	2,921	2,995	3,085	3,037	3,163
0,037	2,950	2,786	2,930	2,758	2,783	2,827	2,814	2,704	2,908	2,894	2,843	2,892
0,012	2,495	2,228	2,337	2,280	2,243	2,305	2,169	2,202	2,446	2,315	2,374	2,525
0,004	1,574	1,336	1,367	1,346	1,320	1,408	1,309	1,205	1,673	1,643	1,502	1,770
0,001	0,816	0,616	0,659	0,622	0,624	0,690	0,595	0,560	0,866	0,855	0,746	0,940
0,000	0,053	0,055	0,059	0,052	0,052	0,054	0,054	0,055	0,053	0,059	0,055	0,055
2ND	Anti-IgG humana de cabra conjugado con HRP como un anticuerpo secundario											
CE_{50} (nM)	0,032		0,035		0,035		0,038		0,025		0,027	

25 Los resultados mostraron que los anticuerpos de la invención podía unirse eficazmente al PDL-1 humano de una manera dependiente de la dosis.

Ejemplo 10: Afinidad de unión del anticuerpo 5C10H2L2 a PDL-1 de mono mediante ELISA indirecto

30 En consideración a los experimentos farmacocinéticos y de toxicología a llevar a cabo sobre los animales del experimento, el fin de este experimento es determinar si el anticuerpo 5C10H2L2 puede unirse a PDL-1 de mono; si el anticuerpo 5C10H2L2 puede unirse a PDL-1 de mono, entonces el mono se puede usar para los experimentos farmacocinéticos y de toxicología.

35 La unión de 5C10H2L2 y el HpLp de control positivo a PDL-1 de mono se midió mediante ELISA indirecto. La placa de ELISA se recubrió con PDL-1 de mono y se incubó a 4 °C durante una noche seguido de bloqueo con BSA al 1 % en PBS a 37 °C durante 2 horas. A continuación, los anticuerpos se añadieron a cada pocillo y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Se añadió un anticuerpo secundario, anti-IgG humana de cabra conjugado con HRP (H+L) (Jackson, 109-035-088). El sustrato TMB (Neogen, 308177) se añadió para la reacción cromógena y se incubó durante 5 minutos. La absorbancia se leyó a 450 nm.

40

Los resultados de la actividad de unión de 5C10H2L2 y HpLp a PDL-1 de mono se muestran en la Fig. 20. Como se muestra en la Fig. 20, 5C10H2L2 y HpLp pueden unirse eficazmente a PDL-1 de mono de una manera dependiente de la dosis. La intensidad fluorescente de cada dosis y la eficacia de unión calculada representada por CE_{50} después del ajuste de curva se muestran en la Tabla 6.

45

Tabla 6: Unión de anticuerpo 5C10H2L2 y HpLp a PDL-1 de mono (ELISA indirecto)

Dilución de anticuerpo (µg/ml)	Antígeno recubierto: PDL-1-his de mono (1 µg/ml)			
	5C10 H2L2		HpLp	
1,000	3,328	3,302	2,531	2,123
0,333	3,395	3,169	1,969	1,740
0,111	3,040	2,740	1,424	1,151
0,037	2,411	2,013	0,969	0,763
0,012	1,194	1,047	0,431	0,374
0,004	0,562	0,495	0,243	0,221
0,001	0,267	0,244	0,171	0,153
0,000	0,110	0,115	0,111	0,104
Anti-IgG humana de cabra conjugado con HRP como un anticuerpo secundario				
CE ₅₀ (nM)	0,165		1,049	

Los resultados mostraron que tanto el anticuerpo 5C10H2L2 como HpLp podían unirse eficazmente a PDL-1 de mono de una manera dependiente de la dosis, y la capacidad de unión de 5C10H2L2 es mayor que la de HpLp.

5

Ejemplo 11: Unión de 5C10H2L2 a PDL-1 humano, PD-L2 humano y PDL-1 de ratón mediante ELISA indirecto

La unión de 5C10H2L2 a PDL-1 humano, PD-L2 humano (Sino Biological Inc., Cat. 10292-H08H) y PDL-1 de ratón (Sino Biological Inc., Cat. 50010-M08H) se analizó mediante ELISA indirecto. PDL-1 humano, PD-L2 humano o PDL-1 de ratón se añadió a la placa de ELISA a 0,5 µg/ml con 100 µl por pocillo individualmente, y se incubó a 4 °C durante una noche. Los anticuerpos se diluyeron en serie empezando desde 1 µg/ml (dilución 1:3; 11 gradientes). Los pocillos se bloquearon con BSA al 1 % a 37 °C durante 2 horas. Se añadió un anticuerpo secundario, anti-IgG humana de cabra conjugado con HRP (H+L) (Jackson, 109-035-088), a dilución 1:20.000. El sustrato TMB (Neogen, 308177) se añadió para la reacción cromógena y se incubó durante 5 minutos. La absorbancia se leyó a 450 nm.

15

Los resultados de la unión de 5C10H2L2 a PDL-1 humano, PD-L2 humano y PDL-1 de ratón se muestran en la Fig. 21. Como se muestra en la Fig. 21, 5C10H2L2 puede unirse eficazmente a PDL-1 humano de una manera dependiente de la dosis. La intensidad fluorescente de cada dosis y la eficacia de unión calculada después de la fijación de curva CE₅₀=9,16 ng/ml, aunque no se une a PD-L2 humano y PDL-1 de ratón.

20

En conclusión, 5C10H2L2 se puede combinar específicamente a PDL-1 humano mientras que Atezolizumab puede unirse a PDL-1 de ratón (Tecentriq® PHARMACOLOGY REVIEW, la FDA, Número de solicitud 7610340rig1s000). Los datos indican que el anticuerpo 5C10H2L2 tiene excelente especificidad.

25

Ejemplo 12: Determinación de la actividad de unión competitiva de los anticuerpos humanizados por PDL-1 con PD-1 mediante ELISA competitivo

El ELISA competitivo se realizó para evaluar la capacidad de 5C10H1L1, 5C10H1L2, 5C10H2L2, 5C10H2L1, y los controles positivos (HpLp y PCAB) para competir con PD-1 en la unión a PDL-1 humano. La placa de ELISA se recubrió con el receptor y se incubó a 4 °C durante una noche. Los pocillos se bloquearon con BSA al 1 % a 37 °C durante 2 horas. Después de eso, el anticuerpo y la PDL-1-mFc se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos lo cual, a continuación, se añadió posteriormente a cada pocillo y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Se añadió un anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón de cabra conjugado con HRP (H+L) (Jackson, 109-035-062). El sustrato TMB (Neogen, 308177) se añadió para la reacción cromógena y se incubó durante 5 minutos. La absorbancia se leyó a 450 nm.

30

35

Los resultados de la actividad de unión de estos anticuerpos a PDL-1 se muestran en la Fig. 22. Se puede ver que 5C10H1L1, 5C10H1L2, 5C10H2L2, 5C10H2L1, HpLp y PCAB pueden competir con PD-1 en la unión con PDL-1 de una manera dependiente de la dosis. La intensidad fluorescente de cada dosis y la eficacia de unión calculada representada por CE₅₀ después de la fijación de curva se muestran en la Tabla 7.

40

Tabla 7: Unión competitiva del anticuerpo 5C10H1L1, 5C10H1L2, 5C10H2L2, 5C10H2L1, Hplp y PCAB a PDL-1 (ELISA competitivo)

Anticuerpo (µg/ml)	Antígeno recubierto: PD-1-mFc 0,5 µg/ml											
	5C10H1L1		5C10 H2L2		5C10H1L2		5C10H2L1		KF025 HPLP (Hplp)		PCAB	
10	0,131	0,123	0,124	0,124	0,123	0,117	0,138	0,124	0,130	0,127	0,175	0,176
3,3333	0,155	0,153	0,153	0,165	0,151	0,157	0,158	0,159	0,152	0,162	0,199	0,215
1,1111	1,961	1,999	1,672	1,695	1,797	1,799	1,843	1,871	1,501	1,244	0,806	0,905
0,3704	2,383	2,331	2,238	2,251	2,292	2,292	2,230	2,407	2,180	2,106	2,152	1,911
0,1235	2,399	2,367	2,241	2,291	2,289	2,328	2,326	2,256	2,120	2,022	2,146	2,078
0,0412	2,430	2,456	2,314	2,413	2,338	2,364	2,358	2,350	2,358	2,208	2,267	2,136
0,0137	2,395	2,334	2,298	2,331	2,339	2,368	2,394	2,357	2,186	2,297	2,290	2,199
0,0000	2,345	2,343	2,372	2,368	2,345	2,369	2,311	2,276	2,329	2,298	2,116	2,262
PDL-1-mFc: 1 µg/ml												
Anti-IgG de ratón de cabra conjugado con HRP como un anticuerpo secundario												
CE ₅₀	10,37		9,683		9,952		10,03		8,73		6,145	

Los resultados mostraron que todos los anticuerpos detectados podían unirse de manera competitiva y eficaz al antígeno PDL-1 de una manera dependiente de la dosis.

Ejemplo 13: Determinación de la actividad de unión competitiva del anticuerpo 5C10H2L2 para PDL-1 con B7-1 mediante ELISA competitivo

La capacidad de 5C10H2L2 y el anticuerpo control positivo (HpLp y PCAB) para competir por la unión de PDL-1 con B7-1 (B7-1-hFc, obtenido por el Ejemplo de preparación 3) se determinó mediante ELISA competitivo. La placa de ELISA se recubrió con PDL-1 y se incubó a 4 °C durante una noche. Los pocillos se bloquearon con BSA al 1 % a 37 °C durante 2 horas. Después de eso, el anticuerpo y la PDL-1-mFc se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos lo cual, a continuación, se añadió posteriormente a cada pocillo y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Se añadió un anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón de cabra conjugado con HRP (H+L) (Jackson, 109-035-062). El sustrato TMB (Neogen, 308177) se añadió para la reacción cromógena y se incubó durante 5 minutos. La absorbancia se leyó a 450 nm.

