

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 974 437**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2009 E 22215991 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2024 EP 4209510**

54 Título: **Anticuerpos ANTI-PD-L1 y su uso para mejorar la función de las células T**

30 Prioridad:

09.12.2008 US 121092 P

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

27.06.2024

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**IRVING, BRYAN;
CHEUNG, JEANNE;
CHIU, HENRY;
LEHAR, SOPHIE M.;
MAECKER, HEATHER;
MARIATHASAN, SANJEEV y
WU, YAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 974 437 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos ANTI-PD-L1 y su uso para mejorar la función de las células T

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, a la función inmunitaria y a mejorar la función de las células T, incluida la regulación positiva de las respuestas inmunitarias mediadas por las células y al tratamiento de trastornos disfuncionales de las células T.

10

Antecedentes de la invención

La coestimulación o el suministro de dos señales distintas a las células T, es un modelo de activación de linfocitos, ampliamente aceptado, de linfocitos T en reposo por las células presentadoras de antígeno (APC, *antigen-presenting cells*). Lafferty *et al.*, Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 53: 27-42 (1975). Este modelo ofrece además la discriminación de lo propio y lo ajeno y la tolerancia inmunitaria. Bretscher *et al.*, Science 169: 1042-1049 (1970); Bretscher, P.A., P.N.A.S. USA 96: 185-190 (1999); Jenkins *et al.*, J. Exp. Med. 165: 302-319 (1987). La señal primaria, o señal específica de antígeno, se transduce a través del receptor de células T (TCR, *T-cell receptor*) tras el reconocimiento del péptido antigénico exógeno presentado en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, *major histocompatibility-complex*). La segunda señal o coestimuladora se suministra a las células T mediante moléculas coestimuladoras expresadas en células presentadoras de antígeno (APC) e induce a las células T a promover la expansión clonal, la secreción de citocinas y la función efectora. Lenschow *et al.*, Ann. Rev. Immunol. 14:233 (1996). En ausencia de coestimulación, las células T pueden volverse resistentes a la estimulación antigénica, no generar una respuesta inmunitaria eficaz y, además, pueden provocar el *agotamiento* o *la tolerancia* a antígenos exógenos.

25

El modelo sencillo de dos señales puede ser una simplificación excesiva porque la intensidad de la señal del TCR en realidad tiene una influencia cuantitativa sobre la activación y diferenciación de las células T. Viola *et al.*, Science 273: 104-106 (1996); Sloan-Lancaster, Nature 363: 156-159 (1993). Así mismo, la activación de las células T puede producirse incluso en ausencia de señal coestimuladora si la intensidad de la señal del TCR es alta. Lo que es más importante, las células T reciben señales coestimuladoras secundarias tanto positivas como negativas. La regulación de dichas señales positivas y negativas es fundamental para maximizar las respuestas inmunitarias protectoras del hospedador, manteniendo la inmunotolerancia y previniendo la *autoinmunidad*. Las señales secundarias negativas parecen necesarias para la inducción de la tolerancia de las células T, mientras que las señales positivas promueven la activación de las células T. Aunque el modelo sencillo de dos señales sigue ofreciendo una explicación válida para los linfocitos indiferenciados, la respuesta inmunitaria de un hospedador es un proceso dinámico y también se pueden proporcionar señales coestimuladoras a las células T expuestas al antígeno.

35

El mecanismo de coestimulación es de interés terapéutico porque se ha demostrado que la manipulación de señales coestimuladoras proporciona un medio para mejorar o finalizar la respuesta inmunitaria basada en células. Recientemente, se ha descubierto que la disfunción o anergia de las células T se produce simultáneamente con una expresión inducida y sostenida del receptor inhibitor, polipéptido de muerte programada 1 (PD-1, *programmed death 1*). Como resultado, opciones terapéuticas dirigidas a PD-1 y a otras moléculas que señalizan a través de interacciones con PD-1, tal como el ligando 1 de muerte programada (PD-L1, *programmed death ligand 1*) y el ligando 2 de muerte programada (PD-L2, *programmed death ligand 2*) son un campo de intenso interés. La inhibición de la señalización de PD-L1 se ha propuesto como un medio para mejorar la inmunidad de las células T para el tratamiento del cáncer (p. ej., inmunidad tumoral) y la infección, incluyendo infección tanto de corta duración como crónica (p. ej., persistente).

40

45

En los documentos WO2008/071447, US2003/0039653 A1, Hirano *et al.*: Cancer Res., 65(3): 1089 (febrero de 2005), Dong *et al.*, Nat. Med. 8(8): 793 (agosto de 2002), EP1537878 A1, Barber *et al.*, Nature, 439: 682 (febrero de 2006), Yamazaki *et al.*, J. Immunol., 169(10):5538 (noviembre de 2002), Latchman *et al.*, Nat. Immunol. 2(3):261 (marzo de 2001), WO2008/085562, WO2006/042237 y WO2007/005874 se desvelan anticuerpos anti-PD-L1 y métodos para obtenerlos y utilizarlos.

50

Sin embargo, dado que aún no se ha comercializado una terapéutica óptima dirigida a una diana en esta vía, existe una importante necesidad médica no cubierta.

55

Sumario de la invención

En el presente documento se describen anticuerpos anti-PD-L1, incluyendo ácidos nucleicos codificantes y composiciones que contienen dichos anticuerpos, y para su uso en la mejora de la función de las células T para regular positivamente las respuestas inmunitarias mediadas por células y para el tratamiento de trastornos disfuncionales de células T, incluyendo infección (p. ej., de corta duración y crónica) e inmunidad tumoral.

60

La presente invención proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 de longitud completa, bloqueante, aislado, que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y cadena ligera y una región constante, en donde:

65

(a) la cadena pesada comprende la secuencia:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWI
 SPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWP
 GGFQDYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:20), y

5

(b) la cadena ligera comprende la secuencia:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS
 FLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVE
 IKR (SEQ ID NO:21)

10 y la región constante es una región constante de IgG1 humana. También se proporciona una composición que comprende el anticuerpo anti-PD-L1 de longitud completa, bloqueante, aislado, de la reivindicación 1 adjunta y al menos un transportador farmacéuticamente aceptable.

15 El anticuerpo anti-PD-L1 de longitud completa de la invención, comprende secuencias estructurales de cadena pesada de región variable yuxtapuestas entre las HVR según la fórmula: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4). Las secuencias estructurales de cadena pesada derivan de secuencias estructurales consenso humanas y son estructuras consenso del subgrupo III de VH. Las secuencias estructurales son las siguientes:

HC-FR1 es EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:4)
 HC-FR2 es WVRQAPGKGLEWW (SEQ ID NO:5)
 HC-FR3 es RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:6)
 HC-FR4 es WGQGLTVTVSA (SEQ ID NO: 7).

20 El anticuerpo anti-PD-L1 de longitud completa de la invención comprende secuencias estructurales de cadena ligera de región variable yuxtapuestas entre las HVR según la fórmula: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Las secuencias estructurales de cadena ligera derivan de secuencias estructurales consenso humanas y son estructuras consenso de VL kappa I. Las secuencias estructurales son las siguientes:

LC-FR1 es DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:11)
 LC-FR2 es WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:12)
 LC-FR3 es GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:13)
 LC-FR4 es FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 14).

25

30 Por consiguiente, la región variable de cadena pesada comprende secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4) y las regiones variables de cadena ligera comprenden secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). La secuencia estructural de cadena pesada es una estructura consenso del subgrupo III de VH y las secuencias estructurales de cadena pesada son las siguientes:

HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:4)
 HC-FR2 WVRQAPGKGLEWW (SEQ ID NO:5)
 HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:6)
 HC-FR4 WGQGLTVTVSA (SEQ ID NO: 7).

La secuencia estructural de cadena ligera es una estructura consenso VL kappa I y las secuencias estructurales de cadena ligera son las siguientes:

35

LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:11)
 LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:12)
 LC-FR3 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:13)

LC-FR4 FGQGTKVEIKR

(SEQ ID NO: 14).

Una región constante humana puede seleccionarse del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. La región constante humana del anticuerpo anti-PD-L1 de longitud completa de la invención es la región constante de IgG1. El anticuerpo puede tener una función efectora reducida o mínima. La función efectora mínima puede ser el resultado de una "mutación Fc sin efector" o de una aglucosilación. La mutación Fc sin efector es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

En el presente documento también se desvela un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y de cadena ligera, en donde:

(a) la secuencia de cadena pesada tiene una identidad de secuencia de al menos 85 % con la secuencia de cadena pesada: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAVIS
PYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWG QGTLTVSA (SEQ ID NO:20), o

(b) las secuencias de cadena ligera tienen una identidad de secuencia de al menos 85 % con la secuencia de cadena ligera: DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKAPKLLIY SASF
LYSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:21) y en donde la región constante es una región constante de IgG1 humana.

La identidad de secuencia puede ser del 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. La región variable de cadena pesada comprende secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4) y las regiones variables de cadena ligera comprenden secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4).

La invención proporciona composiciones que comprenden los anticuerpos anti-PD-L1 de longitud completa de la presente invención junto con al menos un transportador farmacéuticamente aceptable.

En el presente documento también se describe un ácido nucleico aislado que codifica las secuencias de la región variable de la cadena pesada y/o de la cadena ligera del anticuerpo anti-PD-L1 de la presente invención.

El ácido nucleico puede comprender además un vector adecuado para la expresión del ácido nucleico que codifica los anticuerpos anti-PD-L1 ingeniosos de la presente invención. El vector puede comprender una célula hospedadora adecuada para la expresión del ácido nucleico. La célula hospedadora es una célula eucariota o una célula procariota. La célula eucariota puede ser una célula de mamífero, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO, *Chinese Hamster Ovary*).

En el presente documento también se describe un proceso para producir el anticuerpo anti-PD-L1 de la presente invención que comprende, cultivar una célula hospedadora que contiene ácido nucleico que codifica los anticuerpos anti-PD-L1 de la presente invención en una forma adecuada para la expresión, en condiciones adecuadas para producir dicho anticuerpo o fragmento, y recuperar el anticuerpo o fragmento.

También se describe una composición que comprende el anticuerpo anti-PD-L1 de la presente invención y al menos un transportador farmacéuticamente aceptable.

También se describe un artículo de fabricación que comprende un recipiente que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición desvelada en el presente documento y un prospecto que indica su uso para el tratamiento de un trastorno disfuncional de células T.

Un artículo de fabricación que comprende cualquiera de las composiciones anti-PD-L1 de la presente invención junto con al menos una de las moléculas de BNCA. Las moléculas de BNCA pueden ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, un oligopéptido de BNCA, un ARNi de BNCA o una molécula pequeña de BNCA. La molécula coestimuladora B7 negativa puede seleccionarse del grupo que consiste en: CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, B7.1, B7-H3 y B7-H4.

El artículo de fabricación puede comprender cualquiera de las composiciones anti-PD-L1 descritas anteriormente junto con un agente quimioterápico. El agente quimioterápico puede ser gemcitabina.

También se describe un artículo de fabricación que comprende los anticuerpos anti-PD-L1 de la presente invención junto con uno o más agonistas de una molécula coestimuladora positiva. Una molécula coestimuladora positiva puede ser una molécula coestimuladora de la familia B7. La molécula coestimuladora positiva puede seleccionarse del grupo que consiste en: CD28, CD80, CD86, ICOS/ICOSL. La molécula coestimuladora positiva puede ser una molécula coestimuladora de la familia de TNFR. La molécula coestimuladora de TNFR puede seleccionarse del grupo que consiste en: OX40/OX40L, 4-1BB/4-1BBL, CD27/CD27L, CD30/CD30L y HVEM/LIGHT, y fragmentos solubles,

construcciones y anticuerpos agonistas de los mismos.

También se describe un artículo de fabricación que comprende los anticuerpos anti-PD-L1 de la presente invención junto con uno o más antibióticos. El antibiótico puede seleccionarse del grupo que consiste en un agente antivírico, un agente antibacteriano, un agente antifúngico, un agente antiprotozoario.

El agente antivírico puede seleccionarse del grupo que consiste en inhibidores de transcriptasa inversa, inhibidores de proteasa, inhibidores de integrasa, inhibidores de entrada o fusión, inhibidores de maduración, inhibidores de liberación vírica, potenciadores de la respuesta inmunitaria, potenciadores sinérgicos antivíricos, vacunas, agonistas hepáticos y fitofármacos. La combinación puede comprender una o más categorías de agentes antivíricos.

También se describe un artículo de fabricación que comprende los anticuerpos anti-PD-L1 de la presente invención junto con una o más vacunas.

También se desvela un método para mejorar la función de las células T, que comprende administrar una cantidad eficaz de los anticuerpos o las composiciones anti-PD-L1 de la presente invención. El anticuerpo o la composición anti-PD-L1 hace que las células T disfuncionales no sean disfuncionales.

También se desvela un método de tratamiento de un trastorno disfuncional de células T, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos o las composiciones anti-PD-L1 de la presente invención. El trastorno disfuncional de células T puede ser una infección o inmunidad tumoral. La infección puede ser de corta duración o crónica. La infección crónica puede ser persistente, latente o lenta. La infección crónica puede deberse a un patógeno seleccionado del grupo que consiste en bacterias, virus, hongos y protozoos. El nivel de patógeno en el hospedador puede estar reducido. El método puede comprender además el tratamiento con una vacuna. El método puede comprender además el tratamiento con un antibiótico. El patógeno puede ser una bacteria y el método puede comprender además la administración de un agente antibacteriano. La bacteria puede seleccionarse del grupo que consiste en: *Mycobacterium spp.*, *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *Streptococcus spp.*, *Haemophilus spp.*, *Neisseria spp.*, *Klebsiella spp.*, *Borrelia spp.*, *Bacterioides fragillis*, *Treponema spp.* y *Helicobacter pylori*. El patógeno puede ser un virus y el método puede comprender además la administración de un agente antivírico. El virus puede seleccionarse del grupo que consiste en: hepatitis B, C, virus del herpes simple I, II, virus de la inmunodeficiencia humana I, II, citomegalovirus, virus de Eppstein Barr, virus del papiloma humano, virus linfotrópico de células T humano, I, II, virus de la varicela zóster. El patógeno puede ser un hongo y el método puede comprender además la administración de un agente antifúngico. El trastorno puede seleccionarse del grupo que consiste en: aspergilosis, blastomicosis, candidiasis albicans, coccidioidomycosis immitis, histoplasmosis, paracoccidioidomycosis, microsporidiosis. El patógeno puede ser un protozoo y el método puede comprender además la administración de un agente antiprotozoario. El trastorno puede seleccionarse del grupo que consiste en: leishmaniasis, plasmodiosis (*es decir*, paludismo), criptosporidiosis, toxoplasmosis, tripanosomiasis e infecciones causadas por helmintos, incluidas las resultantes de trematodos (p. ej., esquistosomiasis), cestodos (p. ej., equinococosis) y nematodos (p. ej., triquinosis, ascariosis, filariosis y strongilodiosis).

El trastorno disfuncional de células T puede ser inmunidad tumoral. El anticuerpo o la composición PD-L1 de la presente invención, puede combinarse con un régimen de tratamiento que comprenda además una terapia tradicional seleccionada del grupo que consiste en: terapia con radiación, quimioterapia, terapia dirigida, inmunoterapia, hormonoterapia, inhibición de la angiogénesis y cuidados paliativos. La tratamiento con quimioterapia puede seleccionarse del grupo que consiste en: gemcitabina, ciclofosfamida, doxorubicina, paclitaxel, cisplatino. La inmunidad tumoral puede ser el resultado de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en: cáncer de mama, pulmón, colon, ovario, melanoma, vejiga, riñón, hígado, glándulas salivares, estómago, gliomas, tiroides, timo, epitelial, de cabeza y cuello, gástrico y pancreático.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una ilustración gráfica que representa la coestimulación de células T por la familia B7 de moléculas de superficie celular.

La Figura 2 es un esquema que muestra el diseño experimental del ensayo de estimulación de células T PMEL/B16.

La Figura 3 es un gráfico de barras que muestra el efecto del Ab (*antibody*, anticuerpo) anti-PD-L1 sobre la función de células T específicas de antígeno a través de la producción mejorada de IFN- γ en células T CD8⁺ PMEL en respuesta al péptido de melanocitos gp100. Tanto el porcentaje de células T CD8⁺ productoras de IFN- γ como sus niveles de producción de IFN- γ aumentan durante la estimulación en presencia del anticuerpo anti-PD-L1.

La Figura 4 es un gráfico de barras que muestra el efecto del Ab anti-PD-L1 sobre la función de las células T específicas de antígeno a través de la mejora en la proliferación de células T CD4⁺ específicas de Ova por el Ab anti-PD-L1 YW243.55.S1 en una estimulación secundaria con células B A20 pulsadas con Ova/APC mPD-L1.

La Figura 5 es una serie de gráficos FACS que muestran la mejora en la proliferación de células T CD8 humanas mediante el anticuerpo anti-PD-L1 YW243.55S1 en una reacción linfocitaria mixta. También se informa sobre el porcentaje de células en proliferación medido a través de la dilución en intensidad de CFSE.

5 La Figura 6 es un esquema del diseño experimental del tratamiento del LCMV (virus de la coriomeningitis linfocítica) crónico con la forma quimérica del Ab (anticuerpo) anti-PD-L1, YW243.55S70. Las flechas indican el momento de las 6 dosis de anti-PD-L1 que comenzaron 14 días después de la infección con 2×10^6 ufp del Clon 13 del LCMV.

10 Las Figuras 7A y 7B son gráficos que muestran la función efectora de CD8 mejorada en células *ex vivo* después del tratamiento *in vivo* tratamiento de la infección crónica por LCMV mediante el Ab anti-PD-L1, YW243.55.S70. El bloqueo de PD-L1 por YW243.55.S70 aumentó la desgranulación de las células T CD8⁺ (medida por el aumento en la superficie de CD107A) (Fig. 7A) y aumentó el % de células productoras de IFN-gamma en respuesta al péptido gp33 del LCMV (Fig. 7B). La frecuencia de células específicas de gp33 se revela mediante tinción con pentámeros de gp33 H2-Db.

15 Las Figuras 8A y 8B muestran la reducción en los títulos de LCMV en sangre y tejido en la infección crónica por LCMV después de tratamiento *in vivo* con anticuerpo anti-PD-L1. En la Figura 8A, se analizan los títulos víricos de los diversos tejidos indicados los días 21 y 28, una y dos semanas después del tratamiento con el Ab, respectivamente. En la figura 8B, los títulos víricos en suero se analizan los días 0, 7, 14, 21 y 28, y la inoculación del LCMV se produjo el día 0 y el tratamiento comenzó el día 14.

20 La Figura 9A muestra una reducción significativa en el crecimiento del tumor de carcinoma de colon MC38.Ova como resultado de la aplicación del anticuerpo anti-PD-L1 después del tratamiento terapéutico de tumores establecidos (el tratamiento comenzó el día 14, cuando el tumor media 250 mm³). La Figura 9B es un histograma que muestra los niveles de expresión de PD-L1 en la superficie de células MC38.Ova en cultivo tisular, medidos mediante citometría de flujo. PD-L2 no se expresa en las células MC38.Ova.

25 La Figura 10 es un gráfico que muestra el efecto del tratamiento con bloqueo de PD-L1 solo y junto con anti-VEGF o Gemcitabina sobre el crecimiento de tumores MC38.Ova en ratones C57BL/6.

30 Las Figuras 11A-B son las secuencias de la región variable de las cadenas pesada y ligera, respectivamente, de 11 anticuerpos anti-PD-L1 identificados mediante presentación en fagos. Las barras sombreadas muestran las CDR con varias definiciones, mientras que las zonas del recuadro muestran la extensión de las HVR.

35 Descripción detallada

Técnicas generales

40 La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la experiencia de la materia. Dichas técnicas se explican con detalle en la bibliografía, tal como, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook *et al.*, 1989); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel *et al.*, eds 1987, y actualizaciones periódicas); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis *et al.*, ed., 1994); A Practical Guide to Molecular Cloning (Perbal Bernard V., 1988); Phage Display: A Laboratory Manual (Barbas *et al.*, 2001).

I. Inmunidad del hospedador

50 A. Desarrollo y activación de linfocitos

Los dos tipos principales de linfocitos en seres humanos son T (derivados del timo) y B (derivados de la médula ósea. Estas células derivan de células madre hematopoyéticas en la médula ósea y el hígado fetal que se han comprometido con la vía de desarrollo linfoide. La descendencia de estas células madre sigue vías divergentes para madurar en linfocitos B o T. El desarrollo de los linfocitos B humanos tiene lugar íntegramente en la médula ósea. Por otro lado, las células T se desarrollan a partir de precursores inmaduros que abandonan la médula y viajan a través del torrente sanguíneo hasta el timo, donde proliferan y se diferencian en linfocitos T maduros.

60 Los linfocitos maduros que emergen del timo o la médula ósea se encuentran en un estado quiescente o "en reposo", es decir, son mitóticamente inactivos. Cuando se dispersan en el torrente sanguíneo, estos linfocitos "indiferenciados" o "vírgenes", viajan a varios órganos linfoides secundarios o periféricos, tal como el bazo, ganglios linfáticos o amígdalas. La mayoría de los linfocitos vírgenes tienen una vida útil inherentemente corta y mueren pocos días después de salir de la médula o el timo. Sin embargo, si dicha célula recibe señales que indican la presencia de un antígeno, pueden activarse y experimentar sucesivas rondas de división celular. Algunas de las células descendientes resultantes vuelven después al estado de reposo y se convierten en *linfocitos de memoria* - células B y T que están esencialmente sensibilizadas para el próximo encuentro con el alérgeno estimulante. La otra descendencia de

linfocitos vírgenes activados son las células efectoras, que sobreviven solo unos días, pero llevan a cabo actividades defensivas específicas.

La activación linfocitaria hace referencia a una serie ordenada de acontecimientos por los que pasa un linfocito en reposo cuando se le estimula para que se divida y produzca descendencia, algunos de los cuales se convierten en células efectoras. Una respuesta completa incluye tanto la inducción de la proliferación celular (*mitogénesis*) como la expresión de funciones inmunitarias. Los linfocitos se activan cuando ligandos específicos se unen a receptores en sus superficies. Los ligandos de las células T son diferentes a los de las células B, pero los mecanismos fisiológicos intracelulares resultantes son similares.

Algunos antígenos exógenos pueden inducir por sí mismos la activación de los linfocitos, especialmente los antígenos poliméricos de gran tamaño que entrecruzan las inmunoglobulinas de superficie de las células B u otras glucoproteínas en células T. Sin embargo, la mayoría de los antígenos no son poliméricos e incluso la unión directa a las células B en gran número no da como resultado la activación. Estos antígenos más comunes activan las células B cuando se coestimulan con linfocitos T auxiliares activados cercanos. Dicha estimulación puede producirse por linfocinas secretadas por la célula T, pero se transmite de manera más eficaz por contacto directo de la célula B con proteínas de la superficie de la célula T que interactúan con determinados receptores de la superficie de la célula B para generar una señal secundaria.

B. Células T

Los linfocitos T no expresan inmunoglobulinas, en su lugar, detectan la presencia de sustancias exógenas a través de proteínas de superficie denominadas receptores de células T (TCR). Estos receptores reconocen los antígenos por contacto directo o influyendo en la actividad de otras células inmunitarias. Junto con los macrófagos, las células T son el tipo de célula principal implicado en la inmunidad mediada por células.

A diferencia de las células B, las células T pueden detectar sustancias exógenas solo en contextos específicos. En particular, los linfocitos T reconocerán una proteína exógena solo si primero se escinde en pequeños péptidos, que después se muestran en la superficie de una segunda célula hospedadora, denominada célula presentadora de antígeno (APC). Muchos tipos de células hospedadoras pueden presentar antígenos en algunas condiciones, pero ciertos tipos están adaptados más específicamente para este propósito y son particularmente importantes para controlar la actividad de las células T, incluidos macrófagos y otras células B. La presentación de antígenos depende en parte de proteínas específicas, denominadas proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés), en la superficie de las células presentadoras. Por tanto, para estimular la inmunidad mediada por células, los péptidos exógenos deben presentarse a las células T junto con péptidos del MHC, y esta combinación debe reconocerla un receptor de células T.

Hay dos subconjuntos importantes de células T: los linfocitos T citotóxicos (células T_c o CTL) y las células T auxiliares (*helper*) (células T_H), que se pueden identificar aproximadamente basándose en la expresión en la superficie celular del marcador CD8 y CD4. Las células T_c son importantes en la defensa vírica y pueden destruir virus directamente al reconocer determinados péptidos víricos expresados en la superficie celular. Las células T_H promueven la proliferación, maduración y función inmunitaria de otros tipos de células, p. ej., la secreción de linfocinas para controlar las actividades de las células B, macrófagos y células T citotóxicas. Tanto los linfocitos T vírgenes como los de memoria permanecen normalmente en el estado de reposo, y en este estado no muestran una actividad auxiliar o citotóxica significativa. Cuando se activan, estas células se someten a varias rondas de división mitótica para producir células hijas. Algunas de estas células hijas regresan al estado de reposo como células de memoria, pero otras se convierten en células efectoras que expresan activamente actividad auxiliar o citotóxica. Estas células hijas se parecen a sus precursoras: las células CD4+ sólo pueden producir descendencia CD4+, mientras que las células CD8+ sólo producen descendencia CD8+. Las células T efectoras expresan marcadores de superficie celular que no se expresan en las células T en reposo, tales como CD25, CD28, CD29, CD40L, receptores de transferrina y proteínas del MHC de clase II. Cuando se retiran los estímulos activadores, la actividad citotóxica o auxiliar disminuye gradualmente durante un período de varios días a medida que las células efectoras mueren o vuelven al estado de reposo.

Similar a la activación de las células B, las respuestas de los linfocitos T a la mayoría de los antígenos, también necesitan dos tipos de estímulos simultáneos. El primero es el antígeno, que si se presenta adecuadamente en las proteínas del MHC en una célula presentadora de antígeno, puede reconocerse y unirse por receptores de células T. Si bien este complejo antígeno-MHC envía una señal al interior de la célula, por lo general, es insuficiente para dar como resultado la activación de las células T. La activación completa, tal como la que se produce con las células T auxiliares, necesita la coestimulación con otros ligandos específicos denominados coestimuladores que se expresan en la superficie de la célula presentadora de antígeno. La activación de una célula T citotóxica, por otro lado, generalmente requiere IL-2, una citocina secretada por células T auxiliares activadas.

C. La respuesta inmunitaria

Las tres propiedades funcionales principales del sistema inmunitario de los mamíferos que lo distinguen de las demás defensas del organismo incluyen: (1) *especificidad* - la capacidad de reconocer y responder o no responder

individualmente entre un gran número de moléculas diana, (2) *discriminación* - la capacidad de determinar lo propio y lo ajeno para coexistir pacíficamente con todas las innumerables proteínas y otros materiales orgánicos, sin embargo, responden enérgicamente contra el material exógeno que se introduce en el organismo, y (3) *memoria* - la capacidad de ser moldeado por la experiencia de modo que los encuentros posteriores con un patógeno exógeno en particular provoquen una respuesta más rápida y enérgica que la que ocurrió en el encuentro inicial. Cuando una o más de estas funciones se frustran, se produce un estado patológico.

Los linfocitos vírgenes se liberan continuamente desde los órganos linfoides primarios hacia la periferia, llevando cada uno de ellos receptores de superficie que permiten la unión con el antígeno. La unión con el antígeno en las células B está mediada por inmunoglobulinas unidas a la superficie, mientras que en las células T está mediada por receptores de células T. Cuando los linfocitos vírgenes se activan, proliferan, produciendo células hijas que después pueden sufrir ciclos adicionales de activación y proliferación. La velocidad y la intensidad de la respuesta a un antígeno determinado están determinadas en gran medida por la selección clonal: cuanto mayor sea la población de células hijas o clones específicos de un antígeno particular, mayor será el número de células que pueden reconocer y participar en la respuesta inmunitaria. Cada respuesta inmunitaria es una secuencia de acontecimientos compleja e intrincadamente regulada que implica a varios tipos de células. Se desencadena cuando un *inmunógeno* entra en el organismo y se encuentra con una clase especializada de células denominadas células presentadoras de antígeno (APC). Estas APC capturan una cantidad mínima del inmunógeno y lo muestran en una forma que puede ser reconocida por los linfocitos T auxiliares específicos del antígeno. Las células T auxiliares se activan y, a su vez, promueven la activación de otras clases de linfocitos, tales como las células B o las células T citotóxicas. A continuación, los linfocitos activados proliferan y llevan a cabo sus funciones efectoras específicas. En cada fase de este proceso, los linfocitos y las APC se comunican entre sí mediante contacto directo o mediante la secreción de citocinas reguladoras.

Los antígenos exógenos que son capturados por una APC sufren una serie de alteraciones denominadas *procesamiento de antígenos*. Tal procesamiento, especialmente de inmunógenos proteicos implica desnaturalización y digestiones proteolíticas parciales, de modo que el inmunógeno se escinde en péptidos cortos. Después, un número limitado de los péptidos resultantes se asocia de manera no covalente con proteínas del MHC de clase II y se transportan a la superficie de la APC, un proceso conocido como *presentación de antígeno*. Un linfocito T auxiliar CD4+ que entra en contacto directo con una APC puede activarse, pero lo hará sólo si expresa una proteína receptora de células T que pueda reconocer y unirse al complejo particular péptido-MHC presentado por la APC.