Los resultados de la competición de 5C10H2L2 por la unión de PDL-1 con B7-1 se muestran en la Fig. 23 que 5C10H2L2, HpLp y PCAB pueden competir eficazmente con B7-1 por la unión de PDL-1, la intensidad fluorescente de cada dosis y la eficacia de unión calculada representada por CE₅₀ después de la fijación de curva se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Resultados de ELISA competitivo del anticuerpo 5C10H2L2, HpLp, PCAB y B7-1 en la unión competitiva a PDL-1

Anticuerpo (µg/ml)	Antígeno recubierto: PDL-1-mFc (1 µg/ml)					
	5C10H2L2		HpLp		PCAB	
3 µg/ml	0,583	0,583	0,735	0,683	0,400	0,413
1:3	0,661	0,665	0,731	0,781	0,525	0,581
1:9	0,694	0,699	0,713	0,789	0,606	0,682
1:27	0,798	0,824	0,791	0,853	0,762	0,747
1:81	0,965	0,976	0,988	0,959	0,889	0,906
1:243	1,043	1,052	0,985	1,055	1,031	1,009
1:729	1,064	1,069	0,990	0,986	1,029	1,013
0,000	1,052	0,984	0,955	0,938	1,013	1,036
B7-1-hFc-bio: 0,4 µg/ml						
Anticuerpo secundario	Estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante (SA-HRP) (1:4.000)					
CE ₅₀ (nM)	0,756		0,639 (Competición incompleta*)		1,554	
*Competición incompleta. Se debería indicar que la ventana de datos de HpLp en el experimento de unión competitiva es menor que los otros dos anticuerpos. Como se muestra en la Tabla 7, la disminución de DO no es obvia con el incremento de la concentración de HpLp que empieza desde dilución 1:27 (tal como 1: 9, 1: 3, 3 µg/ml).						

Los resultados indican que todos los anticuerpos determinados pueden competir con B7-1 por la unión de PDL-1, en los cuales la actividad de unión competitiva de 5C10H2L2 es más fuerte que la de PCAB, y la CE₅₀ de 5C10H2L2 es aproximadamente la mitad de la de PCAB. La actividad de unión competitiva de HpLp no incrementa significativamente cuando se incrementa su concentración.

Ejemplo 14: Análisis de la actividad biológica celular de 5C10H2L2 y los anticuerpos de control positivo (HpLp y PCAB)

Para investigar los efectos del anticuerpo monoclonal 5C10H2L2 y el control positivo (HpLp y PCAB) sobre la secreción de IL-2 y IFN-γ en células mononucleares de sangre periférica (PBMC), Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Lote N.º 171440-02) se usó para el aislamiento de PBMC. IL-4 (Peprotech K2513, 1.000 U/ml) y GM-CSF (Peprotech H1513, 1.000 U/ml) se añadieron a las PBMC para la inducción de 6 días. Después de eso, además se añadió TNF-α (Peprotech G1513, 200 U/ml) a las PBMC y las células para la inducción de 3 días para obtener células DC.

Se aislaron linfocitos T a partir de PBMC. Las células DC se mezclaron y se cultivaron con linfocitos T a una tasa de 1:10. Después de 5-6 días de incubación con diferentes concentraciones de anticuerpo 5C10H2L2 (hlgG como control), se llevó a cabo ELISA para evaluar la secreción de IFN-γ (kit comprado a Dakewe Biotech Inc.) y IL-2 (kit

comprado a Dakewe Biotech Inc.).

Los resultados de secreción de IFN- γ y IL-2 a partir de la mezcla de DC y linfocito T se mostraron en la Fig. 24 y la Fig. 25, respectivamente. Los resultados demuestran que 5C10H2L2, HpLp y PCAB podía inducir eficazmente la secreción de IFN- γ y IL-2 de una manera dependiente de la dosis.

Ejemplo 15: Diseño y preparación del anticuerpo monoclonal 5C10H2L2-IgG1mt con la región constante de IgG1 modificada

En la presente divulgación, la región constante de cadena pesada es la región C de la cadena gamma-1 de Ig, Acceso: P01857; la región constante de cadena ligera es la región C de la cadena kappa de Ig, Acceso: P01834. Los aminoácidos en los sitios 234, 235 y 237 por el sistema de número EU se mutaron de la siguiente manera: L234A, L235A y G237A. El anticuerpo mutante se denominó 5C10H2L2-IgG1mt, el cual se preparó mediante el método del Ejemplo 4.

Ejemplo 16: Afinidad dinámica de 5C10H2L2-IgG1mt a Fc γ R11a y C1q determinada por ForteBio

1. La afinidad y la cinética de unión de 5C10H2L2-IgG1mt, Tecentriq® a Fc γ R11a se caracterizaron por ForteBio (comprado a Pall Cat. No. Octet, Qke) de la siguiente manera:

La Fc γ R11a-Biotina purificada se acopló al chip SA recubierto con estreptavidina a través de la unión biotina-estreptavidina usando métodos convencionales y kits proporcionados por ForteBio con condiciones fijadas (1 μ g/ml de Fc γ R11a-Biotina, 300 segundos). El chip se unió por el anticuerpo a concentración de 4.000 nM durante 120 segundos seguido por incubación en PBST (pH 7,4) durante 180 segundos para la disociación. La unión y la curva de disociación se analizaron por el programa informático Octet.

Los resultados se muestran en las Fig. 26A y 26B, que 5C10H2L2-IgG1mt y Tecentriq® no se unían a Fc γ R11a, lo cual indicó que ambos no tenían actividad ADCC.

2. La afinidad y la cinética de unión de 5C10H2L2-IgG1mt, Tecentriq® a C1q (comprado a Fitzgerald, Cat. N.º 32R-AC049) se caracterizaron por ForteBio de la siguiente manera:

El anticuerpo purificado se acopló al chip SA recubierto con estreptavidina a través de la unión biotina-estreptavidina usando métodos convencionales y kits proporcionados por ForteBio con condiciones fijadas (20 μ g/ml de Anticuerpo-Biotina, 300 segundos). A continuación, el chip se unió por C1q a concentración de 200 nM (dilución 1:2) durante 120 segundos seguido por incubación en PBST (pH 7,4) durante 180 segundos para la disociación. La unión y la curva de disociación se analizaron por el programa informático Octet. Para minimizar el efecto de la afinidad sobre la estimación de la constante de unión, solamente se ajustaron el segmento de datos correspondiente al comienzo de la unión y las fases de disociación. Los valores de K_D , K_{on} y K_{off} se muestran en la Tabla 9, y las curvas se muestran en las Figuras 27A y 27B.

Tabla 9: Afinidad dinámica de 5C10H2L2-IgG1mt y Tecentriq® a C1q

Anticuerpo	K_D (M)	K_{on} (1/Ms)	K_{dis} (1/S)
5C10H2L2-IgG1mt	8,53E-09	9,86E+05	8,41E-03
Tecentriq®	1,30E-09	1,36E+06	1,76E-03

Los resultados demuestran que 5C10H2L2-IgG1mt tiene una afinidad dinámica menor que Tecentriq® a C1q.

Ejemplo 17: Actividad CDC de 5C10H2L2-IgG1mt

Las células tumorales PDL-1 positivas HCC1954 (adquiridas de ATCC Cat. N.º CRL-2338) se cultivaron con el correspondiente medio (RPMI1640 + suero bovino al 10 %). Y 5C10H2L2-IgG1mt se diluyó en serie con medio (RPMI1640 + suero humano al 10 %) empezando a 10.000 μ g/ml (dilución 1:5 para 10 gradientes). Las células tumorales anteriormente mencionadas se trataron con tripsina y diversos tubos de células se recogieron y resuspendieron en el correspondiente medio (RPMI1640 + suero humano al 10 %) y, a continuación, se añadieron a la placa de 96 pocillos (10.000 células/pocillo) con diferentes diluciones de anticuerpos durante 5 horas de incubación. Después de eso, se añadió 20 μ l de reactivo CCK8 (comprado a Dongren Chemical Technology Co., Ltd., Cat. N.º CK04, Lote: JJ744) a cada pocillo durante 3 horas de incubación. La absorbancia se leyó a 450 nm por el lector de microplaca (Molecular Devices, Model: SpectraMax M2). La actividad de la deshidrogenasa dentro de la mitocondria refleja la citotoxicidad del anticuerpo a células HCC1954.

Los resultados demuestran que 5C10H2L2-IgG1mt no tiene efecto CDC sobre las células HCC1954.

Ejemplo 18: Efectos de la inhibición tumoral *in vivo* sobre el cáncer de colon

1. Muestras

5C10H2L2-IgG1mt, Tecentriq® y IgG humana fueron proporcionados por Sichuan Kelun Pharmaceutical Research

Institute Co. Ltd. Tecentriq® se compraron a Roche, e IgG humana se compró a Chengdu Rongsheng Pharmaceutical Co., Ltd.

5 Preparación: se diluyeron tres muestras con solución salina que contenía BSA al 0,1 % a las concentraciones deseadas.

Células y animales

10 Se derivaron células MC-38/H-11 de células MC-38 de cáncer de colon de ratón (compradas a Cobioer, Cat.

CBP60825) cuyo PDL-1 de ratón endógeno se inactivó (*knock outed*) por CRISPR/Cas9 y PDL-1 humano se sometió a transfección en las células. Por tanto, las células MC-38/H-11 solamente expresarían la proteína PDL-1 humana.

15 Se compraron ratones C57BL/6, de 7-8 semanas de vida, hembras, a Shanghai Slac Laboratory Animal Co., Ltd.

2. Procedimiento

20 Cada ratón se inoculó subcutáneamente con 1×10^5 células MC-38/H-11 y se agruparon al azar para recibir inyección intraperitoneal (IP) de muestras cada dos días (Q2D) desde el segundo día de la inoculación de tumor (D0). Las dosis de inyección eran de la siguiente manera: IgG humana (15 mg/kg), 5C10H2L2-IgG1mt (1,5, 5, 15 mg/kg) y Tecentriq® (15 mg/kg). Cada grupo tenía 10 ratones con volumen de inyección de 0,1 ml/10 g de peso corporal.

3. Indicadores experimentales

25 Impacto de los fármacos sobre el crecimiento tumoral por T/C% o la inhibición del crecimiento tumoral (TGI) (%).

El diámetro tumoral se midió dos veces por semana con un calibrador vernier. El volumen tumoral (V) se calculó como:

30 $V = 1/2 \times a \times b^2$, en la que a y b representan el largo y el ancho, respectivamente.

T/C% = $T/C \times 100$, en la que C representa el volumen tumoral o el peso tumoral del grupo control, y T representa el volumen tumoral o el peso tumoral del grupo de tratamiento.

35 Inhibición del crecimiento tumoral (TGI) (%) = $(C - T)/C \times 100$, en la que C representa el volumen tumoral o el peso tumoral del grupo control, y T representa el volumen tumoral o el peso tumoral del grupo de tratamiento.

4. Resultados

Mostrados en la Tabla 10 de a continuación.

40 **Tabla 10:** Eficacia de 5C10H2L2-IgG1mt (1,5 mg/kg, 5 mg/kg, y 15 mg/kg) y Tecentriq® a xenoinjertos subcutáneos de cáncer de colon a MC-38/H-11

Grupo/dosis	Volumen tumoral medio (mm ³) D27	T/C (%) D27	Tasa de inhibición del crecimiento tumoral TGI (%)	Volumen tumoral medio (mm ³) D27	Tasa de inhibición del crecimiento tumoral TGI (%)	Peso tumoral medio (g) D27	Tasa de inhibición del crecimiento tumoral TGI (%)	Tasa de formación de tumor (%)
IgG humana (15 mg/kg)	2486,0	-	-	2126,7	-	25,0	-	100,0
5C10H2L2-IgG1 mt (1,5 mg/kg)	898,5	36,1	63,9	0,0	100,0	0,0	100,0	40,0
5C10H2L2-IgG1 mt (5 mg/kg)	600,6	24,2	75,8	0,0	100,0	0,0	100,0	40,0
5C10H2L2-IgG1 mt (15 mg/kg)	780,6	31,4	68,6	0,0	100,0	0,0	100,0	40,0

(continuación)

Grupo/dosis	Volumen tumoral medio (mm ³) D27	T/C (%) D27	Tasa de inhibición del crecimiento tumoral TGI (%)	Volumen tumoral medio (mm ³) D27	Tasa de inhibición del crecimiento tumoral TGI (%)	Peso tumoral medio (g) D27	Tasa de inhibición del crecimiento tumoral TGI (%)	Tasa de formación de tumor (%)
Tecentriq® (15 mg/kg)	867,2	34,9	65,1	132,0	93,8	0,2	93,7	50,0

Nota: Los ratones se agruparon al azar y la primera administración fue el D0. D27 significa el 27º día después de la primera administración.

Las tasas de TGI de 1,5, 5 y 15 mg/kg de 5C10H2L2-IgG1mt sobre los injertos subcutáneos de MC-38/H-11 eran de 63,9 %, 75,8 % y 68,6 %, respectivamente calculadas por el volumen tumoral medio. Dado que la variación individual del tamaño tumoral en cada grupo era muy grande, era razonable usar el volumen tumoral medio para el cálculo de la inhibición del crecimiento tumoral. En esta condición, las tasas TGI eran del 100 %, 100 % y 100 %. El fármaco de referencia Tecentriq® (15 mg/kg) tenía una TGI del 93,8 % (calculada con el volumen tumoral medio). La TGI de 5C10H2L2-IgG1mt (1,5, 5, 15 mg/kg) a MC-38/H-11 eran del 100 %, 100 % y 100 % si se calculaba por el peso tumoral medio. La TGI de Tecentriq® era del 93,7 %. Las TGI calculadas con el volumen tumoral medio y el peso tumoral medio son altamente consistentes, indicando la fiabilidad del cálculo mediante el volumen tumoral. 5C10H2L2-IgG1mt (1,5, 5, 15 mg/kg) no solamente inhibió el crecimiento tumoral sino también inhibió la tumorigénesis. Al final del experimento (D27), la tasa de incidencia tumoral de 1,5, 5, 15 mg/kg de 5C10H2L2-IgG1mt eran del 40 %, 40 % y 40 %, respectivamente. La tasa de incidencia tumoral del grupo de Tecentriq® era del 50 %. Todos los fármacos son bien tolerados en los ratones portadores de tumor con pérdida de peso no significativa ni otros síntomas observados. En comparación con Tecentriq®, 5C10H2L2-IgG1mt (1,5, 5, 15 mg/kg) tenía efecto antitumoral más fuerte sobre el modelo de trasplante subcutáneo de célula de cáncer de colon MC-38/H-11.

Ejemplo 19: Efectos de la inhibición del tumor *in vivo* sobre el cáncer de pulmón

Método del modelado en animales: Se inocularon subcutáneamente ratones NOG con células de cáncer de pulmón no microcítico HCC827 (adquiridas de ATCC Cat. N.º CRL-2868). Cuando el volumen tumoral alcanzó 100 mm³, a continuación, los ratones se inyectaron intravenosamente con PBMC humanas activadas para imitar el sistema inmunitario humano antes de la administración.

Esquema de dosificación: 10 mg/kg, inyección intravenosa, una vez cada dos días, un total de 4 veces. El volumen tumoral se midió dos veces por semana después de la administración. Los ratones se dividieron en tres grupos: control (IgG), 5C10H2L2-IgG1mt y Tecentriq®, cada grupo con 6 ratones.

La curva del crecimiento tumoral se muestra en la Fig. 28.

Los resultados mostraron que el volumen tumoral del grupo de 5C10H2L2-IgG1mt era obviamente menor que el del grupo de Tecentriq® y el grupo control de IgG desde el día 4. El crecimiento tumoral del grupo de 5C10H2L2-IgG1mt se inhibió casi completamente. Por el contrario, los tumores en el grupo de Tecentriq® y el grupo control de IgG crecieron continuamente. Los resultados demostraron que el anticuerpo de la presente divulgación tenía un efecto antitumoral *in vivo* más fuerte que Tecentriq®.

Aunque se han descrito con detalle realizaciones específicas de la presente divulgación, los expertos en la técnica lo apreciarán. Según todos los detalles que se han descrito, se pueden realizar diversas modificaciones y sustituciones a estos detalles, las cuales están dentro del alcance de la presente divulgación. El alcance completo de la invención está dado por las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SICHUAN KELUN-BIOTECH BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> UN ANTICUERPO DE PDL-1, COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA DEL MISMO Y SU USO

<130> IEC150063PCT

<150> 201610122117,6

<151> 04/03/2016

<160> 40

ES 2 801 873 T3

<170> PatentIn versión 3.2

5 <210> 1
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica VH del anticuerpo 5C10

<400> 1

```

caggtgcaac tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagaa cctgtccatt      60
acctgcaactg tctctggggtt ctcatthaagc aactatgata taagctggat tcgccagcca    120
ccaggaaagg gtctggagtg gctcggagta atatggactg gtggagccac aaattataat      180
tcagctttca tgtccagact gagcatcagt agggacaact ccaagagcca agttttctta     240
aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatatatt actgtgtgag agattcgaac      300
tataggtacg acgagccgtt tacttactgg ggccaagggga ctctggtcac tgtctctgca     360
  
```

15 <210> 2
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de VH del anticuerpo 5C10

<400> 2

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

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

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

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

ES 2 801 873 T3

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

5 <210> 3
<211> 318
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Secuencia de nucleótidos que codifica VL del anticuerpo 5C10
<400> 3

gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga aagagtcagt 60
ctctcctgca gggccagtc gagcattggc acaaacatac actggtttca gcaaagaaca 120
aatggttctc caaggcttct cataaagtat gcttctgagt ctatctctgg gatcccttcc 180
aggtttagtg gcagtggatc agggacagat ttactctta gcatcaacag tgtggagtct 240
gaagatattg cagattacta ctgtcaacaa agtaatagct ggccgtacac gttcggaggg 300
gggaccaagc tggaaata 318

15 <210> 4
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de VL del anticuerpo 5C10
<400> 4

ES 2 801 873 T3

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

Glu Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30

Ile His Trp Phe Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr
 85 90 95

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

5 <210> 5
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de VH del anticuerpo 5C10H1L1
 <400> 5

caggtccagc tgcaggagtc aggcccccggc ctggtgaagc ccagtgagaa cctgtcaatc 60
 acctgcacag tctctggctt ctactgagc aattacgaca tcagttggat tcgacagccc 120
 cctggaaagg gcctggaatg gctgggcgtg atctggacag gcggggcaac taactataat 180
 ccagccttta aaagccggct gaccatttcc agagacaact ccaagtctca ggtgtctctg 240
 aaaatgagct ccctgcaggc cgctgatacc gctgtgtact attgtgtcag ggacagcaat 300
 taccgctatg atgagccctt cacatactgg gggcagggaa ctctggtgac cgtctctagt 360

15
 20 <210> 6
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de VH del anticuerpo 5C10H1L1
 25 <400> 6

ES 2 801 873 T3

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 7
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica VL del anticuerpo 5C10H1L1
 <400> 7

gaaatcgtgc tgacacagag ccctgacaca ctgagcgtga ctcccaagga gaaagtcacc 60
 ctgacatgcc gggcatcaca gagcatogga acaaacattc actggttcca gcagagacca 120
 ggccagagcc ccaagctgct gatcaaatac gcctccgaat ctatcagtgg cattccttcc 180
 cgattctcag gcagcgggtc cggaaccgac ttactctga ccattaactc tgtggaggct 240
 gaagatgccg ctacatacta ttgccagcag tctaatagtt ggccttatac cttcggccag 300
 gggacaaagc tggagatcaa a 321

15 <210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de VL del anticuerpo 5C10H1L1

25 <400> 8

ES 2 801 873 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Thr Leu Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Val Glu Ala

65 70 75 80

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

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

5

<210> 9
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica VH del anticuerpo 5C10H2L2

15

<400> 9

cagggtccagc tgcaggagtc cggccccggc ctggtgaagc cctccgagac actgtctatc 60
 acctgcacag tcagcggctt ctactgagc aactacgaca tctcctggat tcgacagccc 120
 cctggaaagg gcctggaatg gctgggcgtg atctggacag gcggggcaac taactataat 180
 ccagccctga aatctcggct gactattagt agagacaact caaagaatca ggtgtccctg 240
 aaaatgagct ccgtcaccgc cgctgatata gctgtgtact attgtgtcag ggacagcaat 300
 taccgctatg atgagccctt tacctactgg gggcagggaa ctctggtgac cgtctctagt 360

20

<210> 10
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

25

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de VH del anticuerpo 5C10H2L2
 <400> 10

ES 2 801 873 T3

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 11
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica VL del anticuerpo 5C10H2L2
 <400> 11

gaaatcgtgc tgacacagtc tcctgatacc ctgagcgtga ctcccaagga gaaagtcacc 60
 ctgacatgca gggcatcaca gagcatcgga acaaacattc actggttcca gcagaagcca 120
 ggccagagcc ccaagctgct gatcaaatac gcctccgaat ctattagtgg agtgccttcc 180
 cgcttctcag gcagcgggtc cggaaccgac tttactctga ccatcaactc tgtggaggct 240
 gaagatgccg ctacatacta ttgccagcag tctaatagtt ggccttatac cttcggccag 300
 gggacaaaagc tggagatcaa a 321