Las células T auxiliares (T_H) son las principales orquestadoras de la respuesta inmunitaria porque son necesarias para la activación de las otras dos células efectoras linfáticas: las células T citotóxicas (T_c) y las células plasmáticas secretoras de anticuerpos. La activación de las T_H se produce temprano en una respuesta inmunitaria y requiere al menos dos señales. Una señal se proporciona mediante la unión del receptor del antígeno de las células T al complejo péptido antigénico-MHC en la superficie de la APC que se transmite a través del complejo de proteína CD3, mientras que la segunda señal coestimuladora a través de la APC se cree que es el resultado de la unión de una proteína transmisora de señales independiente en la superficie de las células T con un ligando específico en la APC. Una interacción conocida de este tipo es la proteína CD28 de las células T y la familia de proteínas de superficie APC conocida como B7. Otros pares de proteínas de superficie también pueden actuar como mediadores en la coestimulación. El proceso de coestimulación se describe con mayor detalle más adelante. Se cree que los anticuerpos anti-PD-L1 de la presente invención mejoran la coestimulación mediante el antagonismo de una señal coestimuladora negativa proporcionada por la señalización a través de PD-L1.

Juntas, las dos señales inducen a la célula T auxiliar a comenzar a secretar la citocina interleucina-2 (IL-2) y también a comenzar a expresar receptores de IL-2 específicos de alta afinidad en su superficie. La IL-2 es un factor mitogénico muy potente para los linfocitos T y es esencial para la respuesta proliferativa de las células T activadas. El efecto de la IL-2 sobre la célula que la secreta, es un fenómeno conocido como *efecto autocrino*. Además, se ha demostrado que incluso si una célula T ha recibido ambas señales, no proliferará si se bloquean sus propios receptores de IL-2 de superficie. La IL-2 también puede actuar sobre las células inmediatamente cercanas, en un efecto denominado *paracrino*. Este efecto es especialmente importante para activar las células T_c , que generalmente no producen suficiente IL-2 para estimular su propia proliferación. Además de la IL-2, las células T_H activadas secretan otras citocinas y promueven el crecimiento, la diferenciación y las funciones de las células B, de los macrófagos y de otros tipos de células.

El contacto entre una APC y una célula T_H específica de antígeno, también tiene efecto sobre la APC, siendo uno de los más importantes la liberación de IL-1. Se cree que esta citocina actúa de manera autocrina aumentando la expresión superficial de las proteínas del MHC de clase II y de varias moléculas de adhesión, fortaleciendo así la unión de la célula T_H y mejorando la presentación del antígeno. Al mismo tiempo, la IL-1 funciona de manera paracrina en la célula T_H para promover la secreción de IL-2 y la expresión del receptor de IL-2.

Durante la activación de las células T_H de la manera descrita anteriormente, algunas células B también pueden haber interactuado con el inmunógeno a través de sus receptores de antígeno, que son formas de anticuerpos unidas a membranas que luego secretarán. A diferencia de las células T, las células B reconocen a un inmunógeno en su forma libre, no procesada. La unión con el antígeno específico proporciona un tipo de señal que puede conducir a la activación de las células B. Un segundo tipo lo proporcionan las células T_H activadas, que expresan proteínas que

ayudan a activar las células B uniéndose a receptores que no son de inmunoglobulina en su superficie. Estas señales derivadas de T_H, que actúan sobre cualquier célula B independientemente de su especificidad antigénica, se conocen como factores auxiliares. Estos factores auxiliares incluyen IL-2, IL-4 y IL-6. Sin embargo, el auxilio se logra de manera más eficaz a través del contacto célula-célula, lo que permite que las proteínas de la superficie de las células T entren en contacto directamente con las de las células B. La forma más eficaz de auxilio mediado por contacto se produce cuando una proteína denominada ligando CD40 (CD40L), que se expresa en las células T_H sólo después de haberse activado, se une a una proteína denominada CD40 en las células B. En un proceso conocido como *activación por espectador*, el contacto con una célula B activada puede incluso ser suficiente para activar células B en reposo incluso aunque sus inmunoglobulinas de superficie no se hayan acoplado al antígeno.

Los linfocitos T_c actúan erradicando las células que expresan antígenos exógenos en sus superficies, tal como células hospedadoras infectadas por virus. La mayoría de las células T_c expresan CD8 en lugar de CD4 y, por tanto, reconocen antígenos asociados con proteínas del MHC de clase I en lugar de las de clase II. Cuando un virus infecta una célula somática, algunas proteínas víricas inmunogénicas pueden sufrir procesamiento dentro de la célula y los péptidos resultantes pueden aparecer como complejos de superficie con moléculas del MHC de clase I. Estos complejos péptido-MHC pueden ser reconocidos por el receptor de células T de un clon específico de antígeno, proporcionando una de las dos señales necesarias para la activación de la célula T_c. Esta primera señal por sí sola induce receptores de IL-2 de alta afinidad en la célula T_c. La segunda señal la proporciona la IL-2 secretada por un linfocito T_H activado cercano. Al recibir ambas señales, la célula T_c activada adquiere actividad citotóxica, lo que permite destruir a la célula con la que está unida, así como cualquier otra célula que lleve los mismos complejos péptido-MHC de clase I. En algunos casos, la destrucción se produce porque la T_c libera toxinas específicas sobre la célula diana; en otros, la T_c induce a la célula diana a suicidarse por apoptosis. La célula T_c activada también prolifera, dando lugar a células T_c adicionales con la misma especificidad antigénica.

D. Coestimulación por la Superfamilia de Inmunoglobulinas:

1. B7.1/B7.2 - CD28/CTLA-4

Quizá la vía coestimuladora de células T mejor caracterizada sea la que envía señales a través de B7.1(CD80)/B7.2(CD86) - CD28/CTLA-4(CD152). Esta vía de señalización es fundamental para la activación y tolerancia de las células T. Karandikar *et al.*, J. Neuroimmunol. 89: 10-18 (1998); Oosterwegal *et al.*, Curr. Opin. Immunol. 11: 294-300 (1999); Salomon *et al.*, Annu. Rev. Immunol. 19: 225-252 (2001); Sansom, D.M., Immunol. 101: 169-177 (2000); Chambers *et al.*, Annu. Rev. Immunol. 19: 565-592 (2001).

B7.1 [Freeman *et al.*, J. Exp. Med. 174: 625-631 (1991); Freedman *et al.*, J. Immunol. 137: 3260-3267 (1987); Yokochi *et al.*, J. Immunol. 128: 823-827 (1982)] y B7.2 [Freeman *et al.*, Science 262: 909-911 (1993); Freeman *et al.*, J. Exp. Med. 178: 2185-2192 (1993); Azuma *et al.*, Nature 366: 76-79 (1993)] tienen doble especificidad por los dos receptores estimuladores CD-28 y CTLA-4. Aruffo *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 8573-8577 (1987); Gross *et al.*, J. Immunol. 144: 3201-3210 (1990). CD28 se expresa de manera constitutiva en la superficie de las células T [Gross *et al.*, J. Immunol. 149: 380-388 (1992)], si bien CTLA-4, el receptor de mayor afinidad, tiene una expresión que se regula rápidamente de manera positiva después de la activación de las células T. Peach *et al.*, J. Exp. Med. 180: 2049-2058 (1994); Linsley *et al.*, J. Exp. Med. 176: 1595-1604 (1992); Kinsley *et al.*, Immunity 1: 793-801 (1994); Linsley *et al.*, Immunity 4: 535-543 (1996). La mayoría de las poblaciones de APC expresan B7.2 de manera constitutiva a niveles bajos, que se regulan rápidamente, mientras que B7.1 se expresa de forma inducible más tarde después de la activación. Freeman *et al.*, Science 262: 909-911 (1993); Hathcock *et al.*, J. Exp. Med. 180: 631-640 (1994). La expresión previa de B7.2 y los datos de desactivación en ratones sugieren que B7.2 es la molécula coestimuladora más importante para iniciar respuestas inmunitarias, pero, por lo demás, las funciones de las dos moléculas se solapan en gran medida. McAdam *et al.*, Immuno. Rev. 165: 631-640 (1994).

CD28 interactúa con B7.1 y B7.2 para transmitir una señal que sinergiza con la señal del TCR para promover la activación de las células T. Lenschow *et al.*, Annu. Rev. Immunol. 165: 233-258 (1996); Lanzavecchia *et al.*, Cell 96: 1-4 (1999). En ausencia de una señal del TCR, la señalización de CD28 no tiene importancia fisiológica. La señalización de CD28 regula el umbral para la activación de las células T y disminuye significativamente la cantidad de interacciones de TCR necesarias para la activación de las células T. Viola *et al.*, Science 273: 104-106 (1996). La activación de CD28 sostiene las respuestas de las células T al promover la supervivencia de las células T, permitiendo así que las citocinas inicien la expansión clonal y la diferenciación de las células T. Thompson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1333-1337 (1989); Lucas *et al.*, J. Immunol. 154: 5757-5768 (1995); Shahinian *et al.*, Science 261: 609-612 (1993); Sperling *et al.*, J. Immunol. 157: 3909-3917 (1996); Boise *et al.*, Immunity 3: 87-98 (1995). CD28 también optimiza las respuestas de las células T previamente activadas, promoviendo la producción de interleucina 2 (IL-2) y la supervivencia de las células T. Si bien algunas respuestas son independientes de CD28, aún no está claro si se trata de una independencia de la coestimulación resultante de fuertes estímulos antigénicos o del resultado de la dependencia de otras vías coestimuladoras desconocidas.

La activación de CTLA-4 provoca una señal negativa, que inhibe la transducción de señales mediada por TCR y CD-28. La participación de CTLA-4 da como resultado la inhibición de la síntesis de IL-2 y la progresión a lo largo del ciclo celular y la terminación de las respuestas de las células T. Walunas *et al.*, Immunity 1: 405-413 (1994); Walunas *et al.*,

J. Exp. Med. 183: 2541-2550 (1996); Krummel *et al.*, J. Exp. Med. 182: 459-466 (1995); Brunner *et al.*, J. Immunol. 162: 5813-5820 (1999); Greenwald *et al.*, Immunity 14: 145-155 (2001). CTLA-4 juega un papel importante en la regulación de las respuestas de las células T, incluida la *tolerancia de células T periféricas*. Si bien no está claro cómo se coordina la señalización a través de CTLA-4 y CD28, algunas posibilidades incluyen superar a CD28 para unirse a B7, por inducción de citocinas inmunosupresoras, antagonismo directo de la señalización de CD28 y/o la señalización mediada por TCR.

Como resultado, el antagonismo de CTLA-4 (p. ej., anticuerpos anti-CTLA antagonistas) y o el agonizante B7.1/B7.2/CD28 puede ser útil para mejorar la respuesta inmunitaria en el tratamiento de infecciones (p. ej., de corta duración y crónicas) y la inmunidad tumoral.

2. Señalización ICOS/ICOSL:

Otra vía de interacción entre las APC y las células T se produce a través de ICOS (CD278) e ICOSL (B7-H2, CD275). La señalización ICOS/ICOSL promueve la diferenciación y la función efectora de las células T auxiliares y es particularmente importante para la producción de interleucina-10 (IL-10), pero juega un papel más modesto en la regulación de la expansión de las células T y la producción de IL-2, incluidas las células T reguladoras, la tolerancia y autoinmunidad a las células T.

Al contrario de lo que sucede con CD28, ICOS no se expresa de manera constitutiva en células T indiferenciadas, pero se induce rápidamente en las células T después de la interacción del TCR. Hutloff *et al.*, Nature 397: 263-266 (1999); Yoshinaga *et al.*, Nature 402: 827-832 (1999); Beier *et al.*, Eur. J. Immunol. 30: 3707-3717 (2000); Coyle *et al.*, Immunity 13: 95-105 (2000); Mages *et al.*, Eur. J. Immunol. 30: 1040-1047 (2000); McAdam *et al.*, J. Immunol. 165: 5035-5040 (2000). Esto sugiere que ICOS proporciona una señal coestimuladora a las células T activadas. Si bien la coestimulación por CD28 mejora la expresión de ICOS y la expresión de ICOS se reduce en ausencia de B7.1 y B7.2, ICOS no depende completamente de las señales de CD28. McAdam *et al.*, J. Immunol. 165: 5035-5040 (2000); Aicher *et al.*, J. Immunol. 164: 4689-4696 (2000); Kopf *et al.*, J. Exp. Med. 192: 53-61 (2000). ICOS está regulado positivamente tanto en las células T auxiliares de tipo 1 como en las de tipo 2 (T_{H1} y T_{H2}) durante la fase inicial de diferenciación, pero los niveles permanecen altos en las células T_{H2} y disminuyen en las células T_{H1}. El patrón de expresión de ICOS en células T en centros germinales. Beier *et al.*, Eur. J. Immunol. 30: 3707-3717 (2000); Mages *et al.*, Eur. J. Immunol. 30: 1040-1047 (2000), indica un papel de ICOS en el auxilio de las células T por las células B. Los estudios funcionales lo han confirmado, e incluso se ha confirmado la expresión de ICOS en células B de rata, aunque no en otras especies. Tezuka *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 276: 335-345 (2000); McAdam *et al.*, Nature 409: 102-105 (2001); Dong *et al.*, Nature 409: 97-101 (2001); Dong *et al.*, J. Immunol. 166: 3659-3662 (2001); Tafuri *et al.*, Nature 409: 105-109 (2001).

Una función de la señalización ICOS/ICOSL parece ser la de regular la producción de citocinas (p. ej., IL-4, IL-13) por células T recientemente activadas y efectoras. Hutloff *et al.*, Nature 397: 263-266 (1999); Coyle *et al.*, Immunity 13: 95-105 (2000); Dong *et al.*, Nature 409: 97-101 (2001). En estudios de enfermedad alérgica de las vías respiratorias, la función efectora de T_{H2}, aunque no la diferenciación de T_{H2}, la proporciona el bloqueo de ICOS. Tesciuba *et al.*, J. Immunol. 167: 1996-2003 (2001). Lo que indica que ICOS también puede regular la función efectora de T_{H1}, la producción de las dos citocinas T_{H1} y T_{H2} puede ser suprimida por la proteína de fusión ICOS-Ig después de la reactivación *in vitro*. Kopf *et al.*, J. Exp. Med. 192: 53-61 (2000).

Otra posible función de ICOS se relaciona con el mantenimiento de respuestas T_{H1}. En un modelo experimental de encefalomiелitis autoinmunitaria (EAE) para la esclerosis múltiple, una enfermedad de T_{H1} mediada por células T CD4⁺ específicas de la mielina, muestra que el resultado del bloqueo de ICOS podría ser distinto cuando se bloquea la coestimulación durante la sensibilización de células T, y después, durante la fase efectora de la EAE. Dong *et al.*, Nature 409: 97-101 (2001); Rottman *et al.*, Nature Immunol. 2: 605-611 (2001); Sporici *et al.*, Clin. Immunol. 100: 277-288 (2001). La EAE inducida por la glucoproteína de la mielina de los oligodendrocitos (MOG, *myelin oligodendrocyte glycoprotein*) se agrava enormemente en ratones con desactivación de ICOS^{-/-}, con una mayor producción de IFN-γ en comparación con los del tipo silvestre. De manera similar, el bloqueo de ICOS durante la inducción de la EAE, agravó la enfermedad y también produjo un aumento de la producción de IFN-γ. Por lo tanto, el bloqueo de ICOS durante la sensibilización conduce a la polarización de la respuesta de T_{H1}. De manera interesante, la sensibilización *in vitro* de células T transgénicas con TCR específicas de mielina en presencia de ICOS-Ig, inhibió su capacidad para inducir EAE, en marcado contraste con los resultados del bloqueo de ICOS-Ig observado *in vivo*. Sporici *et al.*, citado anteriormente. La diferencia de los resultados opuestos *in vitro* e *in vivo* aún no está clara, pero podría reflejar un papel de ICOS en las células T reguladoras productoras de IL-10, así como en las células T efectoras durante el bloqueo de ICOS *in vivo*. La coestimulación mediante IL-10 es muy eficaz para mejorar la producción de IL-10 y es más eficaz que la coestimulación mediante CD28. Hutloff *et al.*, citado anteriormente. El bucle regulador IL-10, IL-12 es crítico en la regulación de la EAE porque los ratones IL-10^{-/-}, pero no los ratones IL4^{-/-}, desarrollan EAE agravada. Segal *et al.*, J. Exp. Med. 187: 537-546 (1998).

Otra posible función de ICOS es potenciar las respuestas humorales de las células B dependientes de células T. Los ratones ICOS^{-/-} e ICOSL^{-/-} han demostrado que ICOS es necesario para las respuestas de las células B dependientes de las células T. Hutloff *et al.*, Nature 397:263-66 (1999); Chapoval *et al.*, Nat. Immunol. 2:269-74 (2001); Coyle *et al.*,

Immunity 13: 95-105 (2000); McAdam *et al.*, Nature 409: 102-5 (2001); Tafuri *et al.*, Nature 409: 105-9 (2001); Suh *et al.*, Nat. Immunol. 4: 899-906 (2003). Los ratones ICOS^{-/-} también muestran centros germinales reducidos en respuesta a la inmunización primaria, defectos intensos en la formación del centro germinal en respuesta a la exposición secundaria y defectos en el cambio de clase de IgG. El papel de ICOS en la interacción de las células T:B se validó además identificando la pérdida de homocigosidad de ICOS en las células T de pacientes con la enfermedad de inmunodeficiencia común variable de inicio en la edad adulta. Grimbacher *et al.*, Nat. Immunol. 4: 261-68 (2003).

Como resultado, el agonismo de ICOS/ICOSL (p. ej., anticuerpos agonistas anti-ICOS, ligando de ICOS/ICOSL soluble), puede ser útil para mejorar la respuesta inmunitaria en el tratamiento de infecciones (p. ej., de corta duración y crónicas) y/o inmunidad tumoral.

3. Vía de PD-1:

Una importante señal coestimuladora negativa que regula la activación de las células T la proporciona el receptor 1 de muerte programada (PD-1)(CD279) y sus compañeros de unión al ligando PD-L1 (B7-H1, CD274) y PD-L2 (B7-DC, CD273). El papel regulador negativo de PD-1 se reveló mediante desactivaciones de PD-1 (*Pdcd1*^{-/-}), que son propensas a la autoinmunidad. Nishimura *et al.*, Immunity 11: 141-51 (1999); Nishimura *et al.*, Science 291: 319-22 (2001). PD-1 está relacionado con CD28 y CTLA-4, pero carece de la cisteína proximal a la membrana que permite la homodimerización. El dominio citoplásmico de PD-1 contiene un motivo de inhibición inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM, V/IxYxxL/V). PD-1 se une únicamente a PD-L1 y a PD-L2. Freeman *et al.*, J. Exp. Med. 192: 1-9 (2000); Dong *et al.*, Nature Med. 5: 1365-1369 (1999); Latchman *et al.*, Nature Immunol. 2: 261-268 (2001); Tseng *et al.*, J. Exp. Med. 193: 839-846 (2001).

PD-1 se puede expresar en células T, células B, linfocitos T citolíticos naturales, monocitos activados y células dendríticas (DC, *dendritic cells*). PD-1 se expresa en células T CD4⁺ y CD8⁺, células B y células mieloides humanas, activadas, pero no en las no estimuladas. Esto contrasta con la expresión más restringida de CD28 y CTLA-4. Nishimura *et al.*, Int. Immunol. 8: 773-80 (1996); Boettler *et al.*, J. Virol. 80: 3532-40 (2006). Existen al menos 4 variantes de PD-1 que se han clonado a partir de células T humanas activadas, incluidas las transcripciones que carecen de (i) exón 2, (ii) exón 3, (iii) exones 2 y 3 o (iv) exones 2 a 4. Nielsen *et al.*, Cell. Immunol. 235: 109-16 (2005). A excepción de PD-1 Δ ex3, todas las variantes se expresan a niveles similares a los de PD-1 de longitud completa en células mononucleares de sangre periférica (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) en reposo. La expresión de todas las variantes se induce significativamente tras la activación de células T humanas con anti-CD3 y anti-CD28. Las variantes de PD-1 Δ ex3 carecen de un dominio transmembrana y se parecen a CTLA-4 soluble, que desempeña un papel importante en la autoinmunidad. Ueda *et al.*, Nature 423: 506-11 (2003). Esta variante está enriquecida en el líquido sinovial y en el suero de pacientes con artritis reumatoide. Wan *et al.*, J. Immunol. 177: 8844-50 (2006). Los dos ligandos de PD-1 difieren en sus patrones de expresión. PD-L1 se expresa de manera constitutiva en células T y B, en CD, macrófagos, células madre mesenquimatosas y mastocitos derivados de la médula ósea de ratón. Yamazaki *et al.*, J. Immunol. 169: 5538-45 (2002). PD-L1 se expresa en una amplia gama de células no hematopoyéticas (p. ej., células de la córnea, pulmón, epitelio vascular, no parenquimatosas del hígado, células madre mesenquimatosas, islotes pancreáticos, sintiotrofoblastos placentarios, queratinocitos, etc.) [Keir *et al.*, Annu. Rev. Immunol. 26: 677-704 (2008)], y está regulado positivamente en diversos tipos de células después de la activación. El interferón (IFN) tanto de tipo I como de tipo II, regula positivamente a PD-L1. Eppihimer *et al.*, Microcirculation 9: 133-45 (2002); Schreiner *et al.*, J. Neuroimmunol. 155: 172-82 (2004). La expresión de PD-L1 en líneas celulares disminuye cuando MyD88, TRAF6 y MEK están inhibidos. Liu *et al.*, Blood 110: 296-304 (2007). JAK2 también se ha implicado en la inducción de PD-L1. Lee *et al.*, FEBS Lett. 580: 755-62 (2006); Liu *et al.*, Blood 110: 296-304 (2007). La pérdida o inhibición del homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN, *phosphatase and tensin*), una fosfatasa celular que modificó la señalización de fosfoinositol 3-cinasa (PI3K) y de Akt, aumento de la expresión postranscripcional de PD-L1 en cánceres. Parsa *et al.*, Nat. Med. 13: 84-88 (2007).

La expresión de PD-L2 es más restringida que la de PD-L1. PD-L2 se expresa de manera inducible en las DC, en los macrófagos y en los mastocitos derivados de médula ósea. PD-L2 también se expresa en aproximadamente de la mitad a dos tercios de las células B1 peritoneales en reposo, pero no en las células B2 B convencionales. Zhong *et al.*, Eur. J. Immunol. 37: 2405-10 (2007). Las células PD-L2⁺ B1 se unen a la fosfatidilcolina y pueden ser importantes para las respuestas inmunitarias innatas contra antígenos bacterianos. La inducción de PD-L2 por el IFN- γ depende parcialmente de NF- κ B. Liang *et al.*, Eur. J. Immunol. 33: 2706-16 (2003). PD-L2 también puede inducirse en monocitos y macrófagos mediante GM-CSF, IL-4 e IFN- γ . Yamazaki *et al.*, J. Immunol. 169: 5538-45 (2002); Loke *et al.*, PNAS 100:5336-41 (2003).

La señalización de PD-1 suele tener un mayor efecto sobre la producción de citocinas que sobre la proliferación celular, con efectos significativos sobre la producción de IFN- γ , TNF- α e IL-2. La señalización inhibitoria mediada por PD-1 también depende de la intensidad de la señalización del TCR, con una mayor inhibición suministrada a niveles bajos de estimulación de TCR. Esta reducción puede superarse mediante coestimulación a través de CD28 [Freeman *et al.*, J. Exp. Med. 192: 1027-34 (2000)] o de la presencia de IL-2 [Carter *et al.*, Eur. J. Immunol. 32: 634-43 (2002)].

Cada vez hay más pruebas de que la señalización a través de PD-L1 y PD-L2 puede ser bidireccional. Es decir, además de modificar la señalización TCR o BCR, la señalización también puede devolverse a las células que expresan

PD-L1 y PD-L2. Mientras que el tratamiento de las células dendríticas con un anticuerpo anti-PD-L2 naturalmente humano aislado de un paciente con macroglobulinemia de Waldenstrom no aumentó la regulación positiva de las moléculas costimulatoras MHC II o B7, dichas células produjeron una mayor cantidad de citocinas proinflamatorias, particularmente TNF- α e IL-6, y estimuló la proliferación de células T. Nguyen *et al.*, J. Exp. Med. 196: 1393-98 (2002). El tratamiento de ratones con este anticuerpo también (1) mejoró la resistencia al melanoma b16 trasplantado y rápidamente indujo CTL específicos de tumor. Radhakrishnan *et al.*, J. Immunol. 170: 1830-38 (2003); Radhakrishnan *et al.*, Cancer Res. 64: 4965-72 (2004); Heckman *et al.*, Eur. J. Immunol. 37: 1827-35 (2007); (2) bloqueó el desarrollo de enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias en un modelo de ratón con asma alérgica. Radhakrishnan *et al.*, J. Immunol. 173: 1360-65 (2004); Radhakrishnan *et al.*, J. Allergy Clin. Immunol. 116: 668-74 (2005).

Otras pruebas de la señalización inversa en células dendríticas ("DC") proceden de estudios de DC derivadas de médula ósea cultivadas con PD-1 soluble (dominio EC de PD-1 fusionado a la región constante de Ig - "s-PD-1"). Kuipers *et al.*, Eur. J. Immunol. 36: 2472-82 (2006). Este sPD-1 inhibió la activación de DC y aumentó la producción de IL-10, de manera reversible mediante la administración de anti-PD-1.

Adicionalmente, varios estudios muestran un receptor para PD-L1 o PD-L2 que es independiente de PD-1. B7.1 ya ha sido identificado como compañero de unión para PD-L1. Butte *et al.*, Immunity 27: 111-22 (2007). Los estudios de entrecruzamiento químico sugieren que PD-L1 y B7.1 pueden interactuar a través de sus dominios similares a IgV. Las interacciones entre B7.1:PD-L1 pueden inducir una señal inhibitoria en las células T. El ligamiento de PD-L1 en células T CD4+ mediante B7.1 o el ligamiento de B7.1 en células T CD4+ mediante PD-L1, suministra una señal inhibitoria. Las células T que carecen de CD28 y CTLA-4 muestran una disminución en la proliferación y producción de citocinas, cuando se estimulan con perlas recubiertas con anti-CD3 y B7.1. En las células T que carecen de todos los receptores para B7.1 (es decir, CD28, CTLA-4 y PD-L1), la proliferación y la producción de citocinas de las células T, ya no fueron inhibidas por las perlas recubiertas con anti-CD3 y B7.1. Esto indica que B7.1 actúa específicamente a través de PD-L1 en las células T en ausencia de CD28 y CTLA-4. De manera similar, las células T que carecen de PD-1 mostraron una menor proliferación y producción de citocinas cuando se estimularon en presencia de perlas recubiertas con anti-CD3 y PD-L1, lo que demuestra el efecto inhibitorio del ligamiento de PD-L1 en B7.1 en células T. Cuando las células T carecen de todos los receptores conocidos para PD-L1 (es decir, sin PD-1 y B7.1), la proliferación de células T ya no se vio afectada por las perlas recubiertas con anti-CD3 y PD-L1. Por tanto, PD-L1 puede ejercer un efecto inhibitorio sobre las células T a través de B7.1 o PD-1.

La interacción directa entre B7.1 y PD-L1 sugiere que la comprensión actual de la coestimulación es incompleta y subraya la importancia de la expresión de estas moléculas en las células T. Estudios de células T PD-L1^{-/-} indican que PD-L1 en las células T puede regular negativamente la producción de citocinas de las células T. Latchman *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 10691-96 (2004). Debido a que tanto PD-L1 como B7.1 se expresan en células T, células B, DC y macrófagos, existe la posibilidad de que se produzcan interacciones direccionales entre B7.1 y PD-L1 en estos tipos de células. Adicionalmente, PD-L1 en células no hematopoyéticas puede interactuar con B7.1 así como con PD-1 en células T, planteando la cuestión de si PD-L1 está implicado en su regulación. Una posible explicación del efecto inhibitorio de la interacción entre B7.1:PD-L1 es que la célula T PD-L1 puede atrapar o segregar APC B7.1 de la interacción con CD28.

Como resultado, el antagonismo de la señalización a través de PD-L1, incluido el bloqueo de PD-L1 para que no interactúe con PD-1, B7.1 o ambos, impidiendo así que PD-L1 envíe una señal coestimuladora negativa a las células T y a otras células presentadoras de antígeno, es probable que mejore la inmunidad en respuesta a la infección (p. ej., de corta duración y crónica) e inmunidad tumoral. Además, los anticuerpos anti-PD-L1 de la presente invención, pueden combinarse con antagonistas de otros componentes de señalización PD-1:PD-L1, por ejemplo, anticuerpos antagonistas anti-PD-1 y anti-PD-L2.

4. B7-H3

También se proporcionan señales coestimuladoras a través de B7-H3 (B7RP-2, CD276, PRO352), que se expresa ampliamente en tejidos linfoides y no linfoides. Chapoval *et al.*, Nat. Immunol. 2: 269-74 (2001). En el ser humano, B7-H3 tiene una variante de 4Ig y una de 2Ig, predominando la forma 4Ig, mientras que en el ratón predomina la variante 2Ig. Sun *et al.*, J. Immunol. 168: 6294-97 (2002); Steinberger *et al.*, J. Immunol. 172: 2352-59 (2004); Ling *et al.*, Genomics 82: 365-77 (2003).

Estudios recientes han demostrado que B7-H3 es tanto un estimulador como un inhibidor de las respuestas de las células T. Una prueba de la activación estimuladora es la siguiente: (1) Junto con anti-CD3, las fusiones B7-H3/Ig coestimularon la proliferación de células T CD4+ y CD8+, y estimularon la actividad lítica de IFN- γ y CD8, Chapoval *et al.*, Nat. Immunol. 2: 269-74 (2001); y (2) la inyección del plásmido de expresión B7-H3 en tumores de un modelo de linfoma EL-4 dio como resultado una regresión completa del 50 % de los tumores, que dependía de las células T CD8+ y de las células NK (*natural killer*). Sin embargo, varios estudios recientes han demostrado un papel inhibitorio de esta molécula. Las desactivaciones en APC de B7-H3^{-/-} muestran un aumento del doble en la proliferación de células T alorreactivas en una respuesta de MLR (*mixed-lymphocyte reactions*, reacciones mixtas de linfocitos). La activación de las células T CD4 por anti-CD3 y anti-CD28 se inhibió en HLA-DR2 transfectado con cualquiera de las formas de B7-H3. Ling *et al.*, Genomics 82: 365-77 (2003). El resultado fue una reducción de la proliferación y

producción de IFN- γ , TNF- α , IL-10 y GM-CSF. La conciliación de estos estudios podría residir en la existencia de dos receptores para B7-H3 con funciones opuestas, similar a cómo CD28 y CTLA-4 regulan la señalización a través de B7.1 y B7.2.

- 5 Como resultado, el bloqueo de la señalización de B7-H3 puede contribuir a mejorar la respuesta inmunitaria a la infección y la inmunidad tumoral cuando se combina con los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención.

5. B7-H4

- 10 La incorporación más reciente a la familia B7 es B7-H4 (B7x, B7-S1, B7-H.5, VTCN1, PRO1291), que es un regulador negativo de las respuestas de las células T. Zang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (18), 10388-10392 (2003); Watanabe *et al.*, Nat. Immunol. 4 (7), 670-679 (2003); Prasad, *et al.*, Immunity 18(6), 863-873 (2003); Sica *et al.*, Immunity 18 (6), 849-861 (2003). Tanto B7-H4 de ser humano como de ratón, se expresa ampliamente en órganos linfoides (bazo y timo) y en órganos no linfoides (incluidos pulmón, hígado, testículos, ovario, placenta, músculo esquelético, páncreas e intestino delgado). B7-H4 no se detecta en tejidos humanos normales mediante IHQ (inmunohistoquímica) o regulación de B7-H4 a nivel de la traducción. La IHQ muestra que B7-H4 se expresa a altos niveles en tumores de pulmón y ovario, y el análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) en tiempo real, indica que B7-H4 de ratón también se expresa a altos niveles en líneas celulares de carcinoma de próstata, pulmón y colon. B7-H4 se une a un receptor aún desconocido en células T activadas pero no diferenciadas que son distintas de CTLA-4, ICOS, PD-1 y el receptor de B7-H3. Aunque inicialmente se indicó que BTLA era el ligando de B7-H4, la unión indicada de fusiones B7-H4/Ig a células de tipo silvestre, pero no BTLA^{-/-}, obliga a concluir que HVEM, y no BTLA, es el ligando exclusivo de B7-H4. Sedy *et al.*, Nat. Immunol. 6: 90-98 (2004).

- 25 Los estudios con transfectantes B7-H4 y fusiones B7-H4/Ig inmovilizadas, demuestran que B7-H4 suministra una señal que inhibe la proliferación de células T CD4⁺ y CD8⁺ mediada por TCR, la progresión del ciclo celular en la fase G0/G1 y la producción de IL-2. Sica *et al.*, Immunity 18: 849-61 (2003); Zang *et al.*, PNAS 100: 10388-92 (2003); Prasad *et al.*, Immunity 18: 863-73 (2003). La coestimulación de B7.1 no puede superar la inhibición inducida por B7-H4/Ig. El bloqueo del anticuerpo anti-B7-H4 aumentó la proliferación de células T y la producción de IL-2 *in vitro*. La administración *in vivo* del anticuerpo anti-B7-H4 proporcional a la administración de hemocianina de lapa californiana (KLH, *keyhole limpet hemocyanin*) en adyuvante completo de Freund (CFA, *complete Freund's adjuvant*), condujo a un aumento moderado en la producción de IgM del anticuerpo anti-KLH y a un aumento de dos a tres veces en la proliferación de células T y a la producción de IL-2 después de la reestimulación *in vitro* con KLH, lo que sugiere una mayor sensibilización de células T *in vivo* en presencia de anti-B7-H4. El anticuerpo bloqueante anti-B7-H4 aceleró notablemente la aparición y la gravedad de la EAE en niveles elevados de células T CD4⁺ y CD8⁺ y macrófagos CD11b⁺ en el cerebro de un modelo de ratón autoinmune tratado con anti-B7-H4. Los datos experimentales combinados disponibles sobre B7-H4 sugieren que puede regular negativamente las respuestas inmunitarias en los tejidos periféricos y desempeñar un papel en la regulación de la tolerancia de las células T. La expresión de B7-H4 también puede desempeñar un papel en la evasión de las respuestas inmunitarias del hospedador en la inmunidad tumoral. Choi *et al.*, J. Immunol. 171: 4650-54 (2003). Como resultado, el antagonismo de B7-H4 puede ser útil para mejorar la respuesta inmunitaria a la infección y la inmunidad tumoral cuando se combina con los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención.

6. BTLA:

- 45 El miembro de la familia B7 BTLA (CD272, BTLA-1) es funcionalmente similar a PD-1 y CTLA. Inicialmente identificado como un marcador selectivo para las células Th1, BTLA sólo se expresa en linfocitos. Similar a CTLA-4, ICOS y PD-1, BTLA se induce en las células T durante la activación. Sin embargo, a diferencia de ICOS, que permanece elevado en células Th2, pero está regulado negativamente en células Th1, BTLA permanece expresado en células Th1, pero no en células Th2. Similar a PD-1, BTLA también se expresa en células B. Gavrieli *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 312: 1236-43 (2003). Sin embargo, BTLA se expresa tanto en células B activadas como en reposo, mientras que PD-1 está regulado positivamente en células B activadas. BTLA tiene dos motivos ITIM.

- 55 BTLA ejerce efectos inhibidores sobre los linfocitos B y T. Watanabe *et al.*, Nat. Immunol. 4: 670-79 (2003). Las células B BTLA^{-/-} muestran una respuesta moderada al anti-IgM, pero una mayor respuesta al anti-CD3 *in vitro*. Las células Th1 BTLA^{-/-} polarizadas muestran aproximadamente un aumento del doble en la proliferación en respuesta a la exposición al antígeno, *in vitro*. *In vivo*, los ratones BTLA^{-/-} muestran un aumento del triple en las respuestas de anticuerpos específicos de hapteno y una mayor susceptibilidad a la EAE. El fenotipo de los ratones BTLA^{-/-} se parece al fenotipo de los ratones PD-1^{-/-}, mostrando una mayor susceptibilidad a la autoinmunidad, aunque fenotipos más sutiles que los de los ratones CTLA-4^{-/-}. Sin embargo, dado su papel como regulador negativo, el bloqueo de BTLA puede resultar útil para mejorar la respuesta inmunitaria en infecciones e inmunidad antitumoral cuando se combina con los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención.

- 65 De manera interesante, recientemente se ha demostrado que el miembro de la superfamilia de Ig, BTLA, también interacciona con el miembro de la familia de TNFR, HVEM. Sedy *et al.*, Nat. Immunol. 6: 90-98 (2005); Gonzalez *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 1116-1121 (2005). HVEM se analiza más adelante en el apartado Coestimuladores de la Familia de TNFR.

E. Coestimuladores de la Familia de TNFR

1. Ratones con deficiencia de OX40/OX40L (CD134)

OX40 (CD134, TXPG1L, TNFRSF4) y OX40L (CD134L, CD252, GP34, TNFSF4, TXGP1), presentan respuestas reducidas de células T CD4+ primarias tanto frente a antígenos víricos y proteicos comunes como en reacciones de sensibilidad por contacto. Chen *et al.*, *Immunity* 11: 689-698 (1999); Kopf *et al.*, *Immunity* 11: 699-708 (1999); Murata *et al.*, *J. Exp. Med.* 191: 365-374 (2000); Gramaglia *et al.*, *J. Immunol.* 165: 3043-3050 (2000). Al final de la respuesta primaria se generan frecuencias más bajas de células T efectoras específicas de antígeno y se desarrollan menos células T de memoria. Gramaglia *et al.*, citado anteriormente. A diferencia de las células T deficientes en CD27, la proliferación temprana no se ve afectada en poblaciones de células T CD4+ indiferenciadas que son deficientes en OX40. Sin embargo, se produce una proliferación reducida y una marcada muerte celular apoptótica 4-5 días después de la activación, con el resultado de que pocas células T sobreviven a largo plazo. Rogers *et al.*, *Immunity* 15: 445-455 (2001). Con células T CD8+ deficientes en OX40, la división celular inicial no se ve afectada, pero la acumulación de células efectoras primarias se reduce notablemente entre 3 y 6 días después del encuentro con el antígeno. Croft *et al.*, *Nat. Immunol.* 3: 609-620 (2003).

La expresión transgénica de OX40L por células dendríticas o células T aumentó la cantidad de células T CD4+ que responden al antígeno y produce síntomas de tipo autoinmunitario que se asocian con una activación aberrante de las células T. Brouck *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 29: 1610-1616 (1999); Murata *et al.*, *J. Immunol.* 169: 4628-4636 (2002). Después de la inmunización, la inyección de anticuerpos agonistas anti-OX40 da como resultado la acumulación de una mayor cantidad de células T CD4+ reactivas al antígeno en el pico de la respuesta primaria y un aumento concomitante del número de células T de memoria que se generan. Gramaglia *et al.*, citado anteriormente., Bansal-Pakala *et al.*, *Nature Med.* 7: 907-912 (2001), Maxwell *et al.*, *J. Immunol.* 164: 107-112 (2000); Weatherill *et al.*, *Cell. Immunol.* 209: 63-75 (2001). Cuando los ratones sensibilizados con antígeno se tratan con un anticuerpo agonista específico de OX40, se produce una mayor acumulación de CTL efectores primarios. De Smedt *et al.*, *J. Immunol.* 168: 661-670 (2002).

Se cree que OX40 proporciona una señal de acción tardía que permite la supervivencia de células efectoras recién generadas en el pico de la respuesta inmunitaria primaria. También hay pruebas convincentes de que OX40 actúa en sentido descendente con respecto a CD28; además del aumento de la expresión de OX40 mediado por las señales de CD28, el análisis funcional de la deficiencia de CD28 frente a la deficiencia de OX40 ha demostrado que las respuestas tempranas de las células T primarias están notablemente alteradas en ausencia de señales de CD28, aunque sólo las respuestas tardías se ven afectadas en ausencia de señales de OX40. Rogers *et al.*, *Immunity* 15: 445-455 (2001); Bertram *et al.*, *J. Immunol.* 168: 3777-3785 (2002).

Como resultado, es probable que la activación de OX40/OX40L, tal como mediante la aplicación de anticuerpos agonistas, pueda ser útil cuando se combina con los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención para tratar trastornos disfuncionales de células T.

2. 4-1BB (CD137)/4-1BBL,

De manera similar a OX40/OX40L, las células T deficientes en 4-1BB (CD137, TNFRSF9) y 4-1BBL (TNFSF9), muestran que se acumulan menos células T CD8+ reactivas al antígeno en las respuestas primarias cuando 4-1BBL está ausente y se desarrollan menos células T de memoria. DeBenedette *et al.*, *J. Immunol.* 163: 4833-4841 (1999); Tan *et al.*, *J. Immunol.* 163: 4859-4868 (1999); Tan *et al.*, *J. Immunol.* 164: 2320-2325 (2000). Además, el bloqueo de 4-1BBL no altera la respuesta proliferativa inicial de las células T CD8+, pero suprime la acumulación de CTL efectores en el pico de la respuesta primaria después de 3-6 días, debido a la apoptosis de células que se han dividido varias veces. Cooper *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 32: 521-529 (2002). Los anticuerpos agonistas anti-4-1BB y las APC transfectadas con anti-4-1BBL también han producido resultados similares: las respuestas de CTL y de células T CD4+ aumentan notablemente *in vivo*. Melero *et al.*, *Nature Med.* 3: 682-685 (1997); Melero *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 28: 1116-1121 (1998); Takahashi *et al.*, *J. Immunol.* 162: 5037-5040 (1999); Guinn *et al.*, *J. Immunol.* 162: 5003-5010 (1999); Halstead *et al.*, *Nature Immunol.* 3: 536-541 (2002); Takahashi *et al.*, *Immunol. Lett.* 76: 183-191 (2001); Bansal-Pakala *et al.*, *J. Immunol.* 169: 5005-5009 (2002). El anticuerpo específico 4-1BB no altera la respuesta proliferativa inicial, corroborando las conclusiones de los experimentos de bloqueo de 4-1BBL y señalando la actividad tardía de 4-1BB en el suministro de señales de supervivencia celular.

Al igual que OX40, se cree que 4-1BB proporciona una señal de acción tardía que permite la supervivencia de células efectoras recién generadas en el pico de la respuesta inmunitaria primaria. También hay pruebas convincentes de que 4-1BB actúa más tarde que CD28 - además de aumentar la expresión de OX40 y 4-1BB mediada por señales de CD28, el análisis funcional de la deficiencia de CD28 frente a la deficiencia de 4-1BB ha demostrado que las respuestas tempranas de las células T primarias están notablemente alteradas en ausencia de señales de CD28, aunque sólo las respuestas tardías se ven afectadas en ausencia de señales de OX40. Rogers *et al.*, *Immunity* 15: 445-455 (2001); Bertram *et al.*, *J. Immunol.* 168: 3777-3785 (2002).

El anticuerpo agonista anti-CD137 puede inducir regresión tumoral en el cáncer en donde los CTL CD8+ desempeñan un papel central. Melero *et al.*, Nat. Med. 3: 682-5 (1997); Hirano *et al.*, Cancer Res. 65(3): 1089-96 (2005). La expresión constitutiva e inducible de PD-L1 confiere resistencia a dichos tumores, que es reversible tras el bloqueo de PD-L1. Hirano *et al.*

5 Como resultado, es probable que la activación de 4-1BB/4-BBL, tal como a través de la aplicación de anticuerpos agonistas, particularmente junto con antagonistas de PD-L1 (p. ej., el anticuerpo anti-PD-L1) puede ser útil para tratar trastornos disfuncionales de las células T.

10 3. CD27/CD27L (CD70)

La importancia de la señalización de CD27 (TNFRSF7, S152) y CD27L (CD70, TNFSF7) en las fases iniciales de una respuesta de células T se ha demostrado en estudios de bloqueo *in vitro*, en donde se interrumpieron las interacciones CD27/CD70. Oshima *et al.*, Int. Immunol. 10: 517-526 (1998); Agematsu *et al.*, J. Immunol. 153: 1421-1429 (1994); Hintzen *et al.*, J. Immunol. 154: 2612-2623 (1995). Las células T que carecen de CD27 inicialmente se dividen con normalidad, pero después proliferan escasamente 3 o más días después de la activación. Hendriks *et al.*, Nature Immunol. 1: 433-440 (2000). Esto indica que CD27 participa en la promoción de la expansión inicial de la población de células T indiferenciadas, ya sea mediante la supresión temprana de la muerte de las células T o actuando sobre el ciclo celular permitiendo una división sostenida 2-3 días después de la activación. Esto se ve reforzado por estudios *in vivo* de ratones con deficiencia de CD27, en los que se desarrolla un menor número de respuestas específicas de antígeno (días 4-8) y menos células T de memoria durante 3 o más semanas. Hendriks *et al.*, citado anteriormente. La expresión de CD27 se regula positivamente poco después de la activación de las células T, lo que sugiere que envía principalmente señales que mantienen la proliferación temprana, antes del pico de la respuesta efectora.

25 Como resultado, es probable que la activación de CD27/CD27L, incluso a través de la aplicación de anticuerpos agonistas, particularmente junto con los anticuerpos anti-PD-L1 descritos en el presente documento, puede ser útil para tratar trastornos disfuncionales de las células T.

30 4. CD30/CD30L (CD153)

La señalización de CD30 (TNFRSF8, Ki-1) y CD30L (CD153, TNFSF8) es coestimuladora de varias funciones de las células T *in vitro*. Del Prete *et al.*, J. Exp. Med. 182: 1655-1661 (1995), Bowen *et al.*, J. Immunol. 156: 442-449 (1995). Los reactivos de bloqueo contra CD30L suprimieron el desarrollo de células Th2 y mejoraron el desarrollo de células Th1 *in vitro*. Esta actividad concuerda con los datos que muestran que CD30 se expresa preferentemente en células Th2 y células Tc2 citotóxicas tipo 2. Del Prete *et al.*, citado anteriormente, Nakamura *et al.*, J. Immunol. 158: 2090-2098 (1996). CD30 se expresa 3-4 días después de la activación de células T indiferenciadas en respuestas primarias no polarizadas. Nakamura *et al.*, citado anteriormente, lo que indica que su papel no se limita a las respuestas dominadas por citocinas tipo 2.

40 Aunque los mecanismos exactos de la señalización de CD30/CD30L no están claros, se ha sugerido que podrían ser similares a los de OX40 y 4-1BB. Cuando las células T CD8+ específicas de antígeno transferidas de forma adoptiva se transfieren a ratones con deficiencia de CD30L, éstas no se acumulan en grandes cantidades en el pico de una respuesta primaria y se desarrollan menos células T de memoria. Como resultado, CD30 también podría proporcionar señales de proliferación y/o supervivencia para permitir la generación de un gran número de células T específicas de antígeno en el pico de las respuestas primarias.

45 Como resultado, es probable que la activación de CD27/CD27L, incluso a través de la aplicación de anticuerpos agonistas, particularmente junto con los anticuerpos anti-PD-L1 descritos en el presente documento, puede ser útil para tratar trastornos disfuncionales de las células T.

50 5. HVEM/LIGHT

El efecto de HVEM (HVEA, ATAR, LIGHTR, TNFRSF14, PRO509) y LIGHT (CD258, HVEM, TR2, TNFSF14, PRO726) sobre la coestimulación de células T se complica por 1) la capacidad de LIGHT para unirse también al receptor de linfotóxina-β (LTβR) y 2) HVEM para unirse a LTA3 soluble. Por tanto, cualquier estudio del efecto de HVEM/LIGHT también debería tener en cuenta el efecto de otros compañeros de unión para este sistema de señalización. El bloqueo de LIGHT puede inhibir la proliferación temprana de células T y la secreción de citocinas en reacciones linfocitarias mixtas (MLR, *mixed-lymphocyte reactions*) alogénicas. Tamada *et al.*, J. Immunol. 164: 4105-4110 (2000), Kwon *et al.*, J. Biol. Chem. 272: 14272-14276 (1997); Harrop *et al.*, J. Immunol. 161: 1786-1794 (1998); Tamada *et al.*, Nature Med. 6: 283-289 (2000). La producción de citocinas proinflamatorias se suprime cuando LIGHT se bloquea en aloinjertos de corazón incompatibles con el MHC. Ye *et al.*, J. Exp. Med. 195: 795-800 (2002). Así mismo, los injertos de piel alogénicos se rechazan con cinética retardada en receptores con deficiencia tanto de LIGHT como de CD28. Scheu *et al.*, J. Exp. Med. 195: 1613-1624 (2002). Esto sugiere que el rechazo retardado del injerto podría indicar una supresión temprana de la expansión clonal de las células T o de la producción de citocinas. Esta conclusión se ve reforzada por (i) estudios *in vitro* que muestran que los esplenocitos deficientes en LIGHT, que responden al aloantígeno, tienen una producción reducida de citocinas TH1 y TH2 y una generación débil de actividad

de linfocitos T citotóxicos (CTL, *cytotoxic T lymphocyte*) [Sheu *et al.*, citado anteriormente], y (ii) estudios *in vivo* que muestran que el bloqueo de LIGHT reduce la generación de CTL alorreactivos. Tamada *et al.*, Nature Med. 6: 283-289 (2000).

5 Como resultado, el HVEM/LIGHT, tal como a través de la aplicación de anticuerpos agonistas, particularmente junto con los anticuerpos anti-PD-L1 descritos en el presente documento, puede ser útil para tratar trastornos disfuncionales de las células T.

10 II. Definiciones

10 Un "alérgeno" o "inmunógeno" es cualquier molécula que puede desencadenar una respuesta inmunitaria. Como se utiliza en el presente documento, el término incluye la propia molécula antigénica o su fuente, tal como grano de polen, caspa animal, veneno de insecto o producto alimenticio. Se contrapone al término *antígeno*, que se refiere a una molécula que puede reconocer específicamente una inmunoglobulina o un receptor de células T. Cualquier sustancia exógena capaz de inducir una respuesta inmunitaria es un posible alérgeno. Se sabe que muchos productos químicos diferentes, tanto de origen natural como sintético, son alergénicos. Los productos químicos orgánicos naturales complejos, especialmente las proteínas, probablemente causan alergia mediada por anticuerpos, mientras que los compuestos orgánicos sencillos, los productos químicos inorgánicos y los metales, causan más preferentemente alergia mediada por células T. En algunos casos, el mismo alérgeno puede ser responsable de más de un tipo de alergia. La exposición al alérgeno puede ser por inhalación, inyección, inyección o contacto con la piel.

20 "*Disfunción*" en el contexto de disfunción inmunitaria, se refiere a un estado de capacidad de respuesta inmunitaria reducida a la estimulación antigénica. El término incluye los elementos comunes de *agotamiento y/o anergia* en los que se puede producirse el reconocimiento antigénico, pero la respuesta inmunitaria resultante es ineficaz para controlar la infección o el crecimiento tumoral.

25 "*Tolerancia* " o "*tolerancia inmunológica* " es la incapacidad del sistema inmunitario para generar una respuesta inmunitaria defensiva contra un antígeno en particular. La tolerancia puede ser natural o propia, en donde el organismo no ataca a sus propias proteínas y antígenos, o puede ser inducida, resultante de la manipulación del sistema inmunitario. Durante el desarrollo de los linfocitos se produce *tolerancia central* y opera en el timo y la médula ósea. Durante este proceso, los linfocitos T y B que reconocen autoantígenos se eliminan antes de desarrollarse en células completamente inmunocompetentes. Este proceso es más activo durante el desarrollo fetal, pero continúa durante toda la vida a medida que se generan linfocitos inmaduros. *Tolerancia de células T periféricas* se refiere a una falta de respuesta funcional a los autoantígenos que están presentes en los tejidos periféricos y se produce después de que las células T y B maduren y entren en la periferia. Estos procesos incluyen la supresión de células autorreactivas por parte de células T "reguladoras" y la generación de hiporreactividad (anergia) en los linfocitos que se encuentran con el antígeno en ausencia de las señales coestimuladoras que acompañan a la inflamación. "*Tolerancia adquirida o inducida* "se refiere a la adaptación del sistema inmunitario contra antígenos externos caracterizada por una no reactividad específica de los tejidos linfoides a un antígeno determinado que, en otras circunstancias, probablemente induciría inmunidad humoral o mediada por células. En adultos, la tolerancia puede inducirse clínicamente mediante la administración repetida de dosis muy grandes de antígeno, o de dosis pequeñas que están por debajo del umbral requerido para la estimulación de una respuesta inmunitaria, tal como mediante administración intravenosa o sublingual de antígenos solubles. La inmunosupresión también facilita la inducción de tolerancia. La destrucción de la autotolerancia puede conducir a la *autoinmunidad*.

35 "*Mejorar la función de las células T*" significa inducir, provocar o estimular una célula T para que tenga una función biológica sostenida o amplificada, o renovar o reactivar células T agotadas o inactivas. Como ejemplos de mejora de la función de las células T se incluyen: aumento de la secreción de interferón γ y de las células T CD8+, aumento de la proliferación, aumento de la capacidad de respuesta al antígeno (p. ej., eliminación de virus o patógenos) en relación con dichos niveles antes de la intervención. El nivel de mejora podrá ser de al menos 50 %, como alternativa 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 120 %, 150 %, 200 %. Cualquier experto en la materia sabe cómo medir esta mejora.

45 Un "*trastorno disfuncional de las células T*" es un trastorno o afección de las células T caracterizado por una menor capacidad de respuesta a la estimulación antigénica. Un trastorno disfuncional de las células T puede ser un trastorno que se asocie específicamente con un aumento inadecuado de la señalización a través de PD-1. Un trastorno disfuncional de las células T es uno en el que las células T son anérgicas o han disminuido su capacidad de respuesta para secretar citocinas, proliferar o ejecutar actividad citolítica. En un aspecto específico, la disminución de la capacidad de respuesta puede dar como resultado un control ineficaz de un patógeno o tumor que expresa un inmunógeno. Como ejemplos de trastornos disfuncionales de células T caracterizados por disfunción de células T se incluyen infección de corta duración no resuelta, infección crónica e inmunidad tumoral.

55 "*Infección crónica*" Se refiere a una infección en la que un agente infeccioso (p. ej., patógenos como virus, bacterias, parásitos protozoarios, hongos o similares) ha inducido una respuesta inmunitaria en el hospedador infectado, pero no se ha clarificado o eliminado de ese hospedador como ocurre durante una *infección de corta duración*. Las infecciones crónicas pueden ser *persistentes, latentes o lentas*. Si bien las infecciones de corta duración suelen resolverse normalmente gracias al sistema inmunitario en algunos días o semanas (p. ej., gripe), las *infecciones*

persistentes puede persistir a un nivel relativamente bajo durante meses, años, décadas o durante toda la vida (p. ej., Hepatitis B). Por el contrario, una *infección latente* se caracteriza por un largo período de actividad asintomática interrumpido por un período de infección de alto grado en rápido aumento y niveles elevados de patógenos (p. ej., herpes simple). Por último, una *infección lenta* es una que se caracteriza por un aumento gradual y continuo de los síntomas de la enfermedad, tal como un largo período de incubación seguido de un ciclo clínico prolongado y progresivo que comienza después de la aparición de los síntomas clínicos. A diferencia de las infecciones latentes y persistentes, la infección lenta puede no comenzar con un período de multiplicación vírica de corta duración (p. ej., infección por picornavirus, visnavirus, tembladera de las ovejas, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob). Como agentes infecciosos ilustrativos capaces de inducir una infección crónica se incluyen virus (p. ej., citomegalovirus, virus de Epstein Barr, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus del herpes simple, tipos I y II, virus de la inmunodeficiencia humana, tipos 1 y 2, virus del papiloma humano, virus linfotrópico de células T humano, tipos 1 y 2, virus varicela zóster y similares), bacterias (p. ej., *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Borrelia spp.*, *Helicobacter pylori*, y similares), parásitos protozoarios (p. ej., *Leishmania spp.*, *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma spp.*, *Toxoplasma spp.*, *Trypanosoma spp.*, *Taenia autossiceps* y similares) y hongos (p. ej., *Aspergillus spp.*, *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Pneumocystis carinii* y similares). Otros agentes infecciosos incluyen priones o proteínas mal plegadas que afectan al cerebro o a la estructura neuronal al propagar aún más el mal plegamiento de las proteínas en estos tejidos, lo que da como resultado la formación de placas amiloides que causan la muerte celular, el daño tisular y finalmente la muerte. Ejemplos de enfermedades resultantes de una infección por priones incluyen: enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y sus variedades, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), insomnio familiar letal (IFL), kuru, tembladera de las ovejas, encefalopatía espongiiforme bovina (EEB) en el ganado (también conocida como enfermedad de las "vacas locas") y diversas otras formas de encefalopatía en animales [p. ej., encefalopatía transmisible del visón (ETM), caquexia crónica (CC) en venados de cola blanca, alce y ciervo mulo, encefalopatía espongiiforme felina, encefalopatía de ungulados exóticos (EUE) en nyala, oryx y kudu mayor, encefalopatía espongiiforme del avestruz].

"*Inmunidad tumoral*" se refiere al proceso en el que los tumores evaden el reconocimiento y el aclaramiento inmunitarios. Por tanto, como concepto terapéutico, la inmunidad tumoral se "trata" cuando dicha evasión se atenúa y los tumores son reconocidos y atacados por el sistema inmunitario. Como ejemplos de reconocimiento de tumores se incluyen unión tumoral, reducción tumoral y eliminación tumoral.

Un "*antagonista coestimulador B7 negativo*" ("*BNCA, B7-negative costimulatory antagonist*") es un agente que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere con la señal coestimuladora negativa mediada por o a través de proteínas de la superficie celular expresadas en linfocitos T mediadas por un miembro de la familia B7. En un aspecto, un BNCA, solo o junto con los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención, puede hacer que una célula T disfuncional deje de serlo. En otro aspecto, un BNCA puede ser un agente que inhiba la síntesis de ácidos nucleicos o de proteínas, la expresión, la señalización y/o el procesamiento posterior a la expresión de una molécula coestimuladora B7 negativa. En otro aspecto más, un BNCA es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, un oligopéptido de BNCA, un ARNi de BNCA o una molécula pequeña de BNCA que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere con, la transducción de señales por una molécula coestimuladora B7 negativa. Como ejemplos de moléculas coestimuladoras B7 negativas se incluyen: CTLA-4, PD-L1, PD-1, B7.1 (que se expresa en células T), PD-L2, B7-H3 y B7-H4.

Un *agonista coestimulador positivo* es una molécula que incrementa, mejora, aumenta o facilita una señal coestimuladora mediada por o a través de proteínas de la superficie celular expresadas en las células T. En un aspecto, una molécula coestimuladora positiva puede ser un dominio extracelular, una construcción soluble o un anticuerpo agonista que activa una vía coestimuladora positiva. Como ejemplos de moléculas coestimuladoras positivas se incluyen las moléculas de la superfamilia B7, p. ej., B7.1, B7.2, CD28 e ICOS/ICOSL. Otros ejemplos incluyen las moléculas coestimuladoras de la familia TNFR, p. ej., OX40/OX40L, 41-BB/41-BBL, CD27/CD27L, CD30/CD30L y HVEM/LIGHT.