15 <210> 12
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de VL del anticuerpo 5C10H2L2

25 <400> 12

ES 2 801 873 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Thr Leu Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

5 <210> 13
 <211> 870
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> La secuencia de ADN de PDL-1

<400> 13

ES 2 801 873 T3

```

atgaggattt tcgccgtctt tatctttatg acctactggc atctgctgaa cgcttttact      60
gtgaccgtcc ccaaggatct gtatgtggtg gagtacggaa gcaacatgac tatcgagtgc      120
aagttccccg tggaaaaaca gctggacctg gccgctctga ttgtctattg ggagatggaa      180
gataagaata tcattcagtt tgtgcacggc gaggaagacc tgaaagtcca gcatagctcc      240
tacaggcagc gcgcccgact gctgaaggat cagctgtccc tggggaacgc agccctgcag      300
atcaccgacg tgaaactgca ggatgctgga gtctacaggt gcatgatctc ttacggcggg      360
gctgattata agcgcattac agtgaaagtc aatgcacctt ataacaagat caatcagaga      420
attctggtgg tcgaccagc gaccagtggc cacgaactga catgtcaggc tgagggctac      480
ccaaggcag aagtgatctg gacctctagt gatcatcagg tcctgtcagg gaaaaccaca      540
actaccaaca gcaagcgaga ggaaaaactg ttcaatgtga catccactct gaggatcaac      600
acaactacca atgagatttt ctattgcaact ttctggagac tggaccctga ggaaaaccac      660
accgcagagc tggatcatccc agaactgccca ctggcacacc cacctaatga gcgaacacac      720
ctggtcatcc tgggagccat tctgctgtgc ctgggcgtcg ctctgacttt cttttttcgg      780
ctgagaaagg ggcggatgat ggacgtgaaa aagtgtggca ttcaggatac taactcaaaa      840
aagcagtccg ataccatctt ggaagaaacc                                     870

```

<210> 14
 <211> 290
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> La secuencia de aminoácidos de PDL-1

10

<400> 14

```

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

```

ES 2 801 873 T3

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

ES 2 801 873 T3

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

Glu Thr
 290

5 <210> 15
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> HCDR1
 <400> 15

Gly Phe Ser Leu Ser Asn Tyr Asp
 1 5

15 <210> 16
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> HCDR2
 <400> 16

Ile Trp Thr Gly Gly Ala Thr
 1 5

25
 30 <210> 17
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> HCDR3
 35 <400> 17

Val Arg Asp Ser Asn Tyr Arg Tyr Asp Glu Pro Phe Thr Tyr
 1 5 10

40 <210> 18
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> LCDR1
 <400> 18

Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 1 5

50

ES 2 801 873 T3

5
 <210> 19
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> LCDR2

10
 <400> 19

Tyr Ala Ser
 1

15
 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

20
 <220>
 <223> LCDR3

<400> 20

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr Thr
 1 5

25
 <210> 21
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Artificial

30
 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de VH del anticuerpo 5F10

<400> 21

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

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

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

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

Gln Asp Lys Thr Thr Ile Thr Thr Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala His
 65 70 75 80

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

35

ES 2 801 873 T3

Ala Arg Gly Leu Gly Ala Trp Phe Ala Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ala
115

5 <210> 22
<211> 351
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Secuencia de nucleótidos que codifica VL del anticuerpo 5F10
<400> 22

gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtgaagc caggggcctc agtcaagttg 60
tcctgcacag cttctggctt cgacattaaa gacacctata tccactgggt gaagcagagg 120
cctgaacagg gcctggagtg gattggaagg attgatcctg cggacggtaa tactaggtat 180
gacccgaagt tccaggacaa gaccactata acaaccgaca catcctccaa cacagcccac 240
ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgc tagaggcctc 300
ggagcttggg ttgcttcctg gggccaaggg actctgggtca ctgtctctgc a 351

15 <210> 23
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de VL del anticuerpo 5F10
<400> 23

ES 2 801 873 T3

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Pro
 85 90 95

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

- 5 <210> 24
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Artificial
- 10 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica VL del anticuerpo 5F10
 <400> 24
 gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60
 atcagttgca gggcaagtca ggacattacc aattccttaa actggtatca gcagaaacca 120
 gatggaactg ttaaactcct gatccactac acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240
 gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtcatacgc ttcctccgac gttcgggtgga 300
- 15 ggcaccaagc tggaaatc 318
 <210> 25
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 20 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de VH del anticuerpo 9F6
- 25 <400> 25

ES 2 801 873 T3

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

100

105

110

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

5 <210> 26
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica VH del anticuerpo 9F6
 <400> 26

gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtgaagc caggggcctc agtcaagttg 60
 tcctgcacag cttctggctt caacattaa gacacctata tgtactgggt gaagcagagg 120
 cctgaacagg gcctggagtg gattggaagg attgatcctg cgaatggtaa tactaaatat 180
 gaccgaagt tccagggcaa ggccactata acagcagaca catccgcaa cacagcctac 240
 ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgttc tagaggccct 300
 ccaggaggta tcggcgagta tatctatgct atggactact ggggtcaagg aacctcagtc 360
 accgtctcct ca 372

15
 <210> 27
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20

ES 2 801 873 T3

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de VL del anticuerpo 9F6

5 <400> 27

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

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
35 40 45

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

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

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

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

10

<210> 28

<211> 321

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos que codifica VL del anticuerpo 9F6

<400> 28

20

caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctctagggga acgggtcacc 60
atgacctgca ctgccagctc aagtgtaagt tccagttact tgcactggta ccagcagaag 120
ccaggatcct cccccaaact ctggatttat agcacatcca acctggcttc tggagtccca 180
gctcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagcatggag 240
gctgaagatg ctgccactta ttactgccac cagtatcatc gttccccacc cacgttcggt 300
ggaggacca agctggaat c 321

25

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> HCDR1

ES 2 801 873 T3

<400> 29

Gly Phe Asp Ile Lys Asp Thr Tyr
1 5

5

<210> 30
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> HCDR2

<400> 30

15

Ile Asp Pro Ala Asp Gly Asn Thr
1 5

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

20

<220>
<223> HCDR3

25

<400> 31

Ala Arg Gly Leu Gly Ala Trp Phe Ala Ser
1 5 10

30

<210> 32
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

35

<220>
<223> LCDR1

<400> 32

Gln Asp Ile Thr Asn Ser
1 5

40

<210> 33
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial

45

<220>
<223> LCDR2

50

<400> 33

Tyr Thr Ser
1

55

<210> 34
<211> 9

ES 2 801 873 T3

<400> 38

Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5

5

<210> 39
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> LCDR2

15

<400> 39

Ser Thr Ser
1

20

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

25

<220>
<223> LCDR3
<400> 40

His Gln Tyr His Arg Ser Pro Pro Thr
1 5

ÿ

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde, dicho anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 tiene una región variable de cadena pesada que comprende una HCDR1 como se expone en SEQ ID NO: 15, una HCDR2 como se expone en SEQ ID NO: 16, y una HCDR3 como se expone en SEQ ID NO: 17, y tiene una región variable de cadena ligera que comprende una LCDR1 como se expone en SEQ ID NO: 18, una LCDR2 como se expone en SEQ ID NO: 19, y una LCDR3 como se expone en SEQ ID NO: 20.
2. El anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en donde, la región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 10, y la región variable de cadena ligera de dicho anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 12.
3. El anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 o 2, en donde, la región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y la región variable de cadena ligera de dicho anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; la región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y la región variable de cadena ligera de dicho anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; la región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y la región variable de cadena ligera de dicho anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; la región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, y la región variable de cadena ligera de dicho anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; o la región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, y la región variable de cadena ligera de dicho anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.
4. El anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo se seleccionan de Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, anticuerpo monocatenario, anticuerpo humanizado, anticuerpo quimérico, o diacuerpo.
5. El anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, es un anticuerpo de cadena sencilla, en donde el anticuerpo de cadena sencilla es un scFv.
6. El anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo se unen a PDL-1 con un valor de CE₅₀ menor que 100 nM, determinado por el método de ELISA indirecto.
7. El anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde: el anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo comprenden una región no CDR, en donde la región no CDR se deriva de un anticuerpo de una especie distinta de murina.
8. El anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde: el anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo comprenden una región no CDR, en donde la región no CDR se deriva de un anticuerpo humano.
9. El anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo comprenden una región constante, en donde la región constante se selecciona de una región constante de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana.
10. El anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo comprenden una región constante, en donde la región constante es una región constante de IgG1 humana mutada.
11. El anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en donde el anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo comprenden una región constante de IgG1 humana mutada, y en donde la región constante de IgG1 humana mutada comprende una mutación N297A en la región constante de cadena pesada de acuerdo con el sistema de numeración

EU.

- 5 12. El anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en donde el anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo comprenden una región constante de IgC1 humana mutada, en donde la región constante de IgG1 humana mutada tiene una o más mutaciones en las posiciones 234, 235 y 237 en la región constante de cadena pesada de acuerdo con el sistema de numeración EU, y en donde se baja la afinidad dinámica del anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo a FcγRIIIa y/o C1q.
- 10 13. El anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de las reivindicaciones 7 a 11, en donde el anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo comprenden una región constante de IgC1 humana mutada, en donde la región constante de IgG1 humana mutada tiene 1, 2 o 3 mutaciones en las posiciones 234, 235 y 237 en la región constante de cadena pesada de acuerdo con el sistema de numeración EU seleccionadas de: L234A, L235A y G237A.
- 15 14. El anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, en donde la mutación comprendida en la región constante de IgG1 humana reduce la actividad ADCC y/o la actividad CDC del anticuerpo anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 20 15. El anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 es producido por la cepa de célula hibridoma LT005, y la cepa de célula hibridoma LT005 está depositada en el "China Center for Type Culture Collection" (CCTCC), y el número de acceso es CCTCC NO: C2015133.
- 25 16. Una molécula de ácido nucleico aislada, que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo monoclonal, y una molécula de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera de dicho anticuerpo monoclonal, en donde:
- 30 la región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo monoclonal comprende una HCDR1 como se expone en SEQ ID NO: 15, una HCDR2 como se expone en SEQ ID NO: 16, y una HCDR3 como se expone en SEQ ID NO: 17; y la región variable de cadena ligera de dicho anticuerpo monoclonal comprende una LCDR1 como se expone en SEQ ID NO: 18, una LCDR2 como se expone en SEQ ID NO: 19, y una LCDR3 como se expone en SEQ ID NO: 20.
- 35 17. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 16, en donde:
- la molécula de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo monoclonal codifica una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 10; y
- 40 la molécula de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera de dicho anticuerpo monoclonal codifica una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 12.
18. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 16, en donde:
- 45 la molécula de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo monoclonal comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 9; y
- la molécula de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera de dicho anticuerpo monoclonal comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 11.
- 50 19. La molécula de ácido nucleico aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, que comprende además un enlazador para conectar la molécula de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo monoclonal y la molécula de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera de dicho anticuerpo monoclonal.
- 55 20. Un vector, que comprende la molécula de ácido nucleico aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19.
21. Una célula hospedadora, que comprende la molécula de ácido nucleico aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19 o el vector de la reivindicación 20.
- 60 22. Un método para preparar el anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende las siguientes etapas: cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 21 bajo condiciones adecuadas, y recuperar el anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo a partir del cultivo de la célula hospedadora.
- 65 23. Una cepa de célula hibridoma LT005, depositada en el "China Center for Type Culture Collection" (CCTCC) con un número de acceso de CCTCC N.º: C2015133.