Una "*molécula pequeña*" o "*molécula pequeña orgánica*" es una que tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 500 Dalton.

Un "*ARN de interferencia*" "*ARNi*" es un ARN que tiene una longitud de 10 a 50 nucleótidos y que reduce la expresión de un gen diana, en donde partes de la hebra son suficientemente complementarias (p. ej., tienen una identidad de al menos 80 % con el gen diana). El método de interferencia por ARN se refiere a la supresión de la expresión génica específica de diana (es decir, "silenciamiento génico"), que ocurre a un nivel postranscripcional (p. ej., traducción), e incluye todos los mecanismos postranscripcionales y transcripcionales de inhibición de la expresión génica mediada por ARN, tal como se describe en P.D. Zamore, *Science* 296: 1265 (2002) y Hannan y Rossi, *Nature* 431: 371-378 (2004). Como se utiliza en el presente documento, El ARNi puede estar en forma ARN de interferencia pequeño (ARNip), ARN de horquilla corta (ARNhc) y/o micro ARN (miARN). Estas moléculas de ARNi son a menudo complejos de ARN bicatenario que pueden expresarse en forma de hebras de ARN complementarias o parcialmente complementarias separadas. En la técnica se conocen bien métodos para diseñar complejos de ARN bicatenario. Por ejemplo, el diseño y la síntesis de ARNhc y ARNip adecuados se puede encontrar en Sandy *et al.*, *BioTechniques* 39: 215-224 (2005).

Un "ARN de interferencia pequeño" o ARNip es un ARN bicatenario (ARNbc) de 10 a 50 nucleótidos de longitud que reduce la expresión de un gen diana, en donde partes de la primera hebra son suficientemente complementarias (p. ej., tienen una identidad de al menos 80 % con el gen diana). Los ARNip están diseñados específicamente para evitar la respuesta antiviral caracterizada por una síntesis elevada de interferón, inhibición no específica de la síntesis de proteínas y degradación del ARN que a menudo conduce al suicidio o a la muerte de la célula asociado al uso de ARNi en células de mamífero. Paddison *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 99(3): 1443-8. (2002).

El término "horquilla" se refiere a una estructura de ARN en bucle de 7 a 20 nucleótidos. Un "ARN de horquilla corta" o ARNhc es un ARN monocatenario de 10 a 50 nucleótidos de longitud caracterizado por un giro en horquilla que reduce la expresión de un gen diana, en donde partes de la hebra de ARN son suficientemente complementarias (p. ej., tienen una identidad de al menos 80 % con el gen diana). El término "bucle en tallo" se refiere a un emparejamiento entre dos regiones del mismo par de bases de una molécula para formar una doble hélice que termina en un bucle corto no emparejado, dando una estructura en forma de piruleta.

Un "micro ARN" o "miARN" (anteriormente conocido como ARNmc) es un ARN monocatenario de aproximadamente 10 a 70 nucleótidos de longitud que se transcribe inicialmente como pre-miARN caracterizado por una estructura de "bucle en tallo", que posteriormente se procesa en miARN maduro después de un procesamiento adicional a través del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, *RNA-induced silencing complex*).

Un "ARN de interferencia de BNCA" o "ARNi de BNCA" se une, preferiblemente, de manera específica, a un ácido nucleico BNCA y reduce su expresión. Esto significa que la expresión de la molécula coestimuladora B7 negativa es menor con el ARNi de BNCA presente en comparación con la expresión de la molécula coestimuladora B7 negativa en un control donde el ARNi de BNCA no está presente. El ARNi de BNCA puede identificarse y sintetizarse utilizando métodos conocidos (Shi Y., Trends in Genetics 19(1): 9-12 (2003), WO2003056012, WO2003064621, WO2001/075164, WO2002/044321).

Un "oligopéptido de BNCA" es un oligopéptido que se une, preferiblemente, de manera específica, a un polipéptido coestimulador B7 negativo, incluyendo un receptor, ligando o componente de señalización, respectivamente, como se describe en el presente documento. Dichos oligopéptidos pueden sintetizarse químicamente utilizando la metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o pueden prepararse y purificarse utilizando tecnología recombinante. Dichos oligopéptidos suelen tener una longitud de al menos aproximadamente 5 aminoácidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 aminoácidos. Dichos oligopéptidos pueden identificarse sin excesiva experimentación mediante técnicas bien conocidas. A este respecto, se observa que las técnicas para seleccionar bibliotecas de oligopéptidos para oligopéptidos que son capaces de unirse específicamente a una diana polipeptídica, son muy conocidas en el materia (véanse, p. ej., las patentes de EE.UU. n.º 5.556.762, 5.750.373, 4.708.871, 4.833.092, 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, 5.663.143; las publicaciones PCT n.º WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984); Geysen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985); Geysen *et al.*, en Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen *et al.*, J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs *et al.*, J. Immunol., 140:611-616 (1988); Cwirala, S. E. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378 (1990); Lowman, H.B. *et al.* Biochemistry, 30:10832 (1991); Clackson, T. *et al.* Nature, 352: 624 (1991); Marks, J. D. *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581 (1991); Kang, A.S. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363 (1991) y Smith, G. P., Current Opin. Biotechnol., 2:668 (1991).

Un "antagonista de molécula pequeña de BNCA" o una "molécula pequeña de BNCA" es una molécula orgánica distinta de un oligopéptido o anticuerpo como se define en el presente documento que inhibe, preferiblemente, de manera específica, a un polipéptido coestimulador B7 negativo. Dicha inhibición de la señalización coestimuladora de B7 negativo hace que, preferiblemente, una célula T disfuncional responda a la estimulación del antígeno. Los ejemplos de moléculas pequeñas de BNCA pueden identificarse y sintetizarse químicamente utilizando una metodología conocida (véanse, p. ej., las publicaciones PCT n.º WO2000/00823 y WO2000/39585). Normalmente, dichas moléculas pequeñas de BNCA tiene un tamaño inferior a aproximadamente 2000 dalton, como alternativa, un tamaño inferior a aproximadamente 1500, 750, 500, 250 o 200 dalton, son capaces de unirse, preferiblemente, de manera específica, a un polipéptido estimulador B7 negativo, como se describe en el presente documento, y pueden identificarse sin excesiva experimentación mediante técnicas bien conocidas. A este respecto, se observa que las técnicas para seleccionar bibliotecas de moléculas orgánicas para moléculas que son capaces de unirse a una diana polipeptídica, son muy conocidas en la materia (véanse, p. ej., las publicaciones PCT n.º WO00/00823 y WO00/39585).

El término "antibiótico" incluye cualquier molécula que inhibe o anula específicamente el crecimiento de microorganismos, tales como virus, bacterias, hongos o protozoos, pero no es letal para el hospedador a la concentración e intervalo de dosis administrados. Como se utiliza en el presente documento, el término *antibiótico* incluye agente antibacteriano, agente antiviral, agente antifúngico y agente antiprotozoario. En un aspecto específico, un antibiótico no es tóxico para el hospedador a la concentración e intervalos de dosis administrados. Los *antibióticos antibacterianos* o *antibacterias* puede clasificarse en términos generales como bactericidas (es decir, destruyen directamente) o bacteriostáticos (es decir, impiden la división). Los antibióticos antibactericidas se pueden subclasificar

además como de espectro reducido (es decir, sólo afectan a una pequeña clase de un subconjunto de bacterias, p. ej., gram negativas, etc.) o de amplio espectro (es decir, afectan a una clase amplia). Como ejemplos de antibióticos se incluyen: (i) aminoglucósidos, p. ej., amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, estreptomina, tobramicina, paromicina, (ii) ansamicinas, p. ej., geldanamycin, herbimicina, (iii) carbacefémicos, p. ej., loracarbef, (iv), carbapenémicos, p. ej., ertapenem, doripenem, imipenem/cilastatina, meropenem, (v) cefalosporinas (primera generación), p. ej., cefadroxilo, cefazolina, cefalotina, cefalexina, (vi) cefalosporinas (segunda generación), p. ej., cefaclor, cefamandol, cefoxitina, cefprozilo, cefuroxima, (vi) cefalosporinas (tercera generación), p. ej., cefixima, cefdinir, cefditoreno, cefoperazona, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima, ceftibuteno, ceftizoxima, ceftriaxona, (vii) cefalosporinas (cuarta generación), p. ej., cefepima, (viii), cefalosporinas (quinta generación), p. ej., ceftobiprol, (ix) glucopéptidos, p. ej., teicoplanina, vancomicina, (x) macrólidos, p. ej., axitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina, troleandomicina, telitromicina, espectinomicina, (xi) monobactamas, p. ej., axtreonam, (xii) penicilinas, p. ej., amoxicilina, ampicilina, axlocilina, carbenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, mezlocilina, metilicina, nafcilina, oxacilina, penicilina, peperacilina, ticarcilina, (xiii) polipéptidos antibióticos, p. ej., bacitracina, colistina, polimixina B, (xiv) quinolonas, p. ej., ciprofloxacino, enoxacino, gatifloxacino, levofloxacino, lomefloxacina, moxifloxacino, norfloxacino, orfloxacina, trovafloxacino, (xv) sulfonamidas, p. ej., mafenida, prontosil, sulfacetamida, sulfametizol, sulfanilamida, sulfasalazina, sulfisoxazol, trimetoprim, trimetoprima-sulfametoxazol (TMP-SMX), (xvi) tetraciclinas, p. ej., demeclociclina, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina y (xvii) otros tales como arspenamina, cloranfenicol, clindamicina, lincomicina, etambutol, fosfomicina, ácido fusídico, furazolidona, isoniazid, linezolid, metronidazol, mupirocina, nitrofurantoina, platensimicina, pirazinamida, quinupristina/dalfopristina, rifampina/rifampicina o tinidazol.

La expresión "*agente antivírico*" incluye cualquier molécula que inhibe o anula el crecimiento, la morbilidad y/o la supervivencia de virus. Esto incluye fármacos antirretrovirales, tales como (1) inhibidores de la transcriptasa inversa, incluidos, por ejemplo: (a) *inhibidores de la transcriptasa inversa análogos nucleosídicos* (NRTI, por sus siglas en inglés) (p. ej., aciclovir/faciclovir (ZOVIRAX®, ZOVIR®), cidofovir, azidotimidina/zidovudina (AZT, RETROVIR®), didanosina (ddl, VIDEX®; zalcitabina (ddC, VIHID®); estavudina (d4T, ZERIT®; lamivudina (3TC, EPIVIR®); abacavir (ZIAGEN®); emtricitabina (EMTRIVA®); brivudina (HELPIN®); entecavir (BARACLUDGE®); idoxuridina; viramidina (taribavirina de Valeant Pharmaceuticals), inhibidor de la polimerasa análogo nucleosídico de citidina PCI-6130 y variantes de profármacos (p. ej., R7128) de Pharmasset/Roche; inhibidor de análogo nucleosídico de Merck/Isis Pharmaceuticals - MK-0608, (b) *inhibidores de la transcriptasa inversa análogos nucleotídicos* (NtRTI, por sus siglas en inglés) (p. ej., tenofovir (VIREAD®); adefovir (PREVEON®, HEPSERA®); fomivirsén (VITRAVENE®); (c) inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleosídicos, (NNRTI, por sus siglas en inglés), efavirenz (SUSTIVA®, STOCRIN®); nevirapina (VIRAMUNE®), delavirdina (RESCRIPTOR®), etravirina (INTELENCE®), lovirida; inhibidor no nucleosídico de la ARN polimerasa dependiente del ARN del VHC de ViroChem Pharma - VCH-759, inhibidor no nucleosídico de la polimerasa del VHC de Pfizer - PF-868554; y (d) *inhibidores de la polimerasa*, que incluyen: ARN polimerasa dependiente de ARN del virus de la hepatitis C de Boehringer Ingelheim - BILB-1941, inhibidor de la ARN polimerasa de Roche - R1626; ACH-0137171 un inhibidor de la replicasa de Achillion Pharmaceuticals, R7128 - inhibidor de la polimerasa de Roche/Pharmasset, ABT-333 y ABT-072 - inhibidores de la polimerasa de Abbott, BI 207127 - inhibidor de la polimerasa de Boehringer Ingelheim, PSI-7851 - inhibidor de la polimerasa de Pharmasset, ANA598 - inhibidor de la polimerasa de Anadys Pharmaceuticals, MK-3281 - inhibidor de la polimerasa de Merck, IDX184 - inhibidor de la polimerasa de Idenix, GSK 625433 - inhibidor de la polimerasa de Glaxo Smith Kline, INX-189 - inhibidor de la polimerasa de Inhibitex, NM283 - inhibidor de la polimerasa de Idenix, HCV796 - inhibidor de la polimerasa de Wyeth, GL60667 y GS9190 - inhibidores de la polimerasa de Gilead, PF-00868554 0 inhibidor de la polimerasa de Pfizer, VCH759, VCH916, VX222 y VX759 - inhibidores de la polimerasa de Virochem, IDX184 e IDX375 - inhibidores de la polimerasa de Idenix, BMS650032 - inhibidor de la polimerasa de Bristol Myers Squibb; (2) *inhibidores de la proteasa* incluyendo por ejemplo: saquinavir (FOROVASE®/INVIRAR®), ritonavir (NORVIR®), indinavir (CRIVAN®), nelfinavir (VIRACEPT®), amprenavir (AGENERASE®), lopinavir (KALETRA®), atazanavir (REYATAZ®), fosamprenavir (LEXIVA®), tipranavir (APTIVUS®), darunavir (PREZISTA®), telaprevir (VX-950); los inhibidores de la proteasa del VHC de segunda generación de Vertex Pharmaceuticals - VX-500 y VX-813; el inhibidor de la proteasa NS3/4A de Intermune/Roche - ITMN-191/R-7227, boceprevir, el inhibidor de proteasa de Schering-Plough -SCH 503034, el inhibidor de proteasa HCV NS3/4A de Medivir/Tibotec - TMC435/TMC435350, ACH-1625 inhibidor de la proteasa de Achillion Pharmaceuticals, ACH-806 - inhibidor de la proteasa de Achillion/Gilead, BI201335 y BILN 2061 - inhibidores de la proteasa de Boehringer Ingelheim, SCH 900518/SP900518 (narlaprevir) - inhibidor de la proteasa de Schering-Plough, MK-7009 - inhibidor de la proteasa de Merck, BMS-650032, BMS-790052 y BMS-791325: inhibidores de la proteasa de Bristol Myeres Squibb, R7227 - inhibidor de la proteasa de Roche, PHX1766 - inhibidor de la proteasa de Phenomix, AVL-181 - inhibidor de la proteasa de Avila Therapeutics, biliverdina, CTS-1027 - inhibidor de la proteasa de Roche Biosciences, VX985 - inhibidor de la proteasa de Vertex, VCH-759 y VCH-917 - inhibidores de la proteasa de Virochem/Vertex, IDX-136 y 316: inhibidores de la proteasa de Idenix, ABT-450 - inhibidor de la proteasa de Abbott, VBY 376 - inhibidor de la proteasa de Virobay; (3) inhibidores de la integrasa, incluyendo, por ejemplo: raltegravir (ISENTRESS®), elvitegravir; (4) terapias combinadas de inhibidores de análogos nucleosídicos/análogos nucleotídicos, atipla (tenofovir + emtricitabina + efavirenz), combivir (lamivudina + zidovudina), (5) inhibidores de entrada o fusión, incluyendo, por ejemplo: maraviroc, enfuvirtida, docosanol, anticuerpo anti-CD4, anticuerpo anti-gp120, anticuerpo anti-CCR5, antagonistas de NS5a del VHC: (a) A-831, A-689 y AZD 2836 de Arrow Therapeutics, (b) BMS-790052 y BMS-824393 de Bristol Myers Squibb, (c) GSK-625433 de Glaxo Smith Kline, (d) antagonistas de NS4a ACH-1095; (5) inhibidores de la maduración, incluyendo, por ejemplo: bevirimat y vivecon; (6) inhibidores de la liberación de virus, incluyendo, por ejemplo: zanamivir (RELENZA®), oseltamivir (TAMIFLU®), arbidol; (7)

potenciadores de la respuesta inmunitaria, incluyendo, por ejemplo, interferón- α (p. ej., BLX-883 y BLX 883 CR de Biolex Therapeutics, belerofón de Nautilus Biotech, IFN- α de acción prolongada, IFN- α SR de LG Life Sciences, IFN- α 2b CR e IFN- α 2b XL de acción prolongada de Flarnel Technologies, IFN- α pegilado (p. ej., PEG-IFN- α 2a, PEGASYS[®]; PEG-IFN- α 2b, PEGINTRON[®]), proteína de fusión IFN- α 2b-seroalbúmina humana (ALBUFERON[®]);
 5 interferón- β , incluyendo IFN- β -1b (BETASERON[®]), interferón- γ , interferón- λ , interferón- λ pegilado (p. ej., PEG-rIL-29 de ZymoGenetics/Novo Nordisk), interferón- ω /interferón leucocitario II (p. ej., Intarcia Terapéutica), agonistas del receptor 7 de tipo toll, incluyendo imiquimod, isatoribina y sus variantes de profármacos (p. ej., ANA-975 y ANA-971) de Anadys Pharmaceuticals, oglufanida (IM862, L-Glu-L-Trp-OH) y sus variantes conjugadas con lípidos o glucosilo de Implicit Bioscience, NOV-205 (p. ej., Molixan[®] - un péptido antivírico de Novelos Therapeutics, Inc.), el antivírico
 10 EHC18 de Enzo Biochem, gamma-D-glutamyl-L-triptófano (p. ej., SCV-07, SciClone Pharmaceuticals/Verta), aloferón (p. ej., aloferón-1-HGVSGHGQHGQHG, aloferón-2-GVSGHGQHGQHG), CPG 10101 - un agonista de TLR-9 de Coley Pharmaceuticals/Actilon; (8) potenciadores sinérgicos antivíricos, es decir, en solitario, con pocas propiedades, o ninguna, antivíricas, pero potencian el efecto de otros antivíricos - p. ej., coroquina, zumo de pomelo, hidroxiurea, leflunomida, ácido micofenólico, resveratrol, ritonavir; así como otros fármacos antivíricos tales como amantadina, edoxudina, famciclovir (FAMVIR[®]), penciclovir, foscarnet, fosfonet, ganciclovir (CITOVENE[®], CYMEVENE[®], VITRASERT[®]), gardasil, ibacitabina, imunovir, moroxidina, nexavir, peramivir, pleconaril, podofilotoxina, ribavirina, rimantadina, trifluridina, trizivir, tromantadina, truvada, valaciclovir, valganciclovir, vidarabina, y potenciadores de interferón, tales como EMZ702 de Transition Therapeutics, diclorhidrato de histamina (p. ej., Ceplene[®] + IFN- α); y (9)
 15 antivíricos diversos o no clasificados, tales como: KPE-02003002 (Artemimol) de Kemin Pharmaceuticals, mitoquinona - un agonista antioxidante de la coenzima Q10 de Antipodean Pharmaceuticals, inhibidores de alfa-glucosidasa I (p. ej., MX-3253-celgosivir de Migenix Pharmaceuticals, castanospermina, antagonistas de glucocorticoides (p. ej., inhibidores de IRES del VHC, mifepristona, VGX-410C de VGX Pharmaceuticals), agonistas hepáticos (p. ej., PYN17 de Phynova Pharmaceuticals), agentes antivíricos derivados de terapias tradicionales con plantas herbáceas, p. ej., PYN18 de Phynova Pharmaceuticals, inhibidores de caspasa (p. ej., LB-84451 - de LG Life Sciences, emricasan - PF-03491390/IDN-6556 de Pfizer), análogos de ciclosporina que inhiben la replicación vírica impidiendo la unión a la ciclofilina A (p. ej., SDZ NIM 911 de Novartis, Debio-025 de Debiopharm),

La expresión "*agente antifúngico*" incluye cualquier molécula que inhibe o anula el crecimiento, morbilidad y/o supervivencia de hongos. Esto incluye por ejemplo, (1) antifúngicos poliénicos, tales como natamycin, rimocidina,
 30 filipina, nistatina, anfotericina B, candicina; (2) imidazoles, tales como miconazol, ketoconazol (LOTRIMIN[®]), econazol, bifonazol, butoconazol, fenticonazol, isoconazol, oxiconazol, sertaconazol (ERTACZO[®]), sulconazol, tioconazol, (3) triazoles, tales como fluconazol, itraconazol, isavuconazol, ravuconazol posaconazol, voriconazol, terconazol; (4) alilaminas, tales como terbinafina (LAMISIL[®]), amorolfina, naftifina (Naftin[®]), butenafina (LOTRIMIN ULTRA[®]); (5) equinocandinas, tales como anidulafungina, caspofungina, micafungina y otras sustancias con propiedades antifúngicas, tales como ácido benzoico, ciclopix, flucitossina, griseofulvina, violeta de genciana, haloprogina, tolnaftato (TINACTIN[®], DESENE[®], AFTATE[®]), ácido undecilénico, aceite de árbol de té - ISO 4730 (Aceite de Melaleuca, tipo Terpinen-4-ol) aceite de citronela, limoncillo, aceite de naranja, esencia de palmarosa, pachulí, mirto limonero, aceite de semilla de neem, aceite de coco.

La expresión "*agente antiprotozoario*" o "*agente antiprotozoos*" incluye cualquier molécula que inhibe o anula el crecimiento, morbilidad y/o supervivencia de organismos protozoarios. Como ejemplos de agentes antiprotozoarios se incluyen, (1) *agentes antipalúdicos*, p. ej., quinina, quinimax, quinidina, quinimax, cloroquina (ARALEN[®]), hidroxicloroquina (PLAQUENIL[®]), amodiaquina, pirimetamina (DARAPRIM[®]), sulfadoxina, proguanilo, mefloquina (LARIAM[®]), halofantrina, primaquina, artesiminina y sus derivados (p. ej., arteméter, artensunato, dihidroartemisinina, arteéter), clindamicina y combinaciones de los mismos; (2) inhibidores de proteasa y los fármacos, benzonidaol, buparvacuona, carbarsona, clioquinol, disulfiram, eflomitina, emetina, furazolidona, antimoniato de meglumina, melarsoprol, metronidazol (FLAGYL[®]), miltefosina, nifurtimox, nitazoxanida, amidazol, sulfato de paromomicina, pentamidina, pirimetamina (DARAPRIM[®]), secnidazol, timidazol.

El término "*vacuna*" como se utiliza en el presente documento, incluye cualquier inmunógeno no patógeno que, cuando se inocular en un hospedador, induce inmunidad protectora contra un patógeno específico. Las vacunas pueden tomar muchas formas. Las vacunas pueden ser organismos completos que comparten antígenos importantes con el patógeno, pero no son patógenos en sí mismos (p. ej., viruela vacuna). Las vacunas también se pueden preparar a partir de virus inactivados (p. ej., vacuna contra la polio Salk) o atenuados (pérdida de capacidad de producir enfermedades - p.ej., vacuna Sabin contra la polio). Las vacunas también se pueden preparar a partir de macromoléculas purificadas aisladas del organismo patógeno. Por ejemplo, *vacunas toxoides* (p. ej., tétanos y difteria) que contienen la forma inactiva de toxina bacteriana soluble - lo que da como resultado la producción de anticuerpos antitoxina, pero no inmunidad a las bacterias intactas. *Vacunas subunitarias* (p. ej., contra la Hepatitis B) que solo contienen una única proteína inmunogénica aislada del patógeno de interés. *Vacunas conjugadas con hapteno*, que unen determinados epitopos de hidratos de carbono o polipéptidos aislados del patógeno de interés a transportadores inmunogénicos, como el toxoide tetánico. Estas estrategias utilizan esencialmente los epitopos como haptenos para inducir la producción de anticuerpos, que después reconocen el mismo epitopo en el patógeno originario. Sin embargo, para ser máximamente eficaces, dichas vacunas deben incorporar epitopos de células B y T, y los epitopos de células T deben elegirse para garantizar que los sistemas inmunitarios de los individuos hospedadores los reconozca,
 60 presente y responda.

Las *vacunas de ADN* aprovechan la capacidad de las células hospedadoras para captar y expresar ADN que codifica proteínas patógenas que se inyecta por vía intramuscular.

Como ejemplos de vacunas antivíricas que pueden utilizarse junto con los anticuerpos anti-PD-L1 para los métodos descritos en el presente documento, se incluyen: vacuna contra el VHC (virasoma) de Pevion Biotech., TG4040 (MVA-HCV de Transgene viron diseñado para mejorar la respuesta inmunitaria celular (linfocitos T citotóxicos CD4+ y CD8+) contra NS3, NS4 y NS5B, CHRONVAC® - una vacuna de ADN NS3/4a con codones optimizados de Inovio Biomedical, vacunas contra VHC/CpG de Novartis, GI-5005 - una vacuna contra el VHC de Globeimmune, IC41 una mezcla de péptidos sintéticos que tienen epítomos T CD4 y CD8 del VHC junto con poli-L-arginina de Intercell.

Las respuestas del hospedador a los inmunógenos pueden mejorarse si se administran en mezcla con *adyuvantes*. Los adyuvantes inmunitarios funcionan de una o más de las siguientes maneras: (1) prolongan la retención del inmunógeno, (2) aumentan el tamaño eficaz del inmunógeno (y, por tanto, promueven de la fagocitosis y presentación a los macrófagos), (3) estimulan la afluencia de macrófagos u otras células inmunitarias en el lugar de la inyección, o (4) promueven la producción local de citocinas y otras actividades inmunológicas. Algunos ejemplos de adyuvantes incluyen: adyuvante completo de Freund (CFA, *complete freund's adjuvant*), sales de aluminio y proteínas derivadas de micobacterias tales como dipéptidos o tripéptidos de muramilo.

El término "*anticuerpo*" incluye anticuerpos monoclonales (incluidos anticuerpos de longitud completa que tienen una región Fc de inmunoglobulina), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos multispecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos, diacuerpos y moléculas monocatenarias), así como fragmentos de anticuerpo (p. ej., Fab, F(ab')₂ y Fv). El término "inmunoglobulina" (Ig) se utiliza indistintamente con "*anticuerpo*" en el presente documento.

La unidad básica de 4 cadenas del anticuerpo es una glucoproteína heterotetramérica compuesta por dos cadenas ligeras (L, *light*) idénticas y dos cadenas pesadas (H, *heavy*) idénticas. Un anticuerpo de IgM consiste en 5 de las unidades heterotetraméricas básicas junto con un polipéptido adicional denominado cadena J, y contiene 10 sitios de unión a antígeno, mientras que los anticuerpos de IgA comprenden de 2 a 5 de las unidades básicas de 4 cadenas que pueden polimerizar para formar ensamblajes polivalentes junto con la cadena J. En el caso de las IgG, la unidad de 4 cadenas es generalmente de aproximadamente 150.000 dalton. Cada cadena L se une a una cadena H mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están unidas entre sí por uno o más enlaces disulfuro, dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L tiene puentes disulfuro intracatenarios a espacios regulares. Cada cadena H tiene, en el extremo N, un dominio variable (V_H) seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ, y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ε. Cada cadena L tiene, en el extremo N, un dominio variable (V_L) seguido de un dominio constante en su otro extremo. El V_L está alineado con el V_H y el C_L está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_{H1}). Se cree que restos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada. El emparejamiento de un V_H y un V_L entre sí, forma un único sitio de unión a antígeno. Para detalles sobre la estructura y las propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véanse, p. ej., Basic and Clinical Immunology, 8ª edición, Daniel P. Sties, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds), Appleton y Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y capítulo 6. La cadena L de cualquier especie de vertebrado puede asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (CH), las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases o isotipos. Hay cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas denominadas α, δ, ε, γ y μ, respectivamente. Las clases γ y α se dividen además en subclases basándose en diferencias relativamente pequeñas en la secuencia y función de CH, p. ej., los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2.

Un anticuerpo "*aislado*" es uno que se ha identificado, separado y/o recuperado de un componente de su entorno de producción (p. ej., natural o recombinante). Preferentemente, el polipéptido aislado carece de asociación con todos los demás componentes de su entorno de producción. Componentes contaminantes de su entorno de producción, tales como los resultantes de células transfectadas recombinantes, son materiales que normalmente interferirían con la investigación, el diagnóstico o con los usos terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. El polipéptido se puede purificar: (1) a más del 95 % en peso de anticuerpo según lo determinado, por ejemplo, por el método de Lowry, y en algunas realizaciones, a más del 99 % en peso; (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos aminoterminal o interna utilizando un secuenciador de copa giratoria o (3) hasta la homogeneidad mediante una SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en el interior de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Habitualmente, sin embargo, un polipéptido o anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

La "*región variable*" o el "*dominio variable*" de un anticuerpo se refiere a los dominios aminoterminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera pueden denominarse "V_H" y "V_L", respectivamente. Estos dominios son generalmente las partes más variables del anticuerpo (en relación con otros anticuerpos de la misma clase) y contienen los sitios de unión a antígeno.

El término "*variable*" se refiere al hecho de que determinados segmentos de los dominios variables difieren ampliamente en su secuencia entre los anticuerpos. El dominio V actúa como mediador en la unión al antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente en todo el tramo de los dominios variables. Más bien, se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables (HVR, *hypervariable regions*), en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las partes más sumamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones estructurales (FR, *framework regions*). Cada uno de los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras naturales comprenden cuatro regiones FR, que adoptan en gran parte una configuración de lámina beta, conectadas por tres HVR, que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de, la estructura de lámina beta. Las HVR en cada cadena se mantienen en estrecha proximidad por las regiones FR y, con las HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Immunological Interest*, quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión del anticuerpo a un antígeno, sino que presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

La expresión "*anticuerpo monoclonal*", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones y/o modificaciones postraduccionales de origen natural (p. ej., isomerizaciones, amidaciones) que pueden estar presentes en escasas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son sumamente específicos, se dirigen contra un único sitio antigénico. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que generalmente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes (epítopos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se sintetizan mediante el cultivo de hibridoma, no contaminado por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante un método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilizarán de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante diversas técnicas, incluyendo, por ejemplo, el método del hibridoma (p. ej., Kohler y Milstein., *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995); Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (véase, p. ej., la patente de EE.UU. n.º 4.816.567), tecnologías de presentación en fagos (véanse, p. ej., Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o similares a los humanos en animales que tienen partes o todos los locus o genes de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véanse, p. ej., los documentos WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); las patentes de EE.UU. n.º 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

La expresión "anticuerpo no marcado" se refiere a un anticuerpo que no está conjugado con un residuo citotóxico o radiomarcador.

Las expresiones "*anticuerpo de longitud completa*", "*anticuerpo intacto*" o "*anticuerpo completo*" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, a diferencia de un fragmento de anticuerpo. Específicamente, los anticuerpos completos incluyen aquellos con cadenas pesadas y ligeras que incluyen una región Fc. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia natural (p. ej., dominios constantes de secuencia natural humana) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos. En algunos casos, el anticuerpo intacto puede tener una o más funciones efectoras.

Un "*fragmento de anticuerpo*" comprende una parte de un anticuerpo intacto, preferentemente, la unión a antígeno y/o la región variable del anticuerpo intacto. Como ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (véase la patente de EE.UU. 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata *et al.*, *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpos monocatenarios y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab" y un fragmento "Fc" residual, un nombre que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L completa junto con el dominio de región variable de la cadena H (V_H) y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_{H1}). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión a antígeno, es decir, tiene un único sitio de unión a antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo produce un único fragmento F(ab')₂ grande que corresponde a aproximadamente dos fragmentos Fab unidos por disulfuro que tienen diferente actividad de unión a antígeno y siguen siendo capaces de entrecruzarse con el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en que tienen unos pocos restos

5 adicionales en el extremo carboxilo del dominio C_H1 incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en el presente documento para Fab' en el que el uno o más restos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ originalmente se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

10 El fragmento Fc comprende las partes carboxiterminales de ambas cadenas H unidas entre sí por disulfuros. Las funciones efectoras de los anticuerpos están determinadas por secuencias en la región Fc, la región que también es reconocida por los receptores Fc (FcR) que se encuentran en determinados tipos de células.

15 Fv' es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión a antígeno. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio de región variable de cadena pesada y otro de ligera en estrecha asociación no covalente. A partir del plegamiento de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (3 bucles cada uno de la cadena H y L) que aportan los restos de aminoácidos para la unión a antígeno y confieren al anticuerpo la especificidad de unión a antígeno. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

20 Los "Fv monocatenarios" también abreviados como "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados en una única cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido de sFv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión del sFv, véase Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994).

25 Los "fragmentos funcionales" de los anticuerpos de la invención comprenden una parte de un anticuerpo intacto, incluyendo generalmente la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto o la región Fc de un anticuerpo que conserva o tiene capacidad de unión a FcR modificada. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

30 El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos pequeños de anticuerpo preparados mediante la construcción de fragmentos sFv (véase el párrafo anterior) con enlazadores cortos (de aproximadamente 5-10 restos) entre los dominios V_H y V_L de tal manera que se logra el emparejamiento intercatenario pero no intracatenario de los dominios V, dando como resultado un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv "cruzados" en los cuales los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. Los diacuerpos se describen con mayor detalle, por ejemplo, en los documentos EP 404097 y WO 93/11161; Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993).

40 Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos (inmunoglobulinas) "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo en particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es(son) idéntico(s) u homólogo(s) a las secuencias correspondientes en los anticuerpos procedentes de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. n.º 4.816.567; Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés del presente documento incluyen anticuerpos PRIMATIZED® en donde la región de unión a antígeno del anticuerpo deriva de un anticuerpo producido, p. ej., inmunizando macacos con un antígeno de interés. Como se utiliza en el presente documento, "anticuerpo humanizado" se utiliza como un subconjunto de "anticuerpos quiméricos".

55 Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. Un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los restos de una HVR (definida anteriormente en el presente documento) del receptor se sustituyen por restos de una HVR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como de ratón, rata, conejo o primate no humano que tenga la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. En algunas ocasiones, los restos estructurales ("FR") de la inmunoglobulina humana están sustituidos por los correspondientes restos no humanos. Asimismo, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se pueden realizar para refinar adicionalmente el rendimiento de los anticuerpos, tal como la afinidad de unión. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una secuencia de inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana, aunque las regiones FR pueden incluir una o más sustituciones de restos FR individuales que mejoran el rendimiento del anticuerpo, tal como la afinidad de unión, isomerización, inmunogenicidad, etc. El número de estas sustituciones de aminoácidos en la FR no suele ser superior a 6 en la cadena H y a 3 en la cadena L. El anticuerpo humanizado

también comprenderá opcionalmente, al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase, p. ej., Jones *et al.*, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992). Véase también, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurle y Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994); y las patentes de EE.UU. n.º 6.982.321 y 7.087.409.

Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o que se ha producido utilizando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos como se divulgan en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos pueden producirse utilizando diversas técnicas conocidas en la materia, incluyendo bibliotecas de presentación en fagos. Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581 (1991). Para la preparación de anticuerpos monoclonales también se dispone de los métodos descritos en Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boerner *et al.*, J. Immunol., 147(1):86-95 (1991). Véase también van Dijk y van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368-74 (2001). Pueden prepararse anticuerpos humanos administrando el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a la exposición antigénica, pero cuyos locus endógenos se han desactivado, p. ej., xenoratonos inmunizados (véanse, p. ej., las patentes de EE.UU. n.º 6.075.181 y 6.150.584 en lo que respecta a la tecnología XENOMOUSE™). Véase también, por ejemplo, Li *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006) en lo que respecta a anticuerpos humanos generados mediante una tecnología del hibridoma con células B humanas.

La expresión "región hipervariable", "HVR", o "HV", cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en cuanto a su secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). En anticuerpos naturales, H3 y L3 muestran la mayor diversidad de las seis HVR y se cree que H3 en particular desempeña un papel singular a la hora de conferir excelente especificidad a los anticuerpos. Véase, p. ej., Xu *et al.*, Immunity 13:37-45 (2000); Johnson y Wu, en Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). De hecho, los anticuerpos naturales de camélidos compuestos únicamente por una cadena pesada son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera. Véase, p. ej., Hamers-Casterman *et al.*, Nature 363:446-448 (1993); Sheriff *et al.*, Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996).

En la actualidad se utilizan diversas definiciones de HVR, que se incluyen en el presente documento. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR, *Complementarity Determining Regions*) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las más comúnmente utilizadas (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere, en cambio, a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Las HVR de los AbM (anticuerpos monoclonales) representan un compromiso entre las HVR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia y se utilizan en el programa informático de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las HVR "de contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los restos de cada una de estas HVR se indican a continuación.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B (Numeración de Kabat)	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
H1	H31-H35 (Numeración de Chothia)	H26-H35	H26-H32	H30-H35
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las HVR pueden comprender "HVR extendidas" de la siguiente manera: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 u 89-96 (L3) en la VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 o 95-102 (H3) en la VH. Para cada una de estas definiciones, los restos de dominio variable se numeran de acuerdo con Kabat *et al.*, citado anteriormente.

La expresión "numeración de restos de dominio variable como en Kabat" o "numeración de posición de aminoácidos como en Kabat" y variaciones de la misma, se refiere al sistema de numeración utilizado para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena ligera de la recopilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, citado anteriormente. Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento o inserción en, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una única inserción de aminoácido (resto 52a de acuerdo con Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (p. ej., restos 82a, 82b y 82c, etc., de acuerdo con Kabat) después del resto 82 de la FR de cadena pesada. La numeración de los restos según Kabat, puede determinarse para un anticuerpo dado por alineación en las regiones de homología de la secuencia del

anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "patrón".

Los restos "estructurales" o "FR" son aquellos restos de dominio variable distintos de los restos de HVR como se define en el presente documento.

5 Una "estructura consenso humana" o "estructura humana aceptora" es una estructura que representa los restos de aminoácidos de origen natural más comunes en una selección de secuencias estructurales de VL o VH de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana procede de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Como ejemplos se incluyen, para la VL, el subgrupo que puede ser el subgrupo kappa I, kappa II, kappa III o kappa IV como en Kabat *et al.*, citado anteriormente. Adicionalmente, para la VH, el subgrupo puede ser el subgrupo I, subgrupo II o subgrupo III como en Kabat *et al.*, citado anteriormente. Como alternativa, una estructura consenso humana puede derivar de lo anterior en el que restos particulares, tal como cuando se selecciona un resto estructural humano basándose en su homología con la estructura donante alineando la secuencia estructural donante con una colección de varias secuencias estructurales humanas. Una estructura humana aceptora "derivada de" una estructura de inmunoglobulina humana o de una estructura consenso humana, puede comprender la misma secuencia de aminoácidos del mismo o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos preexistente. El número de cambios de aminoácidos preexistentes puede ser de 10 o menor, de 9 o menor, de 8 o menor, de 7 o menor, de 6 o menor, de 5 o menor, de 4 o menor, de 3 o menor o de 2 o menor.

25 Una "estructura consenso del subgrupo III de VH" comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos del subgrupo III de la región variable pesada de Kabat *et al.*, citado anteriormente. La secuencia de aminoácidos de la estructura consenso del subgrupo III de VH puede comprender al menos una parte o la totalidad de cada una de las siguientes secuencias: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (HC-FR1)(SEQ ID NO:4), WVRQAPGKGLEWV (HC-FR2), (SEQ ID NO:5), RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (HC-FR3, SEQ ID NO:6), WGQGTTLTVSA (HC-FR4), (SEQ ID NO: 7).

30 Una "estructura consenso kappa I de VL" comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos del subgrupo I de la región variable ligera kappa de Kabat *et al.*, citado anteriormente. La secuencia de aminoácidos de la estructura consenso del subgrupo I de VH puede comprender al menos una parte o la totalidad de cada una de las siguientes secuencias: DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (LC-FR1) (SEQ ID NO:11), WYQKPGKAPKLLIY (LC-FR2) (SEQ ID NO: 12), GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (LC-FR3)(SEQ ID NO:13), FGQGTKVEIKR (LC-FR4)(SEQ ID NO:14).

35 Una "modificación de aminoácidos" en una posición específica, p. ej., de la región Fc, se refiere a la sustitución o delección del resto especificado, o a la inserción de al menos un resto de aminoácido adyacente al resto especificado. Inserción "adyacente" en un resto especificado significa inserción dentro de uno o dos restos del mismo. La inserción puede ser aminoterminal o carboxiterminal con respecto al resto especificado. La modificación de aminoácidos preferida en el presente documento es una sustitución.

40 Un anticuerpo "madurado por afinidad" es uno con una o más alteraciones en una o más HVR del mismo que da como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo precursor que no posee las(s) alteraciones(s). Un anticuerpo madurado por afinidad tiene afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, Marks *et al.*, Bio/Technology 10:779-783 (1992) describen la maduración por afinidad mediante barajado de los dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de los restos de HVR y/o estructurales la describen, por ejemplo: Barbas *et al.* Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.* Gene 169:147-155 (1995); Yelton *et al.* J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins *et al.*, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).

55 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "se une específicamente a" o es "específico(a) para" se refiere a interacciones medibles y reproducibles, tal como la unión entre una diana y un anticuerpo, que es determinante de la presencia de la diana en presencia de una población heterogénea de moléculas, incluyendo moléculas biológicas. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a una diana (que puede ser un epítipo) es un anticuerpo que se une a esta diana con mayor afinidad, avidez, más fácilmente, y/o con mayor duración que con la que se une a otras dianas. El grado de unión de un anticuerpo a una diana no relacionada puede ser inferior a aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo a la diana medida, p. ej., mediante radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés). Un anticuerpo que se une específicamente a una diana puede tener una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ o $\leq 0,1 \text{ nM}$. Un anticuerpo se une específicamente a un epítipo en una proteína que se conserva entre la proteína de diferentes especies. S puede incluir unión específica, pero no requiere unión exclusiva.

65 Un anticuerpo "bloqueante" o un anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce una actividad biológica del antígeno al que se une. Los anticuerpos bloqueantes o anticuerpos antagonistas pueden inhibir sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno. Los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención bloquean la señalización a través de PD-1 para restaurar una respuesta funcional por las células T desde un estado disfuncional

a la estimulación antigénica.

Un "agonista" o anticuerpo activador es uno que potencia o inicia la señalización por el antígeno al que se une. Los anticuerpos agonistas provocan o activan la señalización sin la presencia del ligando natural.

La expresión "*fase sólida*" describe una matriz no acuosa a la que se puede adherir el anticuerpo de la presente invención. Los ejemplos de fases sólidas que abarca el presente documento incluyen las que están formadas parcial o totalmente por vidrio (p. ej., vidrio de poro controlado), polisacáridos (p. ej., agarosa), poliácridamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. Dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otros casos, es una columna de purificación (p. ej., una columna de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas distintas, tal como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.275.149.

Las "*funciones efectoras de los anticuerpos*" hacen referencia a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia natural o una región Fc de variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo, y varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de los anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC, por sus siglas en inglés); fagocitosis; regulación negativa de receptores de superficie celular (p. ej., receptores de células B); y activación de células B. Una función efectora "*reducida o minimizada*" de un anticuerpo se entiende que es la que se reduce al menos en un 50 % (o como alternativa en un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %) del anticuerpo de tipo silvestre o no modificado. Un experto en la materia puede determinar y medir fácilmente la determinación de la función efectora de un anticuerpo. Las funciones efectoras de los anticuerpos de unión al complemento, citotoxicidad dependiente del complemento y citotoxicidad dependiente del anticuerpo pueden verse afectadas. La función efectora puede eliminarse a través de una mutación en la región constante que eliminó la glucosilación, p. ej., "mutación sin efector". La mutación sin efector puede ser una mutación N297A o DANA (D265A + N297A) en la región CH2. Shields *et al.*, J. Biol. Chem. 276 (9): 6591-6604 (2001). Como alternativa, otras mutaciones que reducen o eliminan la función efectora incluyen: K322A y L234A/L235A (LALA). Como alternativa, la función efectora puede reducirse o eliminarse mediante técnicas de producción, tales como la expresión en células hospedadoras que no se glucosilan (p. ej., *E. coli*) o en las que se produce un patrón de glucosilación alterado que es ineficaz o menos eficaz para promover la función efectora (p. ej., Shinkawa *et al.*, J. Biol. Chem. 278(5): 3466-3473 (2003).

La "*citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo*" o ADCC se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig secretada unida a receptores Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (p. ej., linfocitos citolíticos naturales (NK, *natural killer*), neutrófilos y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan de manera específica a una célula diana portadora del antígeno y posteriormente destruyan a la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" las células citotóxicas y son necesarios para destruir la célula diana a través de este mecanismo. Las células primarias para mediar en la ADCC, los linfocitos citolíticos naturales (NK), expresan ente FcγRIII, mientras que los monocitos expresan, FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de Fc en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinetic, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la patente de EE.UU. n.º 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede determinarse *in vivo*, p. ej., en un modelo animal tal como el que se desvela en Clynes *et al.*, PNAS USA 95:652-656 (1998).

A menos que se indique lo contrario en el presente documento, en una cadena pesada de inmunoglobulina, la numeración de los restos es la del índice de EU como en Kabat *et al.*, citado anteriormente. El "índice de EU como en Kabat" se refiere a la numeración de restos del anticuerpo EU de la IgG1 humana.

La expresión "*región Fc*" en el presente documento se utiliza para definir una región carboxiterminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana habitualmente se define que se extiende desde un resto de aminoácido en la posición Cys226 o desde Pro230, al extremo carboxilo de la misma. La lisina carboxiterminal (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración de EU) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo o mediante ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. Por consiguiente, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los restos K447 eliminados, poblaciones de anticuerpos que no tengan restos K447 eliminados y poblaciones de anticuerpos que tengan una mezcla de anticuerpos con y sin el resto K447.

Un "*receptor Fc*" o "*FcR*" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia natural. Así mismo, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo de IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo las variantes alélicas y las formas de corte y empalme alternativas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en

5 sus dominios citoplásmicos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM, *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM, *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) en su dominio citoplásmico. (véase M. Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991); Capel *et al.*, Immunomethods 4: 25-34 (1994); y de Haas *et al.*, J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, se incluyen en el término "FcR" del presente documento.

10 La expresión "*receptor Fc*" o "*FcR*" también incluye el receptor neonatal, *FcRn*, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto. Guyer *et al.*, J. Immunol. 117: 587 (1976) y Kim *et al.*, J. Immunol. 24: 249 (1994). Se conocen métodos para medir la unión a FcRn (véanse, p. ej., Ghetie y Ward, Immunol. Today 18: (12): 592-8 (1997); Ghetie *et al.*, Nature Biotechnology 15 (7): 637-40 (1997); Hinton *et al.*, J. Biol. Chem. 279 (8): 6213-6 (2004); documento WO 2004/92219 (Hinton *et al.*). La unión a FcRn *in vivo* y la semivida en suero de polipéptidos de unión a FcRn humano de alta afinidad puede analizarse, p. ej., en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates a los que se administran los polipéptidos que tienen una región Fc variante. El documento WO 2004/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpos que mejoran o disminuyen la unión a los FcR. Véase también, p. ej., Shields *et al.*, J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001).

15 Las "*células efectoras*" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. En un aspecto, las células efectoras expresan al menos FcγRIII y realizan la función efectora de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que actúan como mediadores en la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente natural, p. ej., de sangre. Las células efectoras generalmente son linfocitos asociados con la fase efectora y funcionan para producir citocinas (células T auxiliares), destruir células infectadas con patógenos (células T citotóxicas) o secretar anticuerpos (células B diferenciadas).

20 "*Citotoxicidad dependiente del complemento*" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación de la vía clásica del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo CDC, p. ej., como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol. Methods 202: 163 (1996). Las variantes de anticuerpos con secuencias de aminoácidos de la región Fc alteradas y capacidad de unión a C1q aumentada o disminuida se describen en la patente de EE.UU. n.º 6.194.551B1 y en el documento WO99/51642. El contenido de esas publicaciones de patente se incorpora específicamente en el presente documento como referencia. Véase, además, Idusogie *et al.* J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

25 El sitio de N-glucosilación en IgG está en Asn297 en el dominio CH2. La presente invención también proporciona composiciones de un anticuerpo humanizado de unión a antígeno que tiene una región Fc con función efectora reducida o nula. Una forma de conseguirlo es una sustitución A297N, que previamente se ha demostrado que suprime la unión al complemento y la función efectora ("*mutante Fc sin efector*") en un anticuerpo anti-CD20. Idusogie *et al.*, citado anteriormente. Como resultado de esta mutación, la producción de anticuerpos anti-PD-L1 de la presente invención, que contengan esta mutación Fc en células de mamífero, tales como CHO, no tendrá ninguna glucosilación y, a su vez dará lugar a una función efectora reducida o mínima. Como alternativa, la función efectora del anticuerpo puede eliminarse sin sustitución de CH2 mediante expresión en células, tales como *E coli*, que no son de mamífero.

30 "*Afinidad de unión*" se refiere generalmente a la intensidad de la suma total de interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (p. ej., un anticuerpo) y su compañero de unión (p. ej., un antígeno). A menos que se indique de otro modo, como se utiliza en el presente documento, "*afinidad de unión*" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (p. ej., anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede estar representada en general por la constante de disociación (*Kd*). La afinidad puede medirse mediante métodos habituales conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen al antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos durante más tiempo. En la técnica se conocen diversos métodos de medición de la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede utilizarse para los fines de la presente invención. A continuación se describen realizaciones específicas ilustrativas y de ejemplo para medir la afinidad de unión.

35 En una realización, la "*Kd*" o el "*valor de Kd*" de acuerdo con la presente invención, se mide mediante un radioinmunoensayo (RIA) de unión a antígeno realizado con la versión Fab de la molécula de anticuerpo y antígeno como se describe mediante el siguiente ensayo que mide la afinidad de unión en solución de los Fab por el antígeno equilibrando el Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (¹²⁵I) en presencia de una serie de titulaciones de antígeno no marcado, capturando después el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (Chen, *et al.*, (1999) J. Mol Biol 293:865-881). Para establecer las condiciones del ensayo, las placas de microtitulación (Dynex) se recubren durante una noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6) y posteriormente se bloquean con seroalbúmina bovina al 2 % (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente a 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc n.º 269620), se mezclan [¹²⁵I]-antígeno 100 pM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés (en

consonancia con la evaluación de un anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta *et al.*, (1997) Cancer Res. 57:4593-4599). Después, el Fab de interés se incuba durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo más largo (p. ej., 65 horas) para garantizar que se alcanza el equilibrio. Después de esto, las mezclas se transfieren a la placa de captura para su incubación a temperatura ambiente durante una hora. Después, la solución se retira y la placa se lava ocho veces con Tween-20 al 0,1 % en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden 150 μ l/pocillo de centelleante (MicroScint-20; Packard) y las placas se cuentan en un contador gamma Topcount (Packard) durante diez minutos. Se eligen las concentraciones de cada Fab que proporcionan menos que o igual al 20 % de la unión máxima para su uso en ensayos de unión competitiva.

La K_d puede medirse mediante ensayos de resonancia de plasmón de superficie utilizando un instrumento BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000 instrumento (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con microplacas CM5 de antígenos inmovilizados en ~10 unidades de respuesta (UR). Resumiendo, las microplacas biodetectoras de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) se activan con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se diluye el antígeno con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 μ g/ml (~0,2 μ M) antes de la inyección, a un caudal de 5 μ l/min para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para las mediciones de cinética, se inyectan diluciones en serie de factor dos de Fab (de 0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo TWEEN 20™ (PBST) al 0,05 % a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 μ l/min. Las velocidades de asociación (k_{on}) y de disociación (k_{off}) se calculan utilizando un modelo de unión de Langmuir unívoco sencillo (programa informático de evaluación BIACore®, versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensoogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calcula como la relación k_{off}/k_{on} . Véase, p. ej., Chen *et al.*, J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Si la velocidad de asociación supera 10^6 M⁻¹s⁻¹ en el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, la velocidad de asociación puede determinarse utilizando una técnica de inactivación de fluorescencia que mide el aumento o la disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ de la serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

Una "velocidad de asociación" o " k_{on} " de acuerdo con esta invención, también se puede determinar como se ha descrito anteriormente utilizando un sistema BIACORE®-2000 o BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con microplacas CM5 de antígenos inmovilizados en aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR). Resumiendo, las microplacas biodetectoras de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) se activan con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se diluye el antígeno con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, en 5 mg/ml (\approx 0,2 mM) antes de la inyección, a un caudal de 5 ml/min. para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se añade etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para las mediciones de cinética, se inyectan diluciones en serie de factor dos de Fab (de 0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 (PBST) al 0,05 % a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 μ l/min. Las velocidades de asociación (k_{on}) y de disociación (k_{off}) se calculan utilizando un modelo de unión de Langmuir unívoco sencillo (programa informático de evaluación BIACore versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensoogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calculó como la relación k_{off}/k_{on} . Véase, p. ej., Chen, Y., *et al.*, (1999) J. Mol Biol 293:865-881. Sin embargo, si la velocidad de asociación supera 10^6 M⁻¹s⁻¹ en el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad de asociación se determina preferentemente utilizando una técnica de inactivación de fluorescencia que mide el aumento o la disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-Aminco de la serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

La expresión "*sustancialmente reducido*", o "*sustancialmente diferente*", como se utiliza en el presente documento, indica un grado de diferencia suficientemente alto entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado a una molécula y el otro asociado a una molécula de referencia/comparación), de tal manera que un experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores tendría una significación estadística en el contexto de la característica biológica medida por dichos valores (p. ej., valores de K_d). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, mayor que aproximadamente el 10 %, mayor que aproximadamente el 20 %, mayor que aproximadamente el 30 %, mayor de aproximadamente el 40 % y/o mayor que aproximadamente el 50 %, en función del valor para la molécula de referencia/comparación.

La expresión "*sustancialmente similar*" o "*sustancialmente el mismo*", como se utiliza en el presente documento, indica un grado de similitud suficientemente alto entre dos valores numéricos (por ejemplo, uno asociado a un anticuerpo de la invención y el otro asociado a un anticuerpo de referencia/comparación), de tal manera que un experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores tendría poca o ninguna importancia biológica y/o significación estadística en el contexto de la característica biológica medida por dichos valores (p. ej., valores de K_d). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, menor que aproximadamente el 50 %, menor que aproximadamente el 40 %, menor que aproximadamente el 30 %, menor que aproximadamente el 20 %, menor que aproximadamente el 10 %.

menor que aproximadamente el 30 %, menor que aproximadamente un 20 % y/o menor que aproximadamente un 10 %, en función del valor de referencia/comparación.

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" y "homología" con respecto a una secuencia peptídica, polipeptídica o de anticuerpo, se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia peptídica o polipeptídica específica, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin tener en cuenta ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. La alineación para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras que se encuentran dentro de las capacidades del experto en la materia, por ejemplo, utilizando programas informáticos disponibles al público, tales como los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN o MEGALIGN™ (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se estén comparando. A efectos del presente documento, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, creado por Genentech, Inc. El código fuente de ALIGN-2 se ha archivado con la documentación del usuario en la Oficina de derechos de autor de EE. UU., Washington D.C., 20559, donde está registrada con el n.º de registro TXU510087 de derechos de autor de EE.UU. El programa ALIGN-2 está disponible al público a través de Genentech, Inc., Sur de San Francisco, California. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencia se establecen con el programa ALIGN-2 y no varían.

En las situaciones donde se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada para, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada (que puede citarse, como alternativa, como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos para, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada), se calcula de la siguiente manera:

100 veces la fracción X/Y donde X es el número de restos de aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación del programa de A y B y donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A.

A menos que se indique específicamente otra cosa, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2.

Una molécula de ácido nucleico "*aislada*" que codifica los anticuerpos del presente documento es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que normalmente se asocia en el entorno en el que se produjo. Preferentemente, el ácido nucleico aislado carece de asociación con todos los componentes asociados al entorno de producción. Las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican los polipéptidos y anticuerpos en el presente documento se encuentran en una forma distinta a la forma o ambiente en que se encuentran en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen del ácido nucleico que codifica los polipéptidos y anticuerpos del presente documento que existen de forma natural en las células.

La expresión "*secuencias de control*" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo hospedador particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

El ácido nucleico está "*unido operativamente*" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o líder de secreción está unido operativamente al ADN de un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si se coloca de manera que facilite la traducción. Generalmente, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, en el caso de un líder de secreción, son contiguas y están en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se realiza mediante conexión en sitios de restricción convenientes. Si no existen dichos sitios, se utilizan adaptadores o enlazadores de oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

La expresión "*epítipo etiquetado*", cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a un polipéptido químico que comprende un polipéptido o anticuerpo descrito en el presente documento fusionado a un "polipéptido etiqueta". El polipéptido etiqueta tiene suficientes restos para proporcionar un epítipo contra el cual se puede producir un anticuerpo, sin embargo, es lo suficientemente corto como para no interferir con la actividad del polipéptido al que está

fusionado. Preferentemente, el polipéptido etiqueta también es bastante singular, de modo que el anticuerpo no reacciona sustancialmente de forma cruzada con otros epítomos. Los polipéptidos etiqueta adecuados en general tienen al menos seis restos de aminoácidos y generalmente entre aproximadamente 8 y 50 restos de aminoácidos (preferentemente, entre aproximadamente 10 y 20 restos de aminoácidos).

5 Como se utiliza en el presente documento, el término "*inmuno adhesina*" designa moléculas similares a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de una
10 secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es diferente de la del sitio de unión y reconocimiento de antígenos de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte adhesina de una molécula de inmuno adhesina es generalmente una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmuno adhesina puede obtenerse de cualquier inmunoglobulina, tal como los
15 subtipos IgG-1, IgG-2 (incluyendo IgG2A e IgG2B), IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM. Las fusiones de Ig incluyen preferentemente la sustitución de un dominio de un polipéptido o anticuerpo descrito en el presente documento en el lugar de al menos una región variable dentro de una molécula de Ig. La fusión de inmunoglobulinas incluye la bisagra, CH2 y CH3, o las regiones bisagra, CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulinas véase también la patente de EE.UU. n.º 5.428.130 concedida el
20 27 de junio de 1995. Por ejemplo, las inmuno adhesinas útiles como segundos medicamentos útiles para la terapia de combinación en el presente documento incluyen polipéptidos que comprenden las partes extracelulares o de unión a PD-1 de PD-L1 o PD-L2, o viceversa, fusionadas a un dominio constante de una secuencia de inmunoglobulina.