24. Un conjugado, que comprende un anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y una parte de acoplamiento, en donde la parte de acoplamiento es un marcador detectable.
- 5 25. Un conjugado de la reivindicación 24, en el que el marcador detectable es un isótopo radioactivo, una sustancia fluorescente, una sustancia luminiscente, un material coloreado o una enzima.
- 10 26. Un conjugado de anticuerpo bifuncional, que comprende un anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y una parte conjugada, en donde la parte conjugada es un segundo fragmento funcional biológico.
- 15 27. Un conjugado de anticuerpo bifuncional de la reivindicación 26, en el que el segundo fragmento funcional biológico tiene actividad de unión y es una proteína, un polietilenglicol (PEG), un nucléido, un ácido nucleico, una toxina de molécula pequeña, un receptor o un ligando.
- 20 28. Un anticuerpo multiespecífico, que comprende un conjugado que comprende un primer anticuerpo o un fragmento del mismo, y un anticuerpo adicional o un fragmento del mismo o un anticuerpo mimético, en donde el primer anticuerpo o un fragmento del mismo, el anticuerpo adicional o un fragmento del mismo o el mimético de anticuerpo conserva la especificidad de unión original, en donde el primer anticuerpo o un fragmento del mismo es un anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
- 25 29. Un anticuerpo multiespecífico según la reivindicación 28, en donde el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo trispecífico o un anticuerpo tetraespecífico.
- 30 30. Un kit, que comprende el anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, el conjugado de las reivindicaciones 24 o 25, el conjugado de anticuerpo bifuncional de las reivindicaciones 26 o 27 o el anticuerpo multiespecífico de las reivindicaciones 28 o 29.
- 35 31. Un kit según la reivindicación 30, en donde el kit además comprende un anticuerpo secundario que reconoce específicamente el anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
32. Un kit según la reivindicación 31, en el que el anticuerpo secundario está marcado con un marcador detectable.
33. Un kit según la reivindicación 32, en el que el marcador detectable es un isótopo radioactivo, una sustancia fluorescente, una sustancia luminiscente, una sustancia coloreada o una enzima
- 40 34. El uso del anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o de un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, o el conjugado de las reivindicaciones 24 o 25, o el conjugado de anticuerpo bifuncional de las reivindicaciones 26 o 27, o el anticuerpo multiespecífico de las reivindicaciones 28 o 29 en la fabricación de un kit, en donde el kit se usa para detectar la existencia o el nivel de PDL-1 en una muestra.
- 45 35. Una composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, o el conjugado de las reivindicaciones 24 o 25, o el conjugado de anticuerpo bifuncional de las reivindicaciones 26 o 27 o el anticuerpo multiespecífico de las reivindicaciones 28 o 29.
- 50 36. Una composición farmacéutica según la reivindicación 35, que además comprende un portador y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.
- 55 37. El anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, o el conjugado de las reivindicaciones 24 o 25, o el conjugado de anticuerpo bifuncional de las reivindicaciones 26 o 27 o el anticuerpo multiespecífico de las reivindicaciones 28 o 29, para su uso en la profilaxis, el tratamiento, el tratamiento con adyuvante o el diagnóstico de un tumor o de una anemia.
- 60 38. El anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o el conjugado, o el conjugado de anticuerpo bifuncional o el anticuerpo multiespecífico para su uso según la reivindicación 37, en donde dicho tumor se selecciona de cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, glioma, melanoma, y leucemia.
- 65 39. El anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o el conjugado, o el conjugado de anticuerpo bifuncional o el anticuerpo multiespecífico para su uso según la reivindicación 38, en donde dicho cáncer de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico.

40. El anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o el conjugado, o el conjugado de anticuerpo bifuncional o el anticuerpo multiespecífico para su uso según la reivindicación 38, en donde dicho cáncer colorrectal es cáncer de colon o cáncer rectal.

5

41. El anticuerpo monoclonal anti-PDL-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o el conjugado de las reivindicaciones 24 o 25, o el conjugado de anticuerpo bifuncional de las reivindicaciones 26 o 27 o el anticuerpo multiespecífico de las reivindicaciones 28 o 29, para su uso en:

10

- a) el bloqueo de la unión de PDL-1 a PD-1 o a B7-1;
- b) la regulación por disminución de la actividad de PDL-1 o el nivel de PDL-1;
- c) la eliminación de la inmunosupresión por PD-1 o PDL-1; o
- d) el aumento de la expresión de IFN- γ y/o IL-2 por un linfocito T.