Una "*proteína de fusión*" y un "*polipéptido de fusión*" se refieren a un polipéptido que tiene dos partes unidas entre sí de manera covalente, donde cada una de las partes es un polipéptido que tiene una propiedad diferente. La propiedad
25 puede ser una propiedad biológica, tal como actividad *in vitro* o *in vivo*. La propiedad también puede ser una propiedad química o física sencilla, tal como la unión a una molécula diana, la catálisis de una reacción, etc. Las dos partes pueden estar unidas directamente por un enlace peptídico sencillo o a través de un enlazador peptídico estarán en marco de lectura entre sí.

30 Una formulación "*estable*" es aquella en la que la proteína que contiene conserva esencialmente su estabilidad e integridad física y química tras el almacenamiento. Diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad de las proteínas están disponibles en la técnica y se revisan en Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Nueva York, Pubs. (1991) y Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). La estabilidad puede medirse a una temperatura seleccionada durante un periodo de tiempo seleccionado. Para una
35 exploración rápida, la formulación puede mantenerse a 40 °C durante 2 semanas a 1 mes, momento en el que se mide la estabilidad. Cuando la formulación debe almacenarse a 2-8 °C, generalmente la formulación debe ser estable a 30 °C o a 40 °C durante al menos 1 mes y/o estable a 2-8 °C durante al menos 2 años. Cuando la formulación se almacene a 30 °C, generalmente la formulación debe ser estable durante al menos 2 años a 30 °C y/o estable a 40 °C durante al menos 6 meses. Por ejemplo, el grado de agregación durante el almacenamiento puede usarse como un
40 indicador de la estabilidad de la proteína. Por tanto, una formulación "estable" puede ser una en donde menos de aproximadamente un 10 % y preferentemente menos de aproximadamente un 5 % de la proteína está presentes como un agregado en la formulación. Durante el almacenamiento de la formulación se puede determinar cualquier aumento en cuanto a la formación de agregados.

45 Una formulación "*reconstituida*" es aquella que se ha preparado disolviendo una formulación de proteína o anticuerpo liofilizada en un diluyente de manera que la proteína se dispersa por todas partes. La formulación reconstituida es adecuada para su administración (p. ej., administración subcutánea) a un paciente que se va a tratar con la proteína de interés y puede ser una que sea adecuada para administración parenteral o intravenosa.

50 Una formulación "*isotónica*" es aquella que tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas generalmente tendrán una presión osmótica de aproximadamente 250 a 350 mOsm. El término "hipotónica" describe una formulación con una presión osmótica inferior a la de la sangre humana. De manera correspondiente, el término "hipertónica" se utiliza para describir una formulación con una presión osmótica superior a la de la sangre humana. La isotonicidad se puede medir utilizando un osmómetro de presión de vapor o de
55 congelación en hielo, por ejemplo. Las formulaciones de la presente invención son hipertónicas como resultado de la adición de sal y/o tampón.

Como se utiliza en el presente documento, los "transportadores" incluyen transportadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables, que no son tóxicos para la célula o el mamífero expuesto a ellos en las dosis y
60 concentraciones empleadas. Con frecuencia, el transportador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa de pH tamponado. Como ejemplos de transportadores fisiológicamente aceptables se incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o
65 lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal, tales

como sodio; y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.

Un "prospecto" se refiere a las instrucciones que se incluyen habitualmente en los envases comerciales de medicamentos que contienen información sobre las indicaciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de medicamentos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones, otros medicamentos a combinar con el producto envasado y/o advertencias sobre el uso de dichos medicamentos, etc.

Un "ácido farmacéuticamente aceptable" incluye ácidos inorgánicos y orgánicos que no son tóxicos a la concentración y la forma en que se formulan. Por ejemplo, ácidos inorgánicos adecuados incluyen ácido clorhídrico, perclórico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, sulfúrico, sulfónico, sulfínico, sulfanílico, fosfórico, carbónico, etc. Los ácidos orgánicos adecuados incluyen ácidos mono, di y tricarbónicos de alquilo de cadena lineal y ramificada, aromáticos, cíclicos, cicloalifáticos, arilalifáticos, heterocíclicos, saturados, insaturados, incluyendo, por ejemplo, fórmico, acético, 2-hidroxiacético, trifluoroacético, fenilacético, trimetilacético, t-butil acético, antranílico, propanoico, 2-hidroxiopropanoico, 2-oxopropanoico, propanodioico, ciclopentanopropiónico, ciclopentano propiónico, 3-fenilpropiónico, butanoico, butandioico, benzoico, 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, 2-acetoxibenzoico, ascórbico, cinámico, laurilsulfúrico, esteárico, mucónico, mandélico, succínico, embónico, fumárico, málico, maleico, hidroximaleico, malónico, láctico, cítrico, tartárico, glicólico, glucónico, glucónico, pirúvico, glioxálico, oxálico, mesílico, succínico, salicílico, ftálico, palmoico, palmeico, tiocianico, metanosulfónico, etanosulfónico, 1,2-etanodisulfónico, 2-hidroxi-etanosulfónico, bencenosulfónico, 4-clorobencenosulfónico, naftaleno-2-sulfónico, p-toluenosulfónico, canforsulfónico, 4-metilbencilo[2.22]-oct-2-ene-1-carboxílico, glucoheptónico, 4,4'-metileno-bis-3-(ácido hidroxil-2-eno-1-carboxílico), hidroxinaftoico.

Las "bases farmacéuticamente aceptables" incluyen bases inorgánicas y orgánicas que no son tóxicas a la concentración y de la forma en que se formulan. Por ejemplo, bases adecuadas incluyen las formadas a partir de metales que forman bases inorgánicas tales como litio, sodio, potasio, magnesio, calcio, amonio, hierro, cinc, cobre, manganeso, aluminio, N-metilglucamina, morfina, piperidina y bases orgánicas no tóxicas que incluyen, aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio iónico, [p. ej., N(R')₄⁺ (donde R' es independientemente H o alquilo C₁₋₄, p. ej., amonio, Tris)], por ejemplo, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dietilaminoetanol, trimetamina, dicitohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, resinas de poliamina y similares. Son bases orgánicas no tóxicas particularmente preferidas isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetamina, dicitohexilamina, colina y cafeína. Los ácidos y bases farmacéuticamente aceptables adicionales que se pueden usar con la presente invención incluyen aquellos derivados de los aminoácidos, por ejemplo, histidina, glicina, fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y asparagina.

Los tampones y sales "farmacéuticamente aceptables" incluyen los derivados de las sales de adición tanto de ácido como de base de los ácidos y bases indicados anteriormente. Los tampones y/o sales específicos incluyen histidina, succinato y acetato.

Un "azúcar farmacéuticamente aceptable" es una molécula que, cuando se combina con una proteína de interés, previene o reduce significativamente la inestabilidad química y/o física de la proteína durante el almacenamiento. Cuando la formulación se pretende liofilizar y después reconstituir, los "azúcares farmacéuticamente aceptables" también pueden conocerse como un "lioprotector". Como azúcares ilustrativos y sus correspondientes alcoholes de azúcar se incluyen: un aminoácido tal como glutamato monosódico o histidina; una metilamina tal como betaína; una sal liotrópica tal como sulfato de magnesio; un poliol tal como alcoholes de azúcar trihídricos o de peso molecular superior, por ejemplo, glicerina, dextrano, eritritol, glicerol, arabitól, xilitol, sorbitol y manitol; propilenglicol; polietilenglicol; PLURONICS®; y combinaciones de los mismos. Como lioprotectores adicionales ilustrativos se incluyen glicerina y gelatina, y los azúcares melibiosa, melecitosa, rafinosa, manotriosa y estaquiosa. Ejemplos de azúcares reductores incluyen glucosa, maltosa, lactosa, maltulosa, isomaltulosa y lactulosa. Ejemplos de azúcares no reductores incluyen glucósidos no reductores de compuestos polihidroxilados seleccionados de alcoholes de azúcar y otros polialcoholes de cadena lineal. Los alcoholes de azúcar preferidos son los monoglucósidos, especialmente aquellos compuestos obtenidos por reducción de disacáridos tales como lactosa, maltosa, lactulosa y maltulosa. El grupo lateral glicosídico puede ser glucosídico o galactosídico. Ejemplos adicionales de alcoholes de azúcar son glucitol, maltitol, lactitol e isomaltulosa. Los azúcares farmacéuticamente aceptables preferidos son los azúcares no reductores trehalosa o sacarosa. Los azúcares farmacéuticamente aceptables se añaden a la formulación en una "cantidad protectora" (por ejemplo, previo a la liofilización), lo que significa que la proteína conserva esencialmente su estabilidad e integridad física y química durante el almacenamiento (p. ej., después de la reconstitución y el almacenamiento).

El "diluyente" de interés en el presente documento es aquel que es farmacéuticamente aceptable (seguro y no tóxico para la administración a un ser humano) y es útil para la preparación de una formulación líquida, tal como una formulación reconstituida después de la liofilización. Los diluyentes ilustrativos incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWFI, *bacteriostatic water for injection*), solución con pH tamponado (p. ej., solución salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa. Los diluyentes

pueden incluir soluciones acuosas de sales y/o tampones.

Un "*conservante*" es un compuesto que se puede añadir a las formulaciones en el presente documento para reducir la actividad bacteriana. La adición de un conservante puede, por ejemplo, facilitar la producción de una formulación de usos múltiples (dosis múltiples). Ejemplos de posibles conservantes incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio) en los que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga) y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos tales como fenol, alcohol butílico y bencílico, alquilparabenos tales como metil o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y *m*-cresol. El conservante más preferido en el presente documento es el alcohol bencílico.

"*Tratamiento*" se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso de la enfermedad del individuo o célula que se esté tratando y puede realizarse para profilaxis o durante la evolución de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen impedir la aparición o recurrencia de la enfermedad, prevenir la metástasis, disminuir la velocidad de progresión de la enfermedad, mejorar o paliar la patología y la remisión y mejora del pronóstico. Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno. Un sujeto es "tratado" con éxito, por ejemplo, utilizando los anticuerpos apoptóticos anti-PD-L1 de la invención si se mitigan uno o más síntomas asociados a un trastorno disfuncional de células T.

Una "*cantidad eficaz*" se refiere al menos a una cantidad eficaz, a las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el efecto deseado o indicado, incluido un resultado terapéutico o profiláctico. Por ejemplo, una cantidad eficaz de los anticuerpos anti-PD-L1 de la presente invención es al menos la concentración mínima que da como resultado la inhibición de la señalización de PD-L1, ya sea a través de PD-1 en células T o B7.1 en otras APC o ambas.

Una "*cantidad terapéuticamente eficaz*" es al menos la concentración mínima necesaria para efectuar una mejora medible o prevención de un trastorno particular. Una cantidad terapéuticamente eficaz, en el presente documento, puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, edad, sexo y peso del paciente y de la capacidad del anticuerpo para desencadenar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es aquella en la que los efectos tóxicos o perjudiciales del anticuerpo se ven superados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos anti-PD-L1 de la presente invención es al menos la concentración mínima que da como resultado la inhibición de al menos un síntoma de un *trastorno disfuncional de células T*.

Una "*cantidad profilácticamente eficaz*" se refiere a una cantidad que es eficaz, a las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Por ejemplo, una cantidad profilácticamente eficaz de los anticuerpos anti-PD-L1 de la presente invención es al menos la concentración mínima que impide o atenúa el desarrollo de al menos un síntoma de un *trastorno disfuncional de células T*.

La administración "*crónica*" se refiere a la administración de uno o más medicamentos en un modo continuo en oposición a un modo de corta duración, a fin de mantener el efecto (actividad) terapéutico inicial durante un período de tiempo ampliado. La administración "intermitente" es un tratamiento que no se realiza de manera consecutiva sin interrupción, sino que es de naturaleza cíclica.

Con fines de tratamiento, "*mamífero*" se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos, de granja y de zoológico, animales destinados al deporte o de compañía, tales como perros, caballos, conejos, ganado vacuno, cerdos, hámsteres, jerbos, ratones, hurones, ratas, gatos, etc. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

La expresión "*formulación farmacéutica*" se refiere a una preparación que se encuentra en una forma tal que permite que la actividad biológica del principio activo sea eficaz y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se vaya a administrar la formulación. Dichas formulaciones son estériles.

Una formulación "*estéril*" es aséptica o está exenta de cualquier microorganismo vivo y de sus esporas.

El término "*aproximadamente*", como se utiliza en el presente documento, se refiere al intervalo de error habitual del valor respectivo, fácilmente conocido por el experto en este campo técnico.

Un "*trastorno autoinmunitario*" es una enfermedad o un trastorno que surge y se dirige contra los propios tejidos u órganos de un individuo o una segregación conjunta o manifestación de los mismos o afección resultante de ellos. Las enfermedades autoinmunitarias pueden ser una enfermedad específica de un órgano (es decir, la respuesta inmunitaria está dirigida específicamente contra un sistema de órganos tal como el sistema endocrino, el sistema hematopoyético, la piel, el sistema cardiopulmonar, los sistemas gastrointestinal y hepático, el sistema renal, el tiroides, las orejas, el sistema neuromuscular, el sistema nervioso central, etc.) o una enfermedad sistémica que puede afectar a múltiples sistemas de órganos (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR),

polimiositis, etc.). Tales enfermedades preferidas incluyen trastornos reumatológicos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, AR, síndrome de Sjögren, esclerodermia, lupus, tal como LES y nefritis lúpica, polimiositis-dermatomiositis, crioglobulinemia, síndrome antifosfolípido y artritis sorriásica), trastornos autoinmunitarios gastrointestinales y del hígado (tales como, por ejemplo, enteropatías inflamatorias (por ejemplo, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), gastritis autoinmunitaria y anemia perniciosa, hepatitis autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria y celiacía), vasculitis (tal como, por ejemplo, vasculitis ANCA negativa y vasculitis asociada a ANCA, incluida vasculitis de Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener y poliangitis microscópica), trastornos neurológicos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, esclerosis múltiple, síndrome de opsoclonía-mioclónia, miastenia grave, neuromielitis óptica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y polineuropatías autoinmunitarias), trastornos renales (tales como, por ejemplo, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture y la enfermedad de Berger), trastornos dermatológicos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, soriasis, urticaria, habones, pénfigo vulgar, pénfigo ampolloso y lupus eritematoso cutáneo), trastornos hemáticos (tales como, por ejemplo, púrpura trombocitopénica, púrpura trombocitopénica trombótica, púrpura postransfusional y anemia hemolítica autoinmunitaria), ateroesclerosis, uveítis, enfermedades auditivas autoinmunitarias (tales como, por ejemplo, enfermedad del oído interno y pérdida de audición), enfermedad de Behcet, síndrome de Raynaud, trasplante de órganos, y trastornos endocrinos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, trastornos autoinmunitarios relacionados con la diabetes tales como diabetes sacarina insulino dependiente (DSID), enfermedad de Addison y enfermedad tiroidea autoinmunitaria (por ejemplo, enfermedad de Grave y tiroiditis)). Las enfermedades de este tipo más preferidas incluyen, por ejemplo, AR, colitis ulcerosa, vasculitis asociada a ANCA, lupus, esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren, enfermedad de Graves, DSID, anemia perniciosa, tiroiditis y glomerulonefritis.

La expresión "agente citotóxico", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o produce su destrucción. La expresión incluye isótopos radiactivos (p. ej., At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², PAG³² e isótopos radiactivos de Lu), y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacterianos, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.

Un "agente quimioterápico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®); alquilsulfonatos, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocuaona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilmelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético de topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; pemetrexed; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos, adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (en particular, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; TLK-286; CDP323, un inhibidor oral de alfa-4 integrina; una sarcoditiina; espongiestatina; mostazas nitrogenadas, tales como clorambucilo, clomafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma 11 y caliqueamicina omega I1 (véase, p. ej., Nicolaou *et al.*, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarcinostatina y cromóforos de antibióticos de enediina relacionados con cromoproteína, aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluida ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, inyección de liposomas de HCl de doxorubicina (DOXIL®) y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina e imatinib (un derivado de 2-fenilaminopirimidina), así como otros inhibidores de c-Kit; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido folínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulinico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfomitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguaona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidracida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziucina; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, p. ej., paclitaxel (TAXOL®), formulación de nanopartículas de paclitaxel diseñadas con albúmina (ABRAXANE™), y doxetaxel (TAXOTERE®);

clorambucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovorina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilhilomitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico; sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona y FOLFOX, una abreviatura para el régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina. Un agente quimioterápico particularmente preferido útil en combinación con los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención, especialmente en el tratamiento de la inmunidad tumoral es la gemcitabina.

También se incluyen en esta definición los agentes antihormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de las hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer y, con frecuencia, se presentan en forma de tratamiento sistémico o de todo el cuerpo. Pueden ser, en sí, hormonas. Los ejemplos incluyen antiestrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM, por sus siglas en inglés), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluido NOLVADEX® tamoxifeno), raloxifeno (EVISTA®), droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristone, y toremifeno (FARESTON®); anti-progesteronas; reguladores negativos del receptor de estrógenos (ERD); antagonistas de receptores de estrógeno como fulvestrant (FASLODEX®); agentes que funcionan suprimiendo o anulando los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de hormona leutinizante (LHRH), como el acetato de leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), acetato de goserelina, acetato de buserelina y triptorelina; antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tal como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol (MEGASE®), exemestano (AROMASIN®), formestano, fadrozol, vorozol (RIVISOR®), letrozol (FEMARA®) y anastrozol (ARIMIDEX®). Además, dicha definición de agentes quimioterápicos incluye bifosfonatos como el clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®) o risedronato (ACTONEL®); así como troxacitabina (un análogo nucleosídico de citosina 1,3-dioxolano); oligonucleótidos anti-sentido, particularmente, los que inhiben la expresión de genes en vías de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tal como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas, tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®, inhibidor de topoisomerasa 1 (p. ej., LURTOTECAN®); un antiestrógeno tal como fulvestrant; un inhibidor de Kit tal como imatinib o EXEL-0862 (un inhibidor de tirosina cinasa); inhibidor de EGFR como erlotinib o cetuximab; un inhibidor anti-VEGF tal como bevacizumab; irinotecán; rnrRH (p. ej., ABARELIX®); lapatinib y ditosilato de lapatinib (un inhibidor de molécula pequeña de tirosina cinasa doble de ErbB-2 y EGFR, también conocido como GW572016); 17AAG (derivado de geldanamicina que es un veneno de proteína de choque térmico (Hsp, *heat shock protein*) 90) y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

A "agente inhibidor del crecimiento" se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, cuyo crecimiento depende de la activación del receptor *in vitro* o *in vivo*. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento incluye uno que reduce significativamente el porcentaje de células dependientes del receptor en la fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un punto distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la detención en G1 y la detención en la fase M. Los bloqueadores clásicos de la fase M incluyen las vincas y los alcaloides de la vinca (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de topoisomerasa II, tales como doxorubicina, epirrubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Aquellos agentes que detienen la fase G1 también se pasan a la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Se puede encontrar más información en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami *et al.* (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente la página 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticancerosos ambos derivados del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), procedente del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb).

El término "citocina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan en otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de dichas citocinas son linfocinas, monocinas; interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-35, incluyendo PROLEUKIN® rIL-2; un factor de necrosis tumoral, tal como TNF- α o TNF- β ; y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y ligando kit (KL, *kit ligand*), mientras que el término "interleucina" se ha convertido esencialmente en sinónimo de citocina. Como se utiliza en el presente documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia natural, incluyendo entidades de molécula pequeña producidas sintéticamente y sus derivados y sales farmacéuticamente aceptables. Las citocinas se pueden clasificar según la ubicación proximal de la diana prevista, en donde *autocrino* se refiere a la acción sobre la misma célula de la que se secreta, *paracrino* se refiere a la acción restringida a la vecindad inmediata en la que se secreta la citocina, y *endocrino* se refiere a la acción en regiones distantes del organismo. Las inmuno citocinas también se pueden clasificar según si mejoran una respuesta de tipo I, (p. ej., IFN- γ , TGF- β *etc.*), que favorecen la inmunidad celular o una respuesta tipo II (IL-4, IL-10, IL-13, *etc.*), que favorecen la inmunidad humoral o de anticuerpos. Las inmuno citocinas desempeñan funciones en la coestimulación, maduración, proliferación,

activación, inflamación, crecimiento, diferenciación, producción y secreción de citocinas, y la supervivencia de diversas células inmunitarias.

El término "*hormona*" se refiere a hormonas polipeptídicas, que generalmente son secretadas por órganos glandulares con conductos. Entre las hormonas se incluyen, por ejemplo, la hormona del crecimiento como la hormona del crecimiento humano, la hormona de crecimiento humano con N-metionilo y la hormona de crecimiento bovino; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; estradiol; terapia de reemplazo hormonal; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitostano o testolactona; prorrelaxina; hormonas glucoproteicas, tales como la hormona folículo estimulante (FSH, *follicle stimulating hormone*), hormona estimulante de la tiroides (TSH, *thyroid stimulating hormone*) y hormona luteinizante (LH, *luteinizing hormone*); prolactina, lactógeno placentario, péptido asociado a gonadotropina de ratón, hormona liberadora de gonadotropina; inhibina; activina; sustancia inhibidora mulleriana; y trombopoyetina. Como se utiliza en el presente documento, el término hormona incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de la hormona de secuencia natural, incluyendo entidades de molécula pequeña producidas sintéticamente y sus derivados y sales farmacéuticamente aceptables.

III. Modo de realizar la invención

A. Humanización mediante presentación en fagos

Las variantes injertadas en la región hipervariable descritas en el presente documento se generaron mediante mutagénesis de Kunkel del ácido nucleico que codifica las secuenciasceptoras humanas, utilizando un oligonucleótido distinto para cada región hipervariable. Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987). Se pueden introducir cambios apropiados dentro de la región estructural y/o hipervariable utilizando técnicas habituales, para corregir y restablecer interacciones apropiadas entre región hipervariable y antígeno.

La presentación en fagos(fagémidos) (también denominada en el presente documento presentación en fagos) se puede utilizar como un método conveniente y rápido para generar y explorar muchas posibles variantes de anticuerpos diferentes en una biblioteca generada mediante aleatorización de secuencias. Sin embargo, el experto en la materia dispone de otros métodos para producir y explorar anticuerpos alterados.

La presentación en fagos(fagémidos) (también denominada en el presente documento presentación en fagos en algunos contextos) se puede utilizar como un método conveniente y rápido para generar y explorar muchas posibles variantes de anticuerpos diferentes en una biblioteca generada mediante aleatorización de secuencias. Sin embargo, el experto en la materia dispone de otros métodos para producir y explorar anticuerpos alterados.

La tecnología de presentación en fagos(fagémidos) ha proporcionado una poderosa herramienta para generar y seleccionar nuevas proteínas que se unen a un ligando, tal como un antígeno. El uso de técnicas de presentación en fagos (fagémidos) permite la generación de grandes bibliotecas de variantes de proteínas que pueden clasificarse rápidamente para aquellas secuencias que se unen a una molécula diana con alta afinidad. Los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos variantes generalmente se fusionan con una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de cubierta vírica, tal como la proteína del gen III o la proteína del gen VIII. Se han desarrollado sistemas de presentación en fagémidos monovalentes donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína o el polipéptido se fusiona con una secuencia de ácido nucleico que codifica una parte de la proteína del gen III. (Bass, S., *Proteins*, 8:309 (1990); Lowman y Wells, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 3:205 (1991)). En un sistema de presentación en fagémidos monovalentes, la fusión génica se expresa a niveles bajos y las proteínas del gen III de tipo silvestre también se expresan de manera que se conserva la infectividad de las partículas. En muchas patentes se han descrito métodos para generar peptidotecas y explorarlas (véase, p. ej., la patente de EE. UU. n.º 5.723.286, la patente de EE.UU. n.º 5.432, 018, la patente de EE.UU. n.º 5.580.717, la patente de EE.UU. n.º 5.427.908 y la patente de EE. UU. n.º 5.498.530).

Se han preparado bibliotecas de anticuerpos o polipéptidos de unión a antígeno de diversas maneras, incluso alterando un solo gen mediante la inserción de secuencias de ADN aleatorias o clonando una familia de genes relacionados. En las patentes de EE.UU. n.º 5.750.373, 5.733.743, 5.837.242, 5.969.108, 6.172.197, 5.580.717 y 5.658.727, se han descrito métodos para presentar anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno utilizando la presentación en fagos(fagémidos). Después, la biblioteca se explora para determinar la expresión de los anticuerpos o de las proteínas de unión a antígeno con las características deseadas.

Los métodos para sustituir un aminoácido de elección en un ácido nucleico molde están bien establecidos en la técnica, algunos de los cuales se describen en el presente documento. Por ejemplo, los restos de la región hipervariable se pueden sustituir utilizando el método de Kunkel. Véase, p. ej., Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987).

La secuencia de oligonucleótidos incluye uno o más de los conjuntos de codones diseñados para los restos de la región hipervariable que se van a alterar. Un conjunto de codones se refiere a un conjunto de diferentes secuencias triplete de nucleótidos utilizadas para codificar aminoácidos variantes deseados. Los conjuntos de codones se pueden representar utilizando símbolos para designar nucleótidos particulares o mezclas equimolares de nucleótidos como se

muestra a continuación de acuerdo con el código IUB.

CÓDIGOS IUB

G (Guanina)	Y (C o T)	H (A o C o T)
A (Adenina)	M (A o C)	B (C o G o T)
T (Timina)	K (G o T)	V (A o C o G)
C (Citosina)	S (C o G)	D (A o G o T)
R (A o G)	W (A o T)	N (A o C o G o T)
Por ejemplo, en el conjunto de codones DVK, D pueden ser los nucleótidos A o G o T; V puede ser A, G o C; y K puede ser G o T. Este conjunto de codones puede presentar 18 codones diferentes y puede codificar los aminoácidos Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly y Cys.		

5 Los conjuntos de oligonucleótidos o cebadores se pueden sintetizar utilizando métodos estándar. Un conjunto de oligonucleótidos puede sintetizarse, por ejemplo, por síntesis en fase sólida, que contiene secuencias que representan todas las posibles combinaciones de tripletes de nucleótidos proporcionados por el conjunto de codones y que codificarán el grupo de aminoácidos deseado. La síntesis de oligonucleótidos con "degeneración" de nucleótidos seleccionada en ciertas posiciones se conoce bien en la técnica. Dichos conjuntos de oligonucleótidos que tienen determinados conjuntos de codones pueden sintetizarse utilizando sintetizadores de ácido nucleico comerciales (disponibles, por ejemplo, en Foster City, CA) o pueden obtenerse en el comercio (por ejemplo, en Life Technologies, Rockville, MD). Por lo tanto, un conjunto de oligonucleótidos sintetizados que tiene un conjunto de codones particular incluye normalmente una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, las diferencias establecidas por el conjunto de codones dentro de la secuencia general. Los oligonucleótidos, como se utiliza de acuerdo con la invención, tienen secuencias que permiten la hibridación con un molde de ácido nucleico de dominio variable y también pueden incluir sitios de enzimas de restricción con fines de clonación.

20 En un método, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican aminoácidos variantes pueden crearse mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos. Esta técnica es muy conocida en la materia tal como la describen Zoller *et al.* Nucleic Acids Res. 10: 6487-6504 (1987). Resumiendo, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican aminoácidos variantes se crean hibridando un conjunto de oligonucleótidos, que codifican los conjuntos de codones deseados, con un molde de ADN, donde el molde es la forma monocatenaria del plásmido que contiene una secuencia molde de ácido nucleico de región variable. Después de la hibridación, se utiliza ADN polimerasa para sintetizar una segunda hebra complementaria completa del molde que incorporará así el cebador oligonucleotídico y contendrá los conjuntos de codones proporcionados por el conjunto de oligonucleótidos.

30 Generalmente, se utilizan oligonucleótidos de una longitud de al menos 25 nucleótidos. Un oligonucleótido óptimo tendrá de 12 a 15 nucleótidos que sean completamente complementarios al molde en cada lado del nucleótido o de los nucleótidos que codifican la mutación o mutaciones. Esto garantiza que el oligonucleótido se hibridará adecuadamente con la molécula molde de ADN monocatenario. Los oligonucleótidos se sintetizan fácilmente utilizando técnicas conocidas en la materia tales como las descritas por Crea. *et al.*, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 75:5765 (1978).

35 El molde de ADN se genera mediante aquellos vectores derivan de vectores de bacteriófago M13 (los vectores M13mp18 y M13mp19 disponibles en el comercio son adecuados), o aquellos vectores que contienen un origen de replicación de fago monocatenario como describen Viera. *et al.*, Meth. Enzymol., 153:3 (1987). Por tanto, el ADN que se va a mutar se puede insertar en uno de estos vectores para generar un molde monocatenario. La producción del molde monocatenario se describe en las secciones 4.21-4.41 de Sambrook *et al.*, citado anteriormente.

40 Para alterar la secuencia de ADN natural, el oligonucleótido se hibrida con el molde monocatenario en condiciones de hibridación adecuadas. Una enzima polimerizadora de ADN, generalmente la ADN polimerasa T7 o el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, se añade después para sintetizar la cadena complementaria del molde utilizando el oligonucleótido como cebador para la síntesis. De este modo se forma una molécula heterodúplex de manera que una hebra de ADN codifica la forma mutada del gen 1 y la otra hebra (el molde original) codifica la secuencia del gen 1 natural, no alterada. Esta molécula heterodúplex luego se transforma después en una célula hospedadora adecuada, generalmente una célula procariota tal como *E. coli* JM101. Después de hacer crecer las células, éstas se colocan en placas de agarosa y se analizan utilizando el cebador oligonucleotídico radiomarcado con ³²Fosfato para identificar las colonias bacterianas que contienen el ADN mutado.

50 El método que se acaba de describir puede modificarse de manera que se cree una molécula homodúplex en la que ambas hebras del plásmido contengan la(s) mutación(es). Las modificaciones son las siguientes: el oligonucleótido monocatenario se hibrida con el molde monocatenario como se ha descrito anteriormente. Una mezcla de tres desoxirribonucleótidos, desoxirriboadenosina (dATP), desoxirriboguanosina (dGTP) y desoxirribotimidina (dTTP), se combina con una tiodesoxirribocitosina modificada denominada dCTP-(aS) (que se puede obtener en Amersham). Esta mezcla se añade al complejo molde-oligonucleótido. Tras la adición de ADN polimerasa a esta mezcla, se genera

una hebra de ADN idéntica al molde excepto por las bases mutadas. Además, esta nueva hebra de ADN contendrá dCTP-(aS) en lugar de dCTP, lo que sirve para protegerlo de la digestión con endonucleasas de restricción. Después de cortar la hebra molde del heterodúplex bicatenario con una enzima de restricción apropiada, la hebra molde se puede digerir con nucleasa ExoIII u otra nucleasa apropiada para cortar en otra región que no sea la que contiene el sitio o los sitios que se van a mutagenizar. Después, se detiene la reacción para dejar una molécula que es sólo parcialmente monocatenaria. Después, se forma un homodúplex de ADN bicatenario completo utilizando ADN polimerasa en presencia de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato, ATP y ADN ligasa. Esta molécula homodúplex puede después transformarse en una célula hospedadora adecuada.

Como se ha indicado previamente, la secuencia del conjunto de oligonucleótidos tiene una longitud suficiente para hibridar con el ácido nucleico molde y también puede, aunque no necesariamente, contienen sitios de restricción. El molde de ADN puede generarse mediante aquellos vectores que derivan de vectores del bacteriófago M13 o vectores que contienen un origen de replicación de fago monocatenario como describen Viera. *et al.* Meth. Enzymol., 153:3 (1987). Por tanto, el ADN que se va a mutar debe insertarse en uno de estos vectores para generar un molde monocatenario. La producción del molde monocatenario se describe en las secciones 4.21-4.41 de Sambrook *et al.*, citado anteriormente.

Según otro método, se puede generar una biblioteca proporcionando conjuntos de oligonucleótidos en dirección 5' y 3', teniendo cada conjunto una pluralidad de oligonucleótidos con secuencias diferentes, las diferentes secuencias establecidas por los conjuntos de codones proporcionados dentro de la secuencia de los oligonucleótidos. Los conjuntos de oligonucleótidos en dirección 5' y 3', junto con una secuencia de ácido nucleico molde de dominio variable, pueden utilizarse en una reacción en cadena de la polimerasa para generar una "biblioteca" de productos de PCR. Los productos de PCR pueden denominarse "casetes de ácido nucleico", ya que pueden fusionarse con otras secuencias de ácidos nucleicos relacionadas o no relacionadas, por ejemplo, proteínas de cubierta vírica y dominios de dimerización, utilizando técnicas de biología molecular establecidas.

La secuencia de los cebadores de PCR incluye uno o más de los conjuntos de codones diseñados para las posiciones accesibles al disolvente y sumamente diversas en una región hipervariable. Como se ha descrito anteriormente, un conjunto de codones se refiere a un conjunto de diferentes secuencias triplete de nucleótidos utilizadas para codificar aminoácidos variantes deseados. Los anticuerpos selectores que cumplen los criterios deseados, seleccionados mediante las etapas de exploración/selección adecuadas, pueden aislarse y clonarse mediante técnicas recombinantes estándar.

B. Preparación mediante técnicas recombinantes

En el presente documento también se desvela un ácido nucleico aislado que codifica anticuerpos anti-PD-L1, vectores y células hospedadoras que comprenden dicho ácido nucleico, y técnicas recombinantes para la producción del anticuerpo.

Para la producción recombinante del anticuerpo, el ácido nucleico que lo codifica se aísla e inserta en un vector replicable para una clonación adicional (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica el anticuerpo monoclonal se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (p. ej., utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. La elección del vector depende en parte de la célula hospedadora que se utilizará. Generalmente, las células hospedadoras preferidas son de origen procariota o eucariota (generalmente de mamífero).

1. Producción de anticuerpos en células procariotas

a) *Construcción de vectores*

Las secuencias de polinucleótidos que codifican los componentes polipeptídicos de los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención, pueden obtenerse utilizando técnicas recombinantes convencionales. Las secuencias de polinucleótidos deseadas se pueden aislar y secuenciar a partir de células productoras de anticuerpos, tales como células de hibridoma. Como alternativa, los polinucleótidos pueden sintetizarse utilizando un sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicarse y expresar polinucleótidos heterólogos en hospedadores procariotas. Muchos vectores que están disponibles y son conocidos en la materia pueden usarse para el propósito de la presente invención. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos que se insertarán en el vector y de la célula hospedadora particular que se va a transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de un polinucleótido heterólogo, o ambas) y su compatibilidad con la célula hospedadora particular en la que reside. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero sin limitación: un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión al ribosoma (RBS), una secuencia señal, el inserto de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

En general, se utilizan vectores plasmídicos que contienen un replicón y secuencias de control que proceden de especies compatibles con la célula hospedadora en relación con estos hospedadores. El vector normalmente porta un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que pueden proporcionar selección fenotípica en las células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma habitualmente utilizando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y, por tanto, proporciona medios fáciles para identificar células transformadas. pBR322, sus derivados u otros plásmidos microbianos o bacteriófagos también pueden contener, o modificarse para contener, promotores que puede usar el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas. Ejemplos de derivados de pBR322 usados para la expresión de anticuerpos particulares se describen con detalle en Carter *et al.*, patente de EE.UU. n.º 5.648.237).

Además, los vectores de fago que contienen un replicón y secuencias de control que son compatibles con el microorganismo hospedador pueden usarse como vectores de transformación junto con estos hospedadores. Por ejemplo, se puede utilizar un bacteriófago, tal como GEM.TM.-11, para preparar un vector recombinante que se puede usar para transformar células hospedadoras susceptibles tales como *E. coli* LE392.

El vector de expresión puede comprender dos o más pares promotor-cistrón, que codifican cada uno de los componentes polipeptídicos. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida situada cadena arriba (5') de un cistrón que modula su expresión. Los promotores procariontes normalmente se dividen en dos clases, inducibles y constitutivos. El promotor inducible es un promotor que inicia niveles aumentados de la transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en la condición de cultivo, p.ej., la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura.

Se conoce un gran número de promotores reconocidos por una variedad de posibles células hospedadoras. El promotor seleccionado puede unirse operativamente al ADN de cistrón que codifica la cadena ligera o pesada mediante la eliminación del promotor del ADN fuente a través de la digestión con enzimas de restricción y la inserción de la secuencia promotora aislada en el vector. Para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana, puede utilizarse tanto la secuencia promotora natural como muchos promotores heterólogos. Se pueden utilizar promotores heterólogos, ya que generalmente permiten una mayor transcripción y mayores rendimientos del gen diana expresado en comparación con el promotor polipeptídico diana natural.

Los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariontes incluyen el promotor PhoA, los sistemas promotores de - galactosidasa y lactosa, un sistema de promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos, tales como el promotor *tac* o *trc*. Sin embargo, también son adecuados otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacterianos o fagos conocidos). Sus secuencias nucleotídicas se han publicado, lo que permite a un trabajador experto ligarlas operativamente a cistrones que codifican las cadenas ligera y pesada diana (Sicbenlist *et al.* (1980) Cell 20: 269) utilizando enlazadores o adaptadores para suministrar cualquiera de los sitios de restricción requeridos.

Cada cistrón dentro del vector recombinante comprende un componente de la secuencia señal de secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN polipeptídico diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada para el propósito de esta invención debe ser una que sea reconocida y procesada (es decir escindida por una señal peptidasa) por la célula hospedadora. En el caso de las células hospedadoras procariontes que no reconocen ni procesan las secuencias señal naturales de los polipéptidos heterólogos, la secuencia señal se reemplaza por una secuencia señal procarionte seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o líderes termoestables de enterotoxina II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. Las secuencias señal utilizadas en ambos cistrones del sistema de expresión pueden ser secuencias señal de STII o variantes de las mismas.

La producción de los anticuerpos anti-PD-L1 de acuerdo con la invención puede producirse en el citoplasma de la célula hospedadora y, por lo tanto, no precisa la presencia de secuencias señal de secreción dentro de cada cistrón. En ese sentido, las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina se expresan, pliegan y ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales dentro del citoplasma. Determinadas cepas hospedadoras (p. ej., cepas *trxB⁻* de *E. coli*) proporcionan condiciones en el citoplasma que son favorables para la formación de enlaces disulfuro, permitiendo de ese modo el plegamiento y ensamblaje apropiados de las subunidades proteicas expresadas. Proba y Pluckthun Gene, 159:203 (1995).

En el presente documento también se describe un sistema de expresión en el que la proporción cuantitativa de componentes polipeptídicos expresados se puede modular para maximizar el rendimiento de anticuerpos secretados y ensamblados adecuadamente de la invención. Dicha modulación se logra al menos en parte modulando simultáneamente las intensidades de traducción de los componentes del polipéptido.

Una técnica para modular la intensidad de la traducción se describe en Simmons *et al.*, patente de EE.UU. n.º 5.840.523. Esta utiliza variantes de la región de inicio de la traducción (TIR, *translational initiation region*) dentro de un cistrón. Para una TIR dada, se puede crear una serie de variantes de secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos con un intervalo de intensidades de traducción, proporcionando de este modo un medio conveniente por el cual ajustar este factor al nivel de expresión deseado de la cadena específica. Mediante técnicas de mutagénesis

convencionales que producen cambios en los codones que pueden alterar la secuencia de aminoácidos, pueden generarse variantes de la TIR, aunque se prefieren cambios silenciosos en la secuencia de nucleótidos. Las alteraciones en la TIR pueden incluir, por ejemplo, alteraciones en el número o separación de las secuencias de Shine-Dalgarno, junto con alteraciones en la secuencia de la señal. Un método para generar secuencias señal mutantes es la generación de un "banco de codones" al comienzo de una secuencia codificante que no cambia la secuencia de aminoácidos de la secuencia señal (es decir, los cambios son silenciosos). Esto se puede lograr cambiando la tercera posición de nucleótido de cada codón; adicionalmente, algunos aminoácidos, tales como leucina, serina y arginina, tienen múltiples primeras y segundas posiciones que pueden añadir complejidad a la hora de crear el banco. Este método de mutagénesis se describe con detalle en Yansura *et al.* (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158.

Preferentemente, se genera en su interior un conjunto de vectores con un intervalo de intensidades de la TIR para cada cistrón. Este conjunto limitado proporciona una comparación de los niveles de expresión de cada cadena, así como del rendimiento de los productos de anticuerpo deseados bajo diversas combinaciones de intensidad de la TIR. Las intensidades de la TIR (región de inicio de la traducción) se pueden determinar cuantificando el nivel de expresión de un gen indicador como se describe con detalle en Simmons *et al.*, patente de EE.UU. n.º 5. 840.523. Basándose en la comparación de intensidad de la traducción, las TIR individuales deseadas se seleccionan para combinarse en las construcciones del vector de expresión de la invención.

b) Células hospedadoras procariotas.

Las células hospedadoras procariotas adecuadas para expresar los anticuerpos anti-PD-L1 de la divulgación incluyen arqueobacterias y eubacterias, tales como organismos gramnegativos o grampositivos. Ejemplos de bacterias útiles incluyen *Escherichia* (p. ej., *E. coli*), *Bacilli* (p. ej., *B. subtilis*), enterobacterias, especies de *Pseudomonas* (p. ej., *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* o *Paracoccus*. Se pueden utilizar células gramnegativas. Como hospedadores para la invención, pueden utilizarse células de *E. coli*. Los ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen la cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), págs. 1190-1219; depósito de la ATCC n.º 27.325) y sus derivados, incluyendo la cepa 33D3 que tiene el genotipo W3110 $\Delta fhuA$ ($\Delta tonA$) *ptr3 lac lq lacL8* $\Delta ompT\Delta$ (*nmpc-fepE*) *degP41 kan^R* (patente de EE.UU. n.º 5.639.635). Otras cepas y sus derivados, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31.608) son también adecuadas. Estos ejemplos son ilustrativos más que limitativos. Los métodos para construir derivados de cualquiera de las bacterias mencionadas anteriormente que tienen genotipos definidos se conocen en la materia y se describen en, por ejemplo, Bass *et al.*, Proteins, 8:309-314 (1990). En general, es necesario seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en cuenta la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, como hospedador puede utilizarse adecuadamente *E. coli* o especies de *Serratia* o *Salmonella* cuando se utilizan plásmidos bien conocidos, tales como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 para suministrar el replicón.

Normalmente, la célula hospedadora debería secretar pequeñas cantidades de enzimas proteolíticas, y es deseable que se incorporen al cultivo celular inhibidores adicionales de la proteasa.

c) Producción de anticuerpos

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión descritos anteriormente y se cultivan en medios nutritivos convencionales modificados según sea apropiado para inducir los promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Transformación significa introducir ADN en el hospedador procariota para que el ADN sea replicable, ya sea como elemento extracromosómico o por un integrante cromosómico. Dependiendo de la célula hospedadora utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas convencionales apropiadas para tales células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio generalmente se utiliza para células bacterianas que contienen barreras sustanciales de pared celular. Otro método para la transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Sin embargo, otra técnica utilizada es la electroporación.

Las células procariotas utilizadas para producir los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención se cultivan en medios conocidos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células hospedadoras seleccionadas. Los ejemplos de medios adecuados incluyen caldo de luria (LB, *Luria Broth*) y suplementos nutricionales necesarios. Los medios también pueden contener un agente de selección, elegido basándose en la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el cultivo de células procariotas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina a los medios para el cultivo de células que expresan un gen de resistencia a ampicilina.

Cualquier complemento necesario además de carbono, nitrógeno y fuentes de fosfato inorgánico también puede incluirse en concentraciones apropiadas, introducidos solos o como una mezcla con otro complemento o medio tal como una fuente de nitrógeno complejo. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol y ditiotreitrol.

Las células hospedadoras procariotas se cultivan a temperaturas adecuadas. Para el crecimiento de *E. coli*, por ejemplo, la temperatura preferida varía de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 39 °C, más preferentemente

de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 37 °C, incluso más preferentemente a aproximadamente 30 °C. El pH del medio puede ser cualquier pH que varíe de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo hospedador. Para *E. coli*, el pH es preferentemente de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4, y más preferentemente de aproximadamente 7,0.

Si se utiliza un promotor inducible en el vector de expresión de la invención, la expresión de proteínas se induce en condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un aspecto de la invención, los promotores PhoA se utilizan para controlar la transcripción de los polipéptidos. Por consiguiente, las células hospedadoras transformadas se cultivan en un medio limitante de fosfato para la inducción. Preferentemente, el medio limitante de fosfato es el medio C.R.A.P (véase, p. ej., Simmons *et al.*, J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147). Puede utilizarse una diversidad de inductores, de acuerdo con la construcción de vector empleada, como se sabe en la técnica.

Las proteínas de anticuerpos expresadas pueden secretarse y recuperarse del periplasma de las células hospedadoras. La recuperación de proteínas normalmente implica la rotura del microorganismo, generalmente por medios tales como choque osmótico, tratamiento con ultrasonidos o lisis. Una vez que las células se rompen, los restos celulares o las células enteras pueden eliminarse mediante centrifugación o filtración. Las proteínas pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, mediante cromatografía de resina de afinidad. Como alternativa, las proteínas pueden llevarse a medios de cultivo y aislarse en ellos. Las células se pueden eliminar del cultivo y el sobrenadante del cultivo se puede filtrar y concentrar para la purificación adicional de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden aislarse e identificarse adicionalmente utilizando métodos comúnmente conocidos, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de transferencia de Western.

Como alternativa, la producción de anticuerpos se realiza en gran cantidad mediante un proceso de fermentación. Diversos procedimientos de fermentación discontinua a gran escala están disponibles para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1000 litros de capacidad, preferentemente aproximadamente 1.000 a 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores usan impulsores agitadores para distribuir el oxígeno y los nutrientes, especialmente la glucosa (la fuente preferida de carbono/energía). La fermentación a pequeña escala se refiere generalmente a la fermentación en un fermentador que no tiene más que aproximadamente 100 litros de capacidad volumétrica y puede variar desde aproximadamente 1 litro hasta aproximadamente 100 litros.

Durante el proceso de fermentación, la inducción de la expresión de proteínas normalmente se inicia después de que las células hayan crecido en condiciones adecuadas hasta una densidad deseada, p. ej., a una DO₅₅₀ de aproximadamente 180-220, estadio en el cual las células están en la fase estacionaria temprana. Se puede usar una diversidad de inductores, de acuerdo con la construcción de vector empleada, como se conoce en la materia y se ha descrito anteriormente. Las células pueden crecer durante períodos más cortos antes de la inducción. Las células generalmente se inducen durante aproximadamente 12-50 horas, aunque se puede usar un tiempo de inducción más largo o más corto.

Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los anticuerpos de la invención, se pueden modificar diversas condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje y plegamiento apropiados de los polipéptidos de anticuerpo secretados, pueden utilizarse vectores adicionales que sobreexpresan proteínas chaperonas, tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DDsbD y/o DsbG) o FkpA (una peptidilproilil *cis*, *trans*-isomerasa con actividad chaperona) para co-transformar las células procariontas hospedadoras. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el plegamiento y la solubilidad adecuados de las proteínas heterólogas producidas en células hospedadoras bacterianas. Chen *et al.* (1999) J Bio Chem 274: 19601-19605; Georgiou *et al.*, patente de EE. UU. n.º 6.083.715; Georgiou *et al.*, patente de EE. UU. n.º 6.027.888; Bothmann y Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105; Ramm y Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie *et al.* (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210.

Para minimizar la proteólisis de las proteínas heterólogas expresadas (especialmente las que son proteolíticamente sensibles), para la presente divulgación, pueden utilizarse determinadas cepas hospedadoras deficientes en enzimas proteolíticas. Por ejemplo, cepas de células hospedadora pueden modificarse para efectuar una o más mutaciones génicas en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas, tales como Proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, Proteasa VI y combinaciones de las mismas. Algunas cepas de *E. coli* deficientes en proteasa están disponibles y se describen en, por ejemplo, Park *et al.* 1998, citado anteriormente; Georgiou *et al.*, la patente de EE. UU. n.º 5.264.365; Georgiou *et al.*, la patente de EE. UU. n.º 5.508.192; Hara *et al.*, Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996).

Como células hospedadoras en el sistema de expresión que codifica los anticuerpos de la invención pueden utilizarse cepas de *E. coli* deficientes en enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas chaperonas.

d) Purificación de anticuerpos

El anticuerpo producido en el presente documento se purifica adicionalmente para obtener preparaciones que son sustancialmente homogéneas para ensayos y usos adicionales. Se pueden emplear métodos convencionales de

purificación de proteínas conocidos en la técnica. Los siguientes procedimientos son ilustrativos de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio catiónico tal como DEAE, cromatofoco, SDS-PAGE, precipitación en sulfato de amonio y filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75.

En un aspecto, la Proteína A inmovilizada en una fase sólida se utiliza para la purificación por inmunoafinidad de los productos de anticuerpos de longitud completa de la invención. La proteína A es una proteína de pared celular de 41 kD de *Staphylococcus aureus* que se une con alta afinidad a la región Fc de los anticuerpos. Lindmark et al (1983) J. Immunol. Meth. 62: 1-13. La fase sólida en la que se inmoviliza la Proteína A es preferentemente una columna que comprende una superficie de vidrio o sílice, más preferentemente una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna se ha recubierto con un reactivo, tal como glicerol, en un intento de impedir la adherencia inespecífica de contaminantes. Después, se lava la fase sólida para eliminar los contaminantes unidos no específicamente a la fase sólida. Finalmente, el anticuerpo de interés se recupera de la fase sólida mediante elución.

2. Producción de anticuerpos en células eucariotas

Para la expresión eucariota, los componentes del vector incluyen generalmente, pero sin limitación, uno o más de lo siguiente, una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores y un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

a) Componente de secuencia señal

Un vector para su uso en un hospedador eucariota también puede ser un inserto que codifique una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína madura o del polipéptido maduro. La secuencia señal heteróloga seleccionada es preferentemente una que reconoce y procesa (es decir, escinde una peptidasa de señal) la célula hospedadora. En la expresión en células de mamífero, las secuencias señal de mamíferos, así como líderes secretorios víricos, por ejemplo, la señal gD del herpes simple, están disponibles.

El ADN para tal región precursora se liga en marco de lectura al ADN que codifica los anticuerpos de la invención.

b) Origen de la replicación

Generalmente, el componente del origen de la replicación no es necesario para vectores de expresión de mamífero (el origen de SV40 puede usarse normalmente solo porque contiene el promotor temprano).

c) Componente del gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección normales codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos o a otras toxinas, p. ej., ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles a partir de medios complejos, p. ej., el gen que codifica la D-alanina racemasa de *Bacilli*.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Las células que se transforman satisfactoriamente con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a un fármaco y, por tanto, sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de tal uso de selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables, adecuados para células de mamífero, son los que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico que codifica los anticuerpos de la invención, tales como DHFR, timidina cinasa, metalotioneína I y II, preferentemente genes de la metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican primero cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula hospedadora apropiada cuando se emplea DHFR de tipo silvestre es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad de DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

Como alternativa, pueden seleccionarse células hospedadoras (particularmente hospedadoras de tipo silvestre que contengan DHFR endógeno) transformadas o cotransformadas con las secuencias de ADN codificantes de anticuerpo, y otro marcador seleccionable tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) mediante crecimiento celular en medio que contenga un agente de selección para el marcador seleccionable, tal como un antibiótico aminoglucosídico, p. ej., kanamicina, neomicina o G418. Véase la patente de EE.UU. n.º 4.965.199.

d) *Componente promotor*

Los vectores de expresión y clonación contienen habitualmente un promotor que reconoce el organismo hospedador y que está unido operativamente al ácido nucleico que codifica las secuencias de anticuerpo deseadas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente de 25 a 30 bases en la dirección 5' del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia que se encuentra de 70 a 80 bases en la dirección 5' desde el inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT, donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola de poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias pueden insertarse adecuadamente en vectores de expresión eucariotas.

Otros promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen el promotor *phoA*, los sistemas promotores de -lactamasa y lactosa, el promotor de fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica el polipéptido de anticuerpo.

La transcripción del polipéptido de anticuerpo a partir de vectores en células hospedadoras de mamífero está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus del poliovirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y más preferentemente virus de simio 40 (SV40), de promotores de mamíferos heterólogos, p. ej., el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, a condición de que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras.

Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que contiene también el origen de replicación del virus SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E. Un sistema para expresar ADN en hospedadores mamíferos que usan el virus del papiloma bovino como un vector se divulga en la patente de EE.UU. n.º 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de EE.UU. n.º 4.601.978. Véase también Reyes *et al.*, Nature 297: 598-601 (1982), que describen la expresión de ADNc de -interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple. Como alternativa, como promotor puede utilizarse la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous.

e) *Componente de elemento potenciador*

La transcripción de un ADN que codifica los anticuerpos de la presente invención por eucariotas superiores a menudo se incrementa al insertar una secuencia potenciadora en el vector. Ahora se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Sin embargo, habitualmente, se utilizará un potenciador de un virus de células eucariotas. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (100-270 pb), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del poliovirus en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia que codifica el anticuerpo, pero preferentemente se localiza en un sitio 5' del promotor.

f) *Componente de terminación de la transcripción*

Los vectores de expresión utilizados en las células hospedadoras eucariotas (células de levadura, hongos, insectos, plantas, animales, humanas o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están comúnmente disponibles a partir de las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADN o ADNc de eucariotas o virus. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente útil de terminación de la transcripción es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión desvelado en el mismo.

g) *Selección y transformación de células hospedadoras*

En el presente documento, las células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores incluyen células de eucariotas superiores descritas en el presente documento, que incluyen células hospedadoras de vertebrados. La propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento habitual. Los ejemplos de células de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada mediante SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para su crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36:59 (1977)); las células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); las células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); las células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); las células de riñón de mono

(CV1, ATCC CCL 70); las células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humanas (HELA, ATCC, CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios nutritivos convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Son ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamíferos útiles

h) Cultivo de las células hospedadoras

Las células hospedadoras utilizadas para producir el anticuerpo de la presente invención pueden cultivarse en diversos medios. Los medios disponibles en el comercio, tales como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo ((DMEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes *et al.*, Anal. Biochem. 102:255 (1980), las patentes de EE.UU. n.º 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762 y 4.560.655; o 5.122.469; WO 90/03430; WO 87/00195; o en la Re. de patente de EE. UU. 30.985, pueden utilizarse como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes en concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro complemento necesario en concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las utilizadas anteriormente con la célula hospedadora seleccionada para la expresión y serán evidentes para el experto en la materia.

i) Purificación del anticuerpo

Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente al medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, los residuos de partículas, ya sean células hospedadoras o fragmentos resultantes de una lisis, se retiran, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, En Bio/Technology 10:163-167 (1992) se describe un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. Resumiendo, la pasta celular se descongela en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los restos celulares pueden retirarse mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión generalmente se concentran primero utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible en el comercio, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis, y se pueden incluir antibióticos para impedir el crecimiento de contaminantes fortuitos.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede utilizarse para purificar anticuerpos que están basados en inmunoglobulinas que contienen 1, 2 o 4 cadenas pesadas (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). Se recomienda la proteína G para todos los isotipos de ratón y para el 3 humano (Guss *et al.*, EMBO J. 5: 1567-1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad suele ser agarosa, pero se dispone de otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tal como el vidrio de poro controlado o poli(estirendivinil)benzeno, permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden obtener con la agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_H3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía en heparina, cromatografía de SEPHAROSE™ en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio, también están disponibles dependiendo del anticuerpo que se vaya a recuperar.

Después de cualquier etapa (o etapas) de purificación preliminar(es), la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes puede someterse a una cromatografía de interacción hidrófoba de bajo pH utilizando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, preferentemente realizada a bajas concentraciones de sal (p. ej., de aproximadamente 0-0,25 M de sal).

C. Preparación de anticuerpos

1) *Anticuerpos policlonales*

5 Por lo general, los anticuerpos policlonales se producen en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente con una proteína que sea inmunogénica en la especie que se va a inmunizar, p. ej., hemocianina de lapa californiana (KLH), seroalbúmina, tiroglobulina bovina e inhibidor de tripsina de soja, utilizando un agente bifuncional o derivatizante, p. ej., éster de maleimidobenzóil sulfosuccinimida (conjugación a través de restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en donde R y R^1 son independientemente grupos alquilo inferior. Como ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse se incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). Un experto en la materia puede seleccionar el protocolo de inmunización sin excesiva experimentación.

15 Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos, o derivados combinando, p. ej., 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (de conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes después, se reforzó a los animales con 1/5 a 1/10 de la cantidad original del péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. Siete a catorce días después, se extrae sangre de los animales y se analiza el suero para determinar el título de anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta la meseta del título. También pueden prepararse conjugados en un cultivo de células recombinantes como proteínas de fusión. Además, para potenciar la respuesta inmunitaria se utilizan, de forma adecuada, agentes de agregación tales como alumbre.

2) *Anticuerpos monoclonales*

25 Los anticuerpos monoclonales se obtienen a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos salvo por posibles mutaciones y/o modificaciones postraduccionales de origen natural (p. ej., isomerizaciones, amidaciones) que pueden estar presentes en escasas cantidades. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos distintos.

30 Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse utilizando el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975), o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (patente de EE.UU. n.º 4816567).

35 En el método del hibridoma, un ratón u otro animal hospedador adecuado, tal como un hámster, se inmuniza como se ha descrito anteriormente en el presente documento para estimular a los linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. A continuación se fusionan los linfocitos con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs.59-103 (Academic Press, 1986)).

45 El agente inmunizante incluirá normalmente la proteína antigénica o una variante de fusión de la misma. En general, si se desean células de origen humano se utilizan linfocitos de sangre periférica ("PBL", *peripheral blood lymphocytes*) o si se desean fuentes de mamíferos no humanos se utilizan esplenocitos o células de ganglios linfáticos. Los linfocitos se fusionan después con una línea celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), págs. 59-103.