15

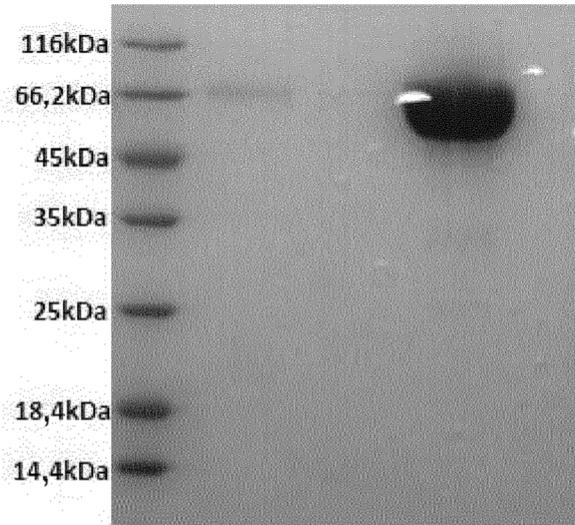


FIG. 1

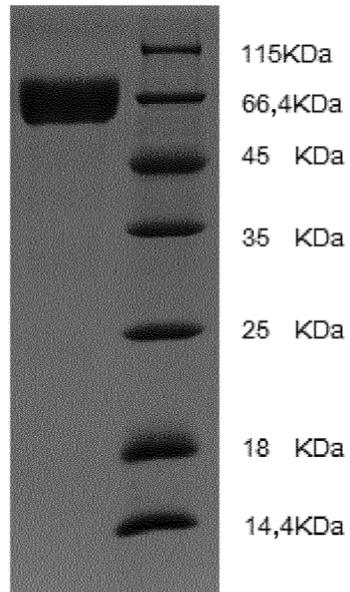


FIG. 2

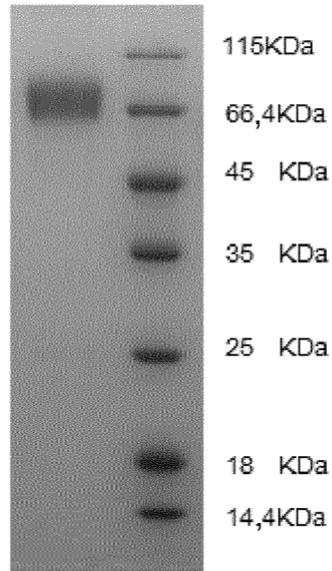


FIG. 3

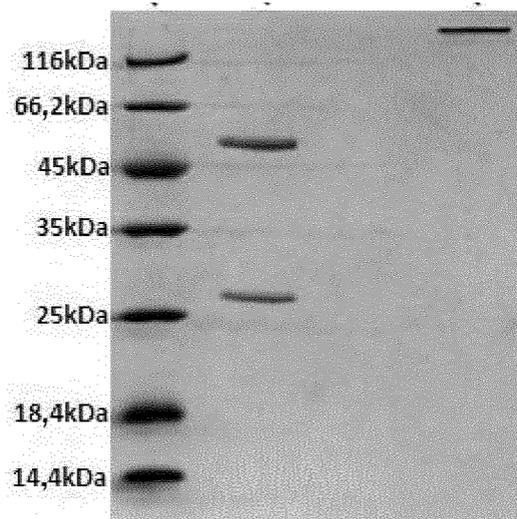


FIG. 4

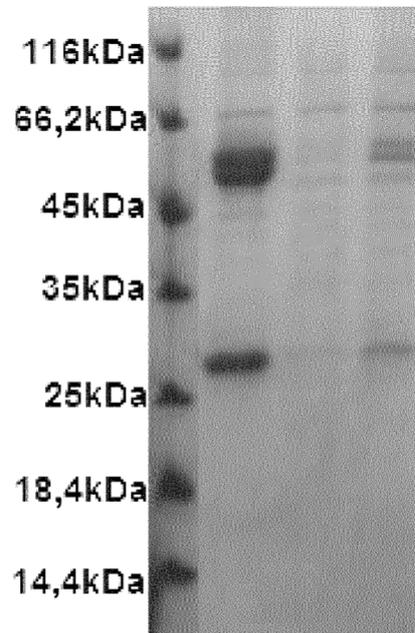


FIG. 5

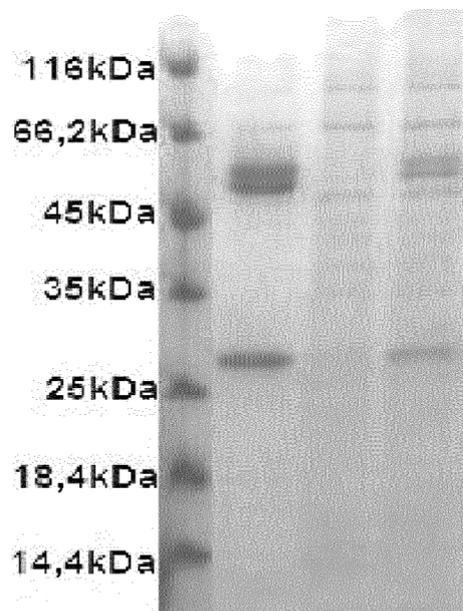


FIG. 6

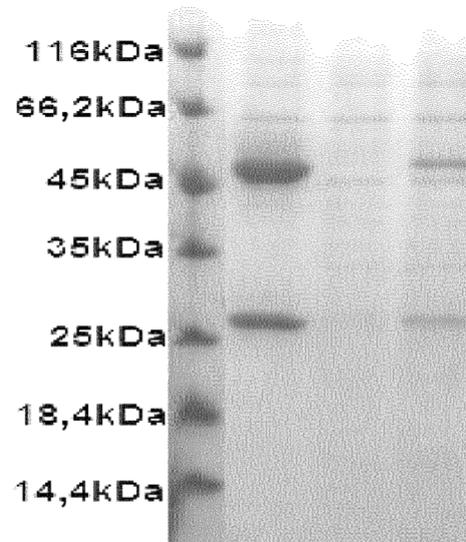


FIG. 7

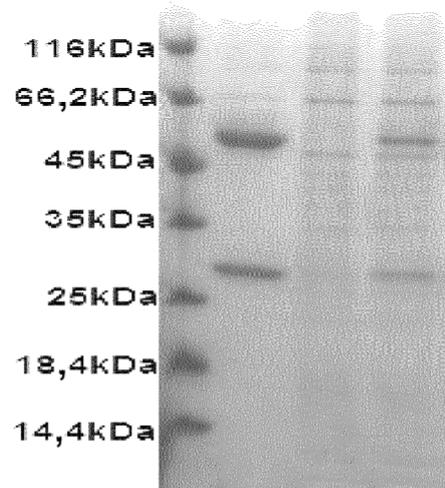


FIG. 8

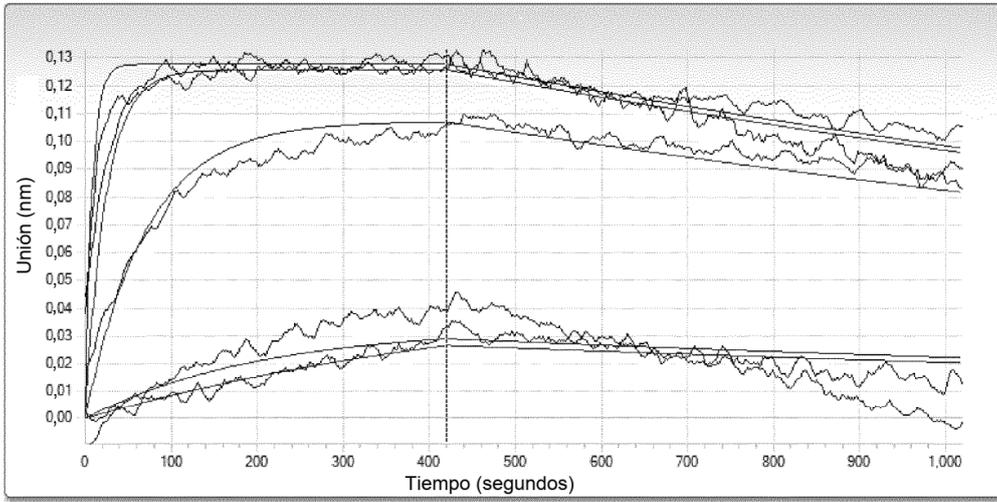


FIG. 9

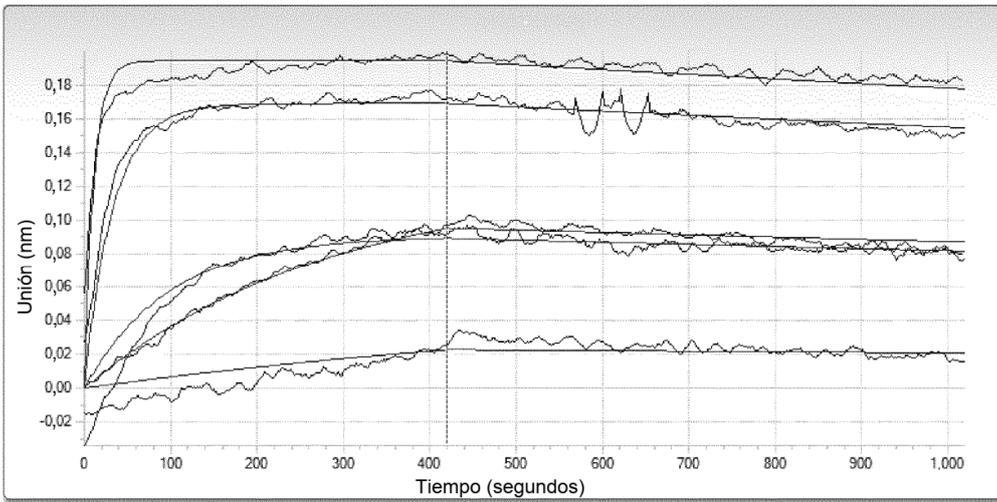


FIG. 10

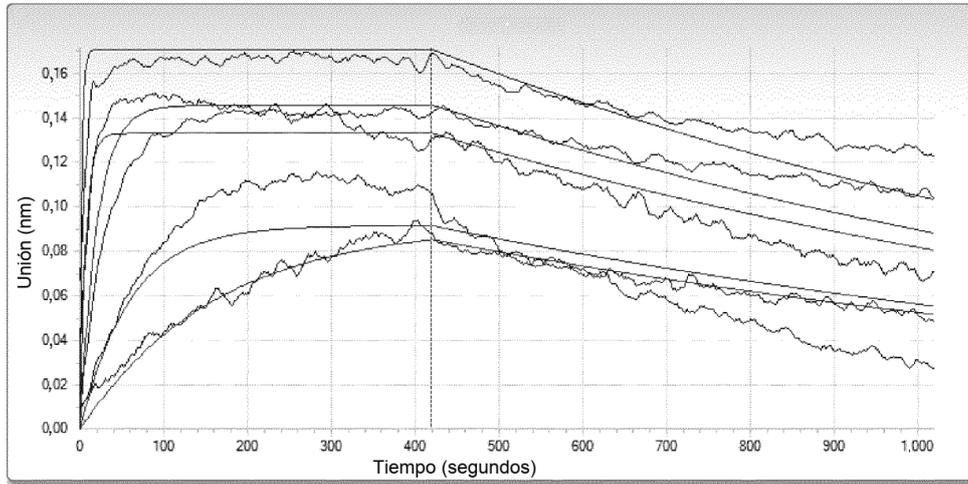
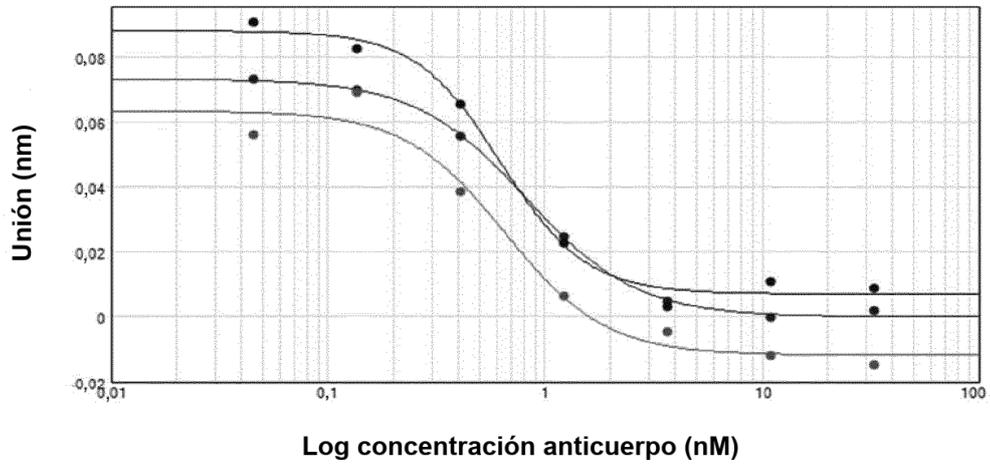


FIG. 11



- 5C10 Valores vs Concentra...)
- 5C10 H2L2 (5C10 H2L2: Valores vs Concentra...)
- HpLp (HpLp: Valores vs Concentra...)

Resultados ajuste curva ▲

Ajuste curva: 4-Parámetro $y = D + \frac{A - D}{1 + (\frac{x}{C})^B}$

	Parámetro	Valor estimado	Error Estánd.	Intervalo de confianza
5C10 $R^2 = 0,999$ CE50 = 0,817	A	0,078	0,001	[0,074, 0,081]
	B	1,704	0,115	[1,337, 2,071]
	C	0,817	0,037	[0,699, 0,935]
	D	0,004	8,89e-4	[0,001, 0,007]
5C10 H2L2 $R^2 = 0,975$ CE50 = 0,654	A	0,068	0,007	[0,045, 0,090]
	B	1,880	0,749	[-0,503, 4,262]
	C	0,654	0,168	[0,118, 1,190]
	D	-0,008	0,005	[-0,024, 0,009]
HpLp $R^2 = 0,993$ CE50 = 0,625	A	0,092	0,004	[0,080, 0,104]
	B	2,208	0,471	[0,710, 3,705]
	C	0,625	0,079	[0,375, 0,875]
	D	0,011	0,003	[0,002, 0,020]

FIG. 12

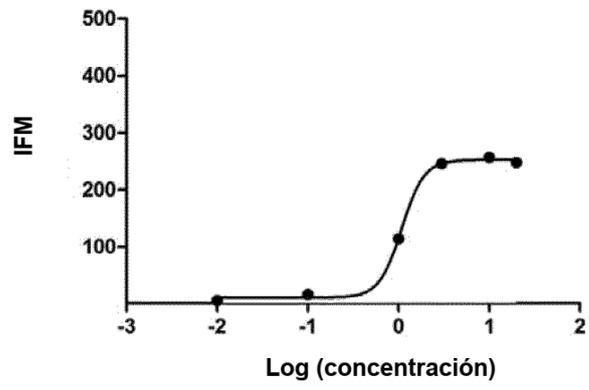


FIG. 13

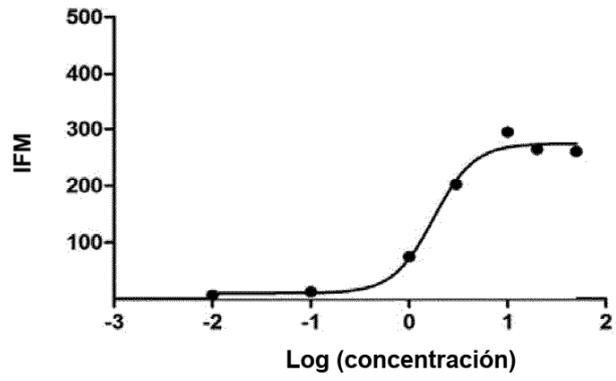


FIG. 14

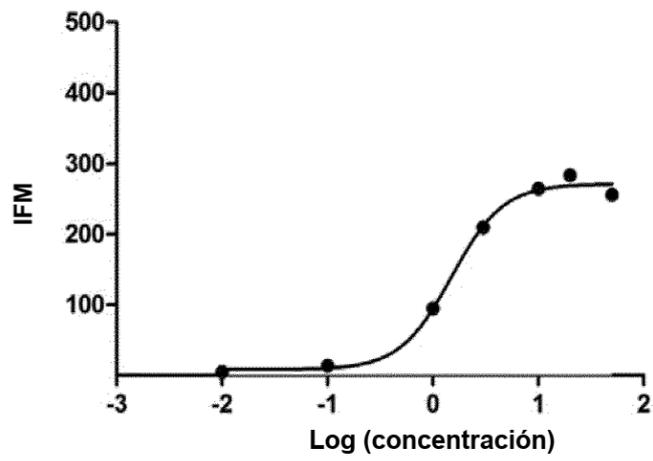


FIG. 15

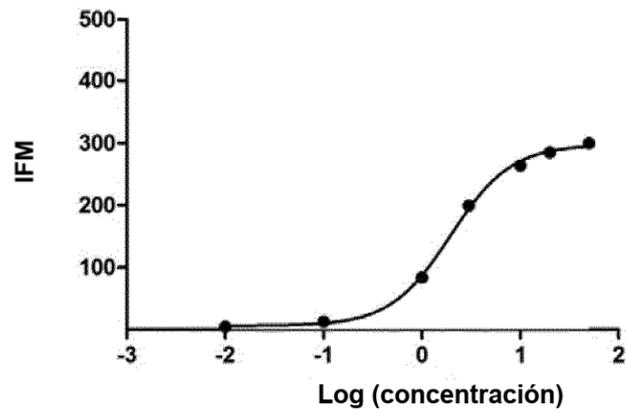


FIG. 16

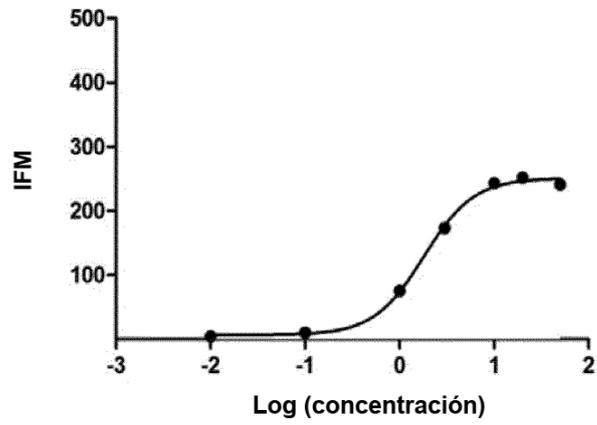


FIG. 17

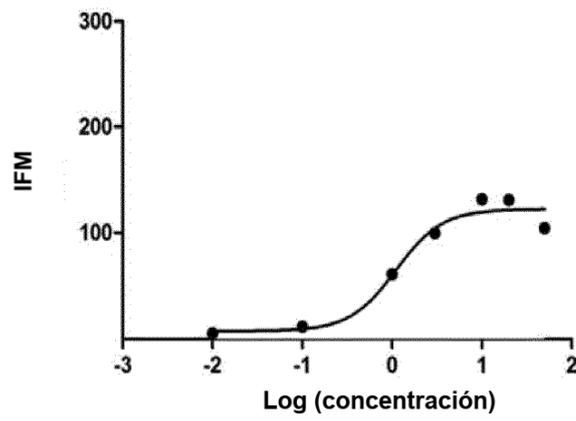
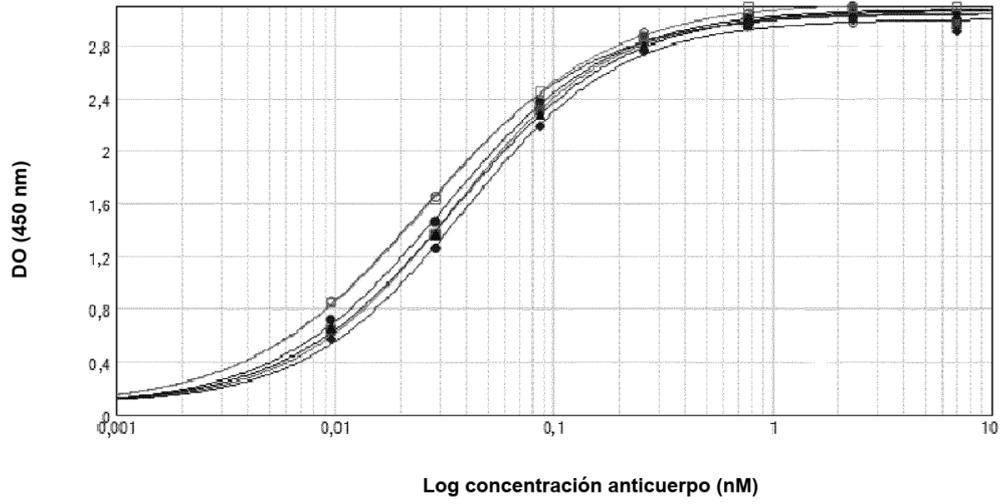
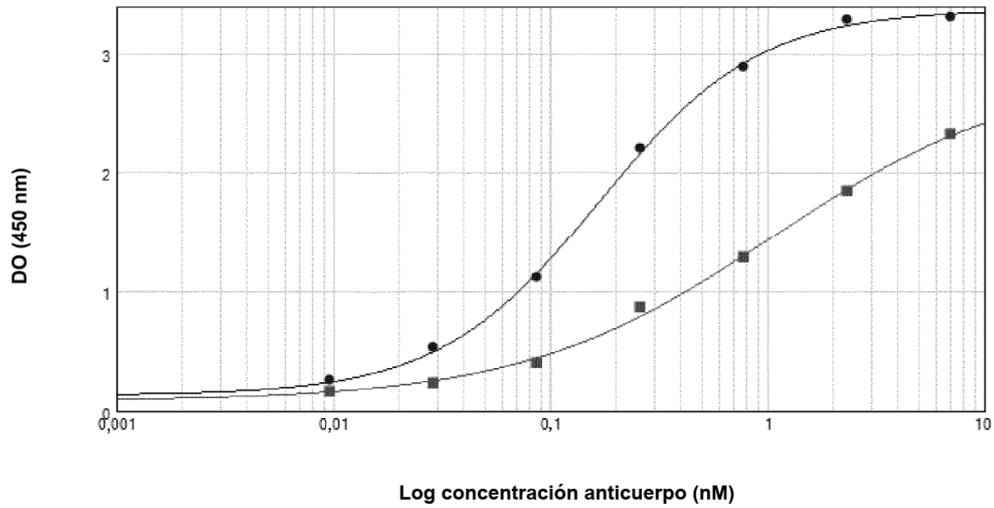


FIG. 18



- 5C10 H1L1 (5C10 H1L1: ValMed... vs Concentra...)
- 5C10 H2L2 (5C10 H2L2: ValMed... vs Concentra...)
- ▲ 5C10 H1L2 (5C10 H1L2: ValMed... vs Concentra...)
- ◆ 5C10 H2L1 (5C10 H2L1: ValMed... vs Concentra...)
- Hplp (Hplp: ValMed... vs Concentra...)
- PCAB (PCAB: ValMed... vs Concentra...)

FIG. 19



- 5C10 H2L2 (5C10 H2L2: ValMed... vs Concentra...)
- Hplp (Hplp: ValMed... vs Concentra...)

FIG. 20

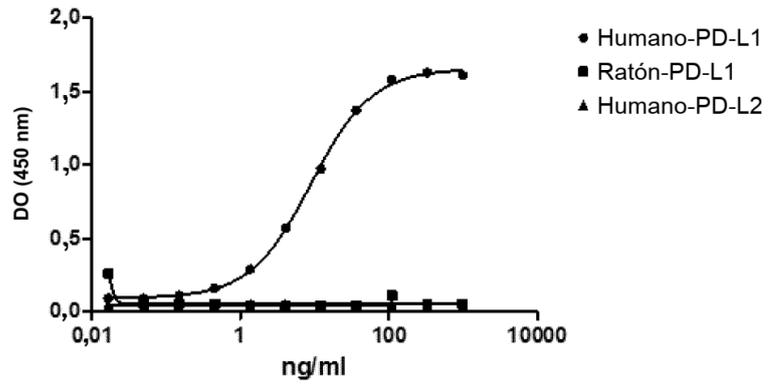
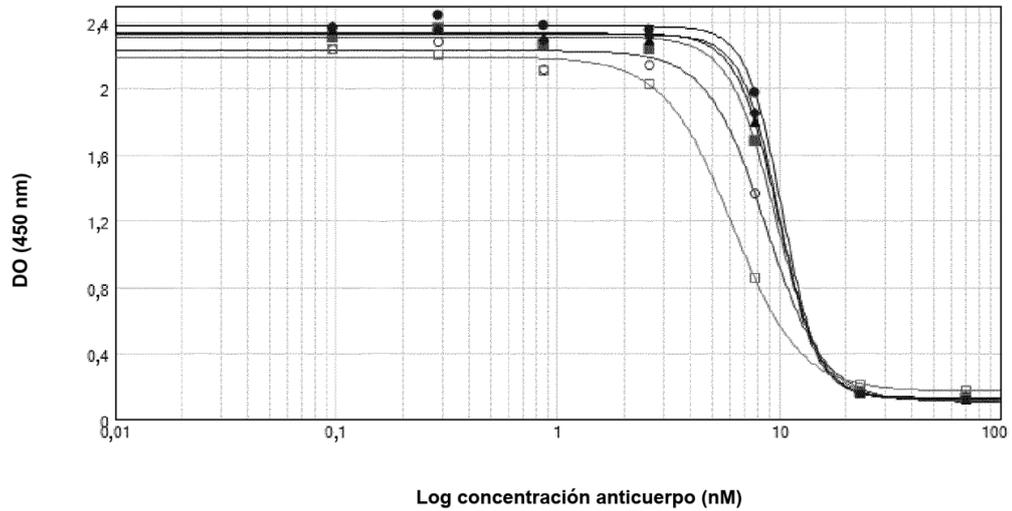


FIG. 21



Log concentración anticuerpo (nM)

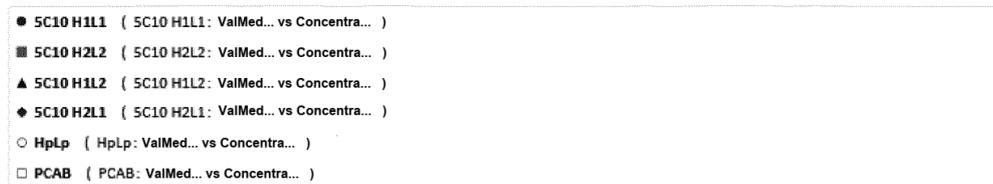


FIG. 22

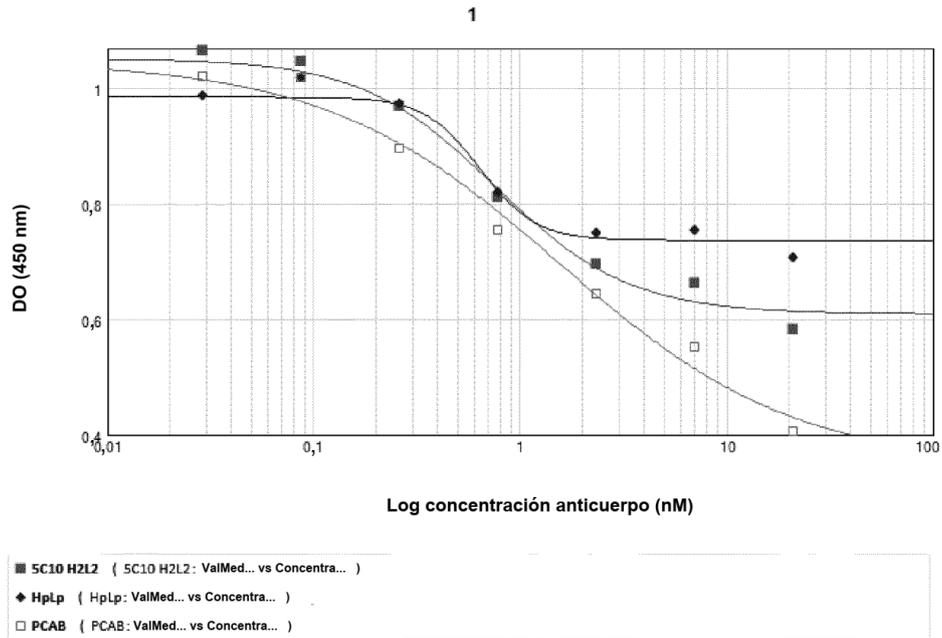


FIG. 23

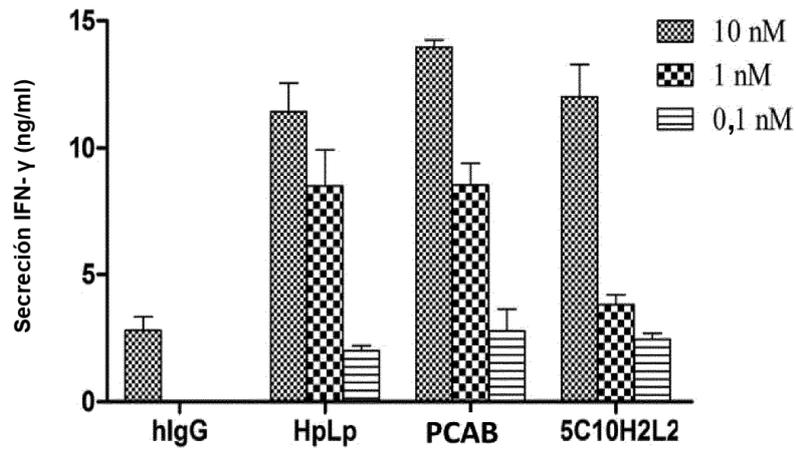


FIG. 24

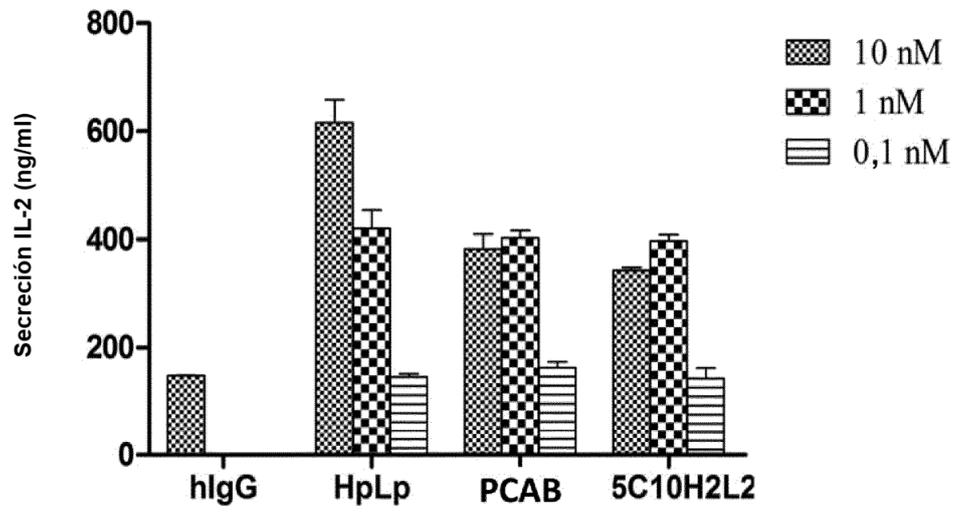


FIG. 25

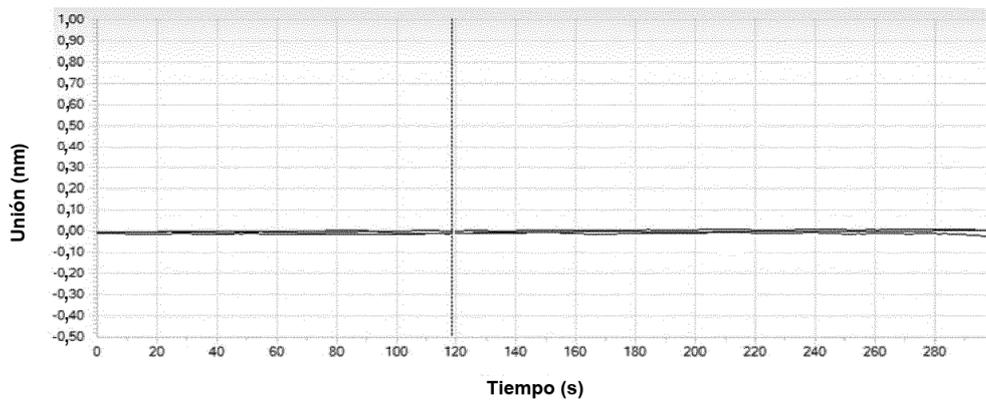


FIG. 26A

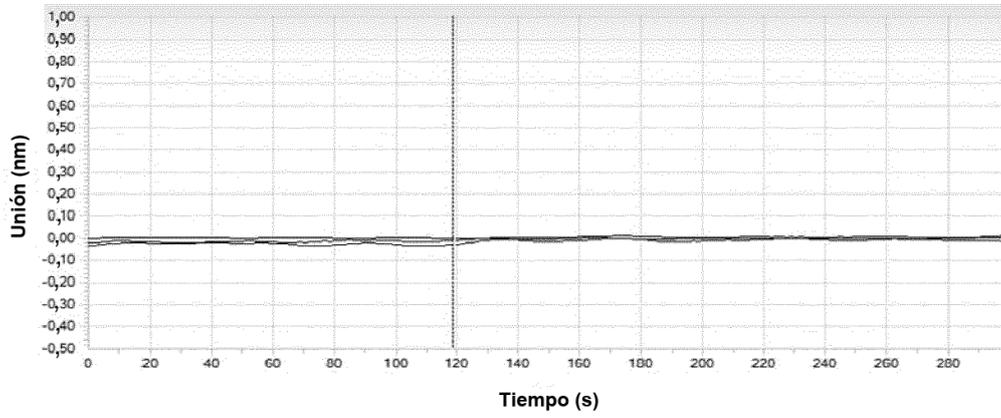


FIG. 26B

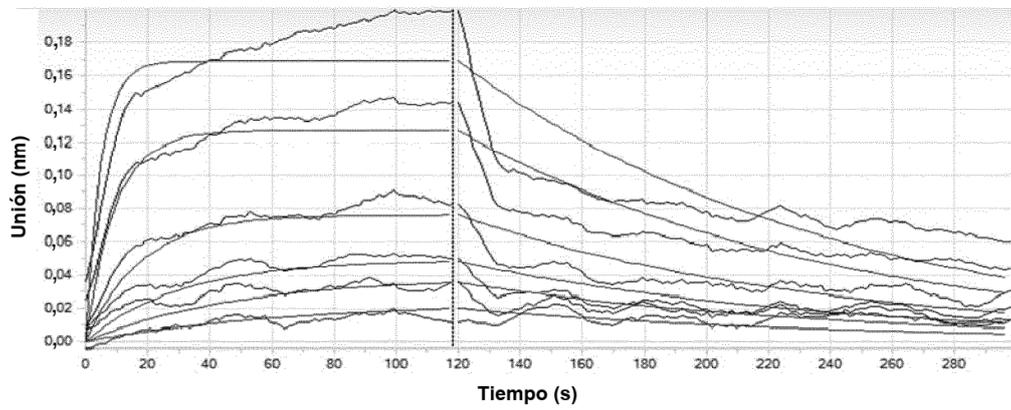


FIG. 27A