50 Las líneas celulares inmortalizadas son habitualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Normalmente, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o de ratón. Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y dejan crecer en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma precursoras no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma precursoras carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT, por sus siglas en inglés), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias impiden el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

60 Las células de mieloma inmortalizadas preferidas son las que se fusionan de manera eficaz, soportan la producción estable a altos niveles de anticuerpo por parte de las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre estas, se prefieren las líneas de mieloma murino, tales como las procedentes de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, Estados Unidos y las células SP-2 (y derivados de las mismas, p. ej., X63-Ag8-653) disponibles en la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, Estados Unidos. Se han descrito también líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

- 5 El medio de cultivo en el que se hacen crecer las células de hibridoma se analiza para determinar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA).
- 10 El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se puede analizar para determinar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno deseado. Preferentemente, la afinidad de unión y la especificidad del anticuerpo monoclonal se pueden determinar mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA). Dichas técnicas y ensayos se conocen en la técnica. Por ejemplo, la afinidad de unión puede determinarse mediante el análisis de Scatchard de Munson *et al.*, Anal. Biochem., 107:220 (1980).
- 15 Después de identificarse las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse mediante métodos de dilución limitante y cultivarse por métodos convencionales (Goding, citado anteriormente). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores en un mamífero.
- 20 Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, líquido ascítico o suero por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.
- 25 Los anticuerpos monoclonales también pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la patente de EE.UU. n.º 4.816.567 y como se ha descrito anteriormente. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente utilizando procedimientos convencionales (p. ej., utilizando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como fuente preferente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede introducirse en vectores de expresión, que después se transfectan en células hospedadoras, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma, que no producen de otra manera la proteína de inmunoglobulina, para sintetizar anticuerpos monoclonales en dichas células hospedadoras recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra *et al.*, Curr. Opin. Immunol., 5: 256-262 (1993) y Plückthun, Immunol. Revs. 130: 151-188 (1992).
- 35 Los anticuerpos pueden aislarse de fagotecas generadas utilizando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, Nature, 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, Nature, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando fagotecas. Otras publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) mediante barajado de cadenas (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir fagotecas de gran tamaño (Waterhouse *et al.*, Nucl. Acids Res., 21:2265-2266 (1993)). Por tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas del hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.
- 40 El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de cadena pesada y ligera humana en el lugar de las secuencias murinas homólogas [patente de EE.UU. n.º 4.816.567; Morrison, *et al.*, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)], o mediante la unión covalente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no inmunoglobulínico. Habitualmente, dichos polipéptidos no inmunoglobulínicos se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación con el antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación con el antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación con el antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.
- 45 Los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento pueden ser monovalentes, y su preparación se conoce bien en la técnica. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de la cadena ligera de inmunoglobulina y de una cadena pesada modificada. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto en la región Fc para impedir el entrecruzamiento de la cadena pesada. Como alternativa, los restos pertinentes de cisteína pueden sustituirse por otro resto de aminoácido o delecionarse para impedir el entrecruzamiento. También son adecuados métodos *in vivo* para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente fragmentos Fab, puede realizarse utilizando técnicas habituales conocidas en la materia.
- 50 También se pueden preparar anticuerpos quiméricos o híbridos *in vitro* utilizando métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo los que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de
- 55
- 60
- 65

reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirmidato.

3) Anticuerpos humanizados.

5 Los anticuerpos de la invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o humanos. Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígeno) que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región determinante de la complementariedad (CDR) (HVR como se utiliza en el presente documento) del receptor, se sustituyen por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como de ratón, rata o conejo que tienen la funcionalidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunas ocasiones, los restos estructurales de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes restos no humanos. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de la CDR o estructurales importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos un dominio variable, y normalmente dos, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también óptimamente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Jones *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Science 332: 323-329 (1988) y Presta, Curr. Opin. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992).

En la técnica se conocen métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácido introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácido no humanos se citan a menudo como restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". La humanización puede llevarse a cabo esencialmente siguiendo los métodos de Winter y colaboradores, Jones *et al.*, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, Science 239: 1534-1536 (1988), o mediante la sustitución de CDR o secuencias de CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU.n.º 4.816.567) en la que se ha sustituido sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la CDR y posiblemente algunos restos de la FR están sustituidos por restos procedentes de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para su uso en la fabricación de los anticuerpos humanizados, es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método denominado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora frente a la toda la biblioteca de secuencias conocidas de dominio variable humano. La secuencia humana que es la más cercana a la del roedor se acepta a continuación como la región estructural (FR) humana para el anticuerpo humanizado. Sims *et al.*, J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196:901 (1987). Otro método utiliza una estructura particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligera o pesada. Se puede utilizar la misma estructura para diferentes anticuerpos humanizados. Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 151:2623 (1993).

Además, es importante que los anticuerpos se humanicen conservando una afinidad alta por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias precursoras y diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias precursoras y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son conocidos por los expertos en la materia. Se dispone de programas informáticos que ilustran y exponen posibles estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias seleccionadas de la inmunoglobulina candidata. La inspección de estas presentaciones permite analizar el papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, pueden seleccionarse restos de FR y combinarse a partir de las secuencias receptoras e importadas de manera que se consigue la característica deseada del anticuerpo, tal como una mayor afinidad por el antígeno (o antígenos) diana. En general, los restos de la CDR están directamente y más sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión al antígeno.

Se contemplan diversas formas del anticuerpo humanizado. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, como un Fab, que está opcionalmente conjugado con uno o más agentes citotóxicos para generar un inmunoconjugado. Como alternativa, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

4) Anticuerpos humanos

65 Como una alternativa a la humanización, pueden generarse anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible

producir animales transgénicos (p. ej., ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigota del gen de la región de unión de la cadena pesada (J_H) del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de la línea germinal, da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véase, p. ej., Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, Year in Immuno., 7:33 (1993); la patente de EE.UU. n.º 5.591.669 y el documento WO 97/17852.

Como alternativa, la tecnología de presentación en fagos puede utilizarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. McCafferty *et al.*, Nature 348:552-553 (1990); Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol. 227: 381 (1991). De acuerdo con esta técnica, los genes de dominio V de los anticuerpos se clonan en marco dentro de un gen de proteína de envoltura mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula de fago. Dado que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La presentación en fagos puede realizarse en una diversidad de formatos, revisado en, p. ej., Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Curr. Opin Struct. Biol. 3:564-571 (1993). Para la presentación en fagos, pueden utilizarse varias fuentes de segmentos de genes V. Clackson *et al.*, Nature 352: 624-628 (1991) aislaron una serie diversa de anticuerpos anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados del bazo de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos para una serie diversa de antígenos (incluyendo autoantígenos) siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Mark *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991) o Griffith *et al.*, EMBO J. 12:725-734 (1993). Véanse también, las patentes de EE.UU. n.º 5.565.332 y 5.573.905.

Las técnicas de Cole *et al.*, y de Boerner *et al.*, también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pág. 77 (1985) y Boerner *et al.*, J. Immunol. 147(1): 86-95 (1991). De manera similar, pueden prepararse anticuerpos humanos introduciendo locus de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, p. ej., ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado parcial o completamente. Después de la exposición, se observa una producción de anticuerpos humanos, que se asemeja mucho a la observada en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo el reordenamiento de genes, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 5.545.807; 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016 y en las siguientes publicaciones científicas: Marks *et al.*, Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-13 (1994), Fishwild *et al.*, Nature Biotechnology 14: 845-51 (1996), Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996) y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995).

Por último, también pueden generarse *in vitro* anticuerpos humanos por células B activadas (véanse las patentes de EE.UU. n.º 5.567.610 y 5.229.275).

5) Fragmentos de anticuerpo

En determinadas circunstancias, resulta ventajoso utilizar fragmentos de anticuerpos, en lugar de anticuerpos completos. Los fragmentos de menor tamaño permiten una rápida eliminación y pueden mejorar el acceso a los tumores sólidos.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, p. ej., Morimoto *et al.*, J Biochem Biophys. Method. 24:107-117 (1992); y Brennan *et al.*, Science 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente mediante células hospedadoras recombinantes. Todos los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y ScFv pueden expresarse y secretarse a partir de *E. coli*, permitiendo por lo tanto facilitar la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las fagotecas de anticuerpos comentadas anteriormente. Como alternativa, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, Bio/Technology 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ pueden aislarse directamente de un cultivo de células hospedadoras recombinantes. En la patente de EE.UU. n.º 5.869.046, se describen fragmentos Fab y F(ab')₂ con aumento de semivida *in vivo*. El anticuerpo de elección puede ser un fragmento Fv monocatenario (scFv), véase el documento WO 93/16185; y las patentes de EE.UU. n.º 5.571.894 y 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", p. ej., como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.641.870. Dichos fragmentos de anticuerpo lineales pueden ser mono-específicos o biespecíficos.

6) Terapia con profármacos mediada con enzimas dependientes de anticuerpos (ADEPT)

Los anticuerpos de la presente invención también pueden utilizarse en ADEPT (*Antibody Dependent Enzyme-Mediated Prodrug Therapy*) conjugando el anticuerpo con una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (p. ej., un agente quimioterápico peptidílico, véase el documento WO 81/01145, en un fármaco antineoplásico activo. Véase, por ejemplo, el documento WO 88/07378 y la patente de EE.UU. n.º 4.975.278.

El componente enzimático del inmunoc conjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal forma que lo convierte en su forma citotóxica más activa.

Las enzimas que son útiles en el método de esta invención incluyen, pero sin limitación, glucosidasa, glucosa oxidasa, lisozima humana, glucuronidasa humana, fosfatasa alcalina, útil para convertir los profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa, útil para convertir los profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa, útil para convertir la 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco antineoplásico 5-fluorouracilo; proteasas, tales como la proteasa del género *Serratia*, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas (p. ej., carboxipeptidasa G2 y carboxipeptidasa A) y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir los profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir los profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácidos; enzimas que escinden hidratos de carbono, tales como β -galactosidasa y neuraminidasa, útiles para convertir los profármacos glucosilados en fármacos libres; β -lactamasa, útil para convertir fármacos derivatizados con β -lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasas, tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, que son útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Como alternativa, anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas" pueden usarse para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (véase, p. ej., Massey, *Nature* 328: 457-458 (1987)). Se pueden preparar conjugados de abzima con anticuerpos como se describe en el presente documento para la administración de la abzima a una población de células tumorales.

Las enzimas anteriores se pueden unir de manera covalente al polipéptido o a los anticuerpos descritos en el presente documento mediante técnicas bien conocidas en la materia, tales como el uso de los agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales indicados anteriormente. Como alternativa, utilizando técnicas de ADN recombinante conocidas en la materia pueden construirse proteínas de fusión que comprendan al menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención, unidas a al menos una parte funcionalmente activa de una enzima de la invención, (véase, p. ej., Neuberger *et al.*, *Nature* 312: 604-608 (1984)).

7) Anticuerpos biespecíficos y poliespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos (BsAbs) son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes, incluidos aquellos que contienen la misma u otra proteína. Como alternativa, un brazo puede unirse al antígeno diana y otro brazo puede combinarse con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito, tal como una molécula receptora de células T (p. ej., CD3) o receptores Fc para IgG (Fc γ R), tales como Fc γ R1 (CD64), Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16), para enfocar y localizar los mecanismos de defensa celular en la célula diana que expresa el antígeno. Dichos anticuerpos pueden proceder de anticuerpos de longitud completa o de fragmentos de anticuerpo (p. ej., anticuerpos biespecíficos de F(ab')₂).

También pueden utilizarse anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan un antígeno tumoral. Dichos anticuerpos poseen un brazo que se une al antígeno deseado y otro brazo que se une al agente citotóxico (p. ej., saporina, anti-interferón- α , alkoloides de vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo). Como ejemplos de anticuerpos biespecíficos conocidos se incluyen anti-ErbB2/anti-Fc γ RIII (WO 96/16673), anti-ErbB2/anti-Fc γ R1 (U.S.P. 5.837.234), anti-ErbB2/anti-CD3 (U.S.P. 5821337).

En la técnica se conocen métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la expresión conjunta de dos pares de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades. Millstein *et al.*, *Nature*, 305:537-539 (1983). Debido a la distribución aleatoria de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que generalmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es demasiado complicada y los rendimientos del producto son bajos. Se desvelan procedimientos similares en el documento WO 93/08829, y en Trauneker *et al.*, *EMBO*, 10:3655-3659 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominio constante de la inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Es preferible que la primera región constante de cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, esté presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, de la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión distintos y se cotransfectan en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones en las que proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas

usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes de dos o de las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da lugar a rendimientos elevados o cuando las proporciones no son especialmente significativas.

5 Los anticuerpos biespecíficos pueden estar compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se ha descubierto que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de las moléculas biespecíficas facilita la separación. Este enfoque se desvela en el documento WO/94/04690. Para más detalles acerca de la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology* 121: 210 (1986).

15 Según otro enfoque descrito en el documento WO 96/27011 o en U.S.P. 5.731.168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede diseñarse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más pequeñas cadenas laterales de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales más grandes (p. ej., tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias del mismo tamaño o similar al de las cadenas laterales grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo las cadenas laterales grandes de aminoácidos por otras más pequeñas (p. ej., alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

25 Se han descrito también en la bibliografía técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, utilizando enlace químico pueden prepararse anticuerpos biespecíficos. Brennan *et al.*, *Science* 229: 81 (1985) describen un procedimiento en donde los anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente de formación de complejos de ditiol, arsenito de sodio, para estabilizar los ditiolos cercanos e impedir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten después en derivados de tionitrobenzoato (TNB). A continuación, uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte en el derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden utilizarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

35 Los fragmentos Fab' pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) describen la producción de moléculas de anticuerpo F(ab')₂ biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado fue capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor ErbB2 y células T humanas normales, así como de desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumores de mama humanos.

40 También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos bivalentes directamente del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido heterodímeros bivalentes utilizando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de la cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. La tecnología del "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos/bivalentes. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) por un enlazador que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha informado de otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos/bivalentes mediante el uso de dímeros de Fv monocatenarios (sFv). Véase Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

55 Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos. Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

60 Los anticuerpos biespecíficos ilustrativos pueden unirse a dos epítomos diferentes de una molécula dada. Como alternativa, puede combinarse un brazo anti-proteína con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito, tal como una molécula receptora de células T (p. ej., CD2, CD3, CD28 o B7), o receptores Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) para concentrar los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa la proteína concreta. También pueden utilizarse anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan una proteína concreta. Dichos anticuerpos poseen un brazo de unión a proteína y un brazo que se une a un agente citotóxico o a un quelante de radionúclidos, tales como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une a la proteína de interés y además se une al factor tisular

(TF, *Tissue Factor*).

8) *Anticuerpos multivalentes*

5 Un anticuerpo multivalente puede internalizarse (y/o catabolizarse) más rápidamente que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son distintos de los de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (p. ej., anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse fácilmente por expresión recombinante del ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno amino-terminal a la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido en el presente documento comprende (o consiste en) de tres a aproximadamente ocho, pero preferentemente cuatro, sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (y preferentemente dos cadenas polipeptídicas), en donde la cadena (o cadenas) polipeptídica comprende dos o más dominios variables. Por ejemplo, la(s) cadena(s) polipeptídica(s) puede(n) comprender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, en donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido y n es 0 o 1. Por ejemplo, la(s) cadena(s) polipeptídica(s) puede(n) comprender: cadena VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-región Fc; o cadena VH-CH1-VH-CH1-región Fc. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede comprender además al menos dos (y preferentemente cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede, por ejemplo, comprender de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados en el presente documento comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, también comprenden un dominio CL.

25

9) *Anticuerpos heteroconjugados*

Los anticuerpos heteroconjugados también se encuentran dentro del ámbito de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos por dos anticuerpos unidos de manera covalente. Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, el otro a biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario contra células no deseadas, U.S.P. 4.676.980, y para el tratamiento de la infección por VIH. Documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 0308936. Se contempla que los anticuerpos puedan prepararse *in vitro* utilizando métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo los que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los descritos, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 4.676.980. Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse utilizando cualquier método de entrecruzamiento conveniente. En la técnica se conocen bien agentes de entrecruzamiento adecuados y se desvelan en la patente de EE.UU. n.º 4,676,980, junto con una serie de técnicas de entrecruzamiento.

40

10) *Diseño de la función efectora*

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora Fc, p. ej., para modificar (p. ej., potenciar o eliminar) la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. La función efectora Fc de los anticuerpos anti-PD-L1 puede reducirse o eliminarse. Esto se puede lograr introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Como alternativa o adicionalmente, pueden introducirse uno o más restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una mayor destrucción celular mediada por complemento y citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC). Véase Caron *et al.*, J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). También pueden prepararse anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada utilizando agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales como se describe en Wolff *et al.*, Cancer Research 53:2560-2565 (1993). Como alternativa, puede diseñarse un anticuerpo que tenga regiones Fc dobles y que, por tanto, pueda mejorar la capacidad de lisis del complemento y de ADCC. Véase Stevenson *et al.*, Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989).

55

Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epitopo de unión al receptor de rescate en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe en la patente de EE.UU n.º 5.739.277, por ejemplo. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "epitopo de unión al receptor de rescate" se refiere a un epitopo de la región Fc de una molécula de IgG (p. ej., IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable de aumentar la semivida en suero de la molécula de IgG *in vivo*.

60

11) *Otras modificaciones de la secuencia de aminoácidos*

Se contemplan la modificación o modificaciones de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se preparan variantes

65

de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos introduciendo los cambios de nucleótidos adecuados en el ácido nucleico del anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se realiza cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que ésta posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos pueden alterar también los procesos posteriores a la traducción del anticuerpo, tales como cambiar el número o la posición de los sitios de glucosilación.

Un método útil para la identificación de determinados restos o regiones del anticuerpo, que son ubicaciones preferidas para la mutagénesis, se denomina "mutagénesis de escaneo de alanina" como describen Cunningham y Wells en Science, 244:1081-1085 (1989). En este caso, se identifica un resto o grupo de restos diana (p. ej., restos con carga tales como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen por un aminoácido neutro o con carga negativa (lo más preferentemente alanina o polialanina) para influir en la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Las localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se perfeccionan después introduciendo variantes adicionales o distintas en, o para, los sitios de sustitución. Por tanto, aunque el sitio para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación en sí misma esté predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se llevó a cabo mutagénesis aleatoria o de escaneo de alanina en el codón o en la región diana y se exploraron las variantes de anticuerpos expresadas con respecto a una actividad deseada.

Las inserciones en las secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxiloterminales con un intervalo de longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto metionilo aminoterminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima (p. ej., para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula de anticuerpo sustituido por un resto diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Las sustituciones conservativas se muestran en la Tabla A a continuación bajo el encabezado de "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse más cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ilustrativas" en la Tabla A, o como se describe más adelante en referencia a clases de aminoácidos, y los productos pueden explorarse.

TABLA A

<i>Sustituciones de aminoácidos</i>		
Resto original	Sustituciones ilustrativas	Sustituciones preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp; lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	Ala	ala

(continuación)

<i>Sustituciones de aminoácidos</i>		
Resto original	Sustituciones ilustrativas	Sustituciones preferidas
Ser (S)	Thr	thr
Thr (T)	Ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Se logran modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto en el mantenimiento de (a) la estructura principal del polipéptido en la zona de la sustitución, por ejemplo, en forma de una conformación de hoja o de hélice, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos basándose en las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;
- (3) ácidos: asp, glu;
- (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservativas implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otro de otra clase.

Cualquier resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo también puede sustituirse, en general con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula e impedir el entrecruzamiento aberrante. En cambio, pueden añadirse uno o más enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Un tipo particularmente preferido de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo precursor (p. ej., un anticuerpo humano o humanizado). Generalmente, la variante (o variantes) resultante(s) seleccionada(s) para el desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo precursor a partir del cual se generan. Una manera conveniente para generar tales variantes de sustitución implica la maduración por afinidad utilizando presentación en fagos. Resumiendo, diversos sitios en la región hipervariable (p. ej., 6-7 sitios) se mutan para generar todas las posibles sustituciones de amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpos así generadas se presentan de forma monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se exploraron después en cuanto a su actividad biológica (p. ej., afinidad de unión) como se desvela en el presente documento. Para identificar los sitios de regiones hipervariables candidatos para la modificación, puede realizarse mutagénesis de escaneo de alanina para identificar restos de regiones hipervariables que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Como alternativa o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y su diana (p. ej., PD-L1, B7.1). Dichos restos de contacto y restos contiguos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a exploración como se describe en el presente documento y para el desarrollo posterior, se pueden seleccionar los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes.

Otro tipo de variante de aminoácidos del anticuerpo altera el patrón de glucosilación original del anticuerpo. Por alteración se entiende la delección de uno o más residuos de hidratos de carbono encontrados en el anticuerpo y/o la adición de uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glucosilación de los anticuerpos normalmente está ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del residuo de hidrato de carbono con la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas de asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del residuo de hidrato de carbono con la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un posible sitio de glucosilación. Glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares de N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa con un hidroxiaminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxisisina.

La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se realiza convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de tal manera que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glucosilación ligados a N). La alteración también puede realizarse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación ligados a O).

Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos de origen natural) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis mediante la PCR y mutagénesis mediante casete de una variante preparada inicialmente o una versión no variante.

12) Otras modificaciones de anticuerpos

Los anticuerpos de la presente divulgación también pueden modificarse para que contengan residuos no proteicos adicionales, conocidos en la técnica y fácilmente disponibles. Preferentemente, los residuos adecuados para la derivatización del anticuerpo son polímeros hidrosolubles. Como ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles se incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1, 3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de polipropilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede estar o no ramificado. La cantidad de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y si se une más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros utilizados para la derivatización se puede determinar basándose en aspectos que incluyen, aunque sin limitación, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que han de mejorarse, si el derivado de anticuerpo se utilizará en una terapia en condiciones definidas, etc. Dichas técnicas y otras formulaciones adecuadas se desvelan en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª ed., Alfonso Gennaro, Ed., Philadelphia College of Pharmacy and Science (2000).

D. Formulaciones Farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas se preparan para su conservación mezclando el principio activo, que tenga el grado de pureza deseado, con transportadores, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª ed., Lippincott Williams & Wilkins, Pub., Gennaro Ed., Filadelfia, PA 2000). Los transportadores, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas e incluyen tampones, antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico, metionina, vitamina E, metabisulfito de sodio; conservantes, isotonicificantes, estabilizantes, complejos metálicos (p. ej., complejos de Zn-proteína); agentes quelantes tales como EDTA y/o tensoactivos no iónicos.

Cuando el agente terapéutico es un fragmento de anticuerpo, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, basándose en las secuencias de la región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar fragmentos de anticuerpos o incluso moléculas peptídicas que conserven la capacidad de unirse a la secuencia de la proteína diana. Tales péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse por tecnología de ADN recombinante (véase, p. ej., Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7889-7893 [1993]).

Los tampones se utilizan para controlar el pH en un intervalo que optimice la eficacia terapéutica, especialmente si la estabilidad depende del pH. Preferentemente, los tampones están presentes a concentraciones en el intervalo de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 250 mM. Los agentes tampón adecuados para su uso con la presente invención incluyen ácidos orgánicos e inorgánicos y sus sales. Por ejemplo, citrato, fosfato, succinato, tartrato, fumarato, gluconato, oxalato, lactato, acetato. Adicionalmente, los tampones pueden estar compuestos de histidina y sales de trimetilamina tales como Tris.

Para retrasar el crecimiento microbiano se añaden conservantes y, por lo general, están presentes en un intervalo del 0,2 % al 1,0 % (p/v). Los conservantes adecuados para su uso con la presente invención incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; haluros de benzalconio (p. ej., cloruro, bromuro, yoduro), cloruro de bencetonio; timerosal, fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil parabenes, tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol, 3-pentanol y *m*-cresol.

Los agentes de tonicidad, a veces conocidos como "estabilizantes", están presentes para ajustar o mantener la tonicidad del líquido en una composición. Cuando se utilizan con biomoléculas grandes, cargadas, tales como proteínas y anticuerpos, frecuentemente se denominan "estabilizantes" porque pueden interactuar con los grupos cargados de las cadenas laterales de los aminoácidos, disminuyendo así el potencial de interacciones inter e intramoleculares. Los agentes de tonicidad pueden estar presentes en cualquier cantidad entre 0,1 % y 25 % en peso,

preferentemente del 1 al 5 %, teniendo en cuenta las cantidades relativas de los demás ingredientes. Los agentes de tonicidad preferidos incluyen alcoholes de azúcar polihídricos, preferentemente, alcoholes de azúcares trihídricos o superiores, tales como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol.

5 Los excipientes adicionales incluyen agentes que pueden servir como uno o más de los siguientes: (1) agentes de carga, (2) potenciadores de la solubilidad, (3) estabilizantes y (4) agentes que impiden la desnaturalización o la adherencia a la pared del recipiente. Dichos excipientes incluyen: alcoholes de azúcar polihídricos (enumerados anteriormente); aminoácidos tales como alanina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, lisina, ornitina, leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, *etc.*; azúcares orgánicos o alcoholes de azúcar tales como sacarosa, lactosa, lactitol, trehalosa, estaquiosa, manosa, sorbosa, xilosa, ribosa, ribitol, mioinositosa, mioinositol, galactosa, galactitol, glicerol, ciclitoles (por ejemplo, inositol), polietilenglicol; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, α -monotioglicerol y tiosulfato de sodio; proteínas de bajo peso molecular tales como seroalbúmina humana, seroalbúmina bovina, gelatina u otras inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; monosacáridos (por ejemplo, xilosa, manosa, fructosa, glucosa; disacáridos (p. ej., lactosa, maltosa, sacarosa); trisacáridos tales como rafinosa; y polisacáridos tales como dextrina o dextrano.

10 Puede haber tensioactivos o detergentes no iónicos (también conocidos como "agentes humectantes") para ayudar a solubilizar el agente terapéutico, así como para proteger la proteína terapéutica contra la agregación inducida por agitación, lo que también permite que la formulación se exponga a tensiones superficiales de cizallamiento sin provocar la desnaturalización de la proteína o del anticuerpo terapéutico activo. Los tensioactivos no iónicos están presentes en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, preferentemente de aproximadamente 0,07 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml.

20 Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen polisorbatos (20, 40, 60, 65, 80, *etc.*), polioxámeros (184, 188, *etc.*), PLURONIC® polioles, TRITÓN®, monoéteres de polioxietilensorbitán (TWEEN®-20, TWEEN®-80, *etc.*), laurmacrogol 400, estearato de polioxilo 40, aceite de ricino 10, 50 y 60 polioxietileno hidrogenado, monoestearato de glicerol, éster de ácido graso de sacarosa, metil celulosa y carboximetil celulosa. Los detergentes aniónicos que se pueden utilizar incluyen lauril sulfato de sodio, sulfosuccinato sódico de dioctilo y sulfonato sódico de dioctilo. Los detergentes catiónicos incluyen cloruro de benzalconio o cloruro de benetonio.

30 Para que las formulaciones se utilicen para administración *in vivo*, deben ser estériles. La formulación puede esterilizarse mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Las composiciones terapéuticas del presente documento generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o un vial de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

35 La vía de administración es conforme a los métodos conocidos y aceptados, tales como embolada individual o múltiple o infusión durante un largo periodo de tiempo de una forma adecuada, p. ej., mediante inyección o infusión mediante vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, intralesional o intraarticular, administración tópica, inhalación o por medios de liberación sostenida o prolongada.

40 La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular a tratar, preferentemente los que tienen actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Como alternativa, o además, la composición puede comprender un agente citotóxico, una citocina o un agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes de manera adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto.

45 Los principios activos pueden inmovilizarse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 18ª edición, citado anteriormente.

50 La estabilidad de las proteínas y de los anticuerpos descritos en el presente documento puede mejorarse mediante el uso de "sales metálicas polivalentes hidrosolubles" no tóxicas. Como ejemplos se incluyen Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Sn^{2+} , Sn^{4+} , Al^{2+} y Al^{3+} . Como ejemplos de aniones que pueden formar sales hidrosolubles con los cationes metálicos polivalentes anteriores se incluyen los formados a partir de ácidos inorgánicos y/o ácidos orgánicos. Dichas sales hidrosolubles tienen una solubilidad en agua (a 20 °C) de al menos aproximadamente 20 mg/ml, como alternativa de al menos aproximadamente 100 mg/ml, como alternativa de al menos aproximadamente 200 mg/ml.

55 Los ácidos inorgánicos adecuados que pueden usarse para formar las "sales de metales polivalentes hidrosolubles" incluyen ácido clorhídrico, acético, sulfúrico, nítrico, tiocianico y fosfórico. Los ácidos orgánicos adecuados que pueden usarse incluyen ácido carboxílico alifático y ácidos aromáticos. Dentro de esta definición, los ácidos alifáticos pueden definirse como ácidos carboxílicos C_{2-9} saturados o insaturados (p. ej., ácidos alifáticos mono-, di- y tri-carboxílicos). Por ejemplo, dentro de esta definición, como ejemplos de ácidos monocarboxílicos se incluyen los ácidos monocarboxílicos C_{2-9} saturados, acético, propiónico, butírico, valérico, caproico, enántico, caprílico pelargónico y caprílico, y los ácidos monocarboxílicos C_{2-9} insaturados ácido acrílico, propiónico, metacrílico, crotónico e

isocrotónico. Como ejemplos de ácidos dicarboxílicos se incluyen los ácidos dicarboxílicos C₂₋₉ saturados, malónico, succínico, glutárico, adípico y pimélico, mientras que los ácidos dicarboxílicos C₂₋₉ insaturados incluyen ácidos ácido maleico, fumárico, citracónico y mesacónico. Como ejemplos de ácidos tricarboxílicos se incluyen los ácidos tricarboxílicos C₂₋₉ saturados tricarbálico y 1,2,3-butanotricarboxílico. Adicionalmente, los ácidos carboxílicos de esta definición también pueden contener uno o dos grupos hidroxilo para formar ácidos hidroxicarboxílicos. Como ejemplos de ácidos hidroxicarboxílicos se incluyen ácido glicólico, láctico, glicérico, tartrónico, málico, tartárico y cítrico. Los ácidos aromáticos dentro de esta definición incluyen ácido benzoico y salicílico.

Las sales metálicas polivalentes hidrosolubles comúnmente empleadas que pueden usarse para ayudar a estabilizar los polipéptidos encapsulados de esta invención incluyen, por ejemplo: (1) las sales metálicas de ácidos inorgánicos de haluros (p. ej., cloruro de cinc, cloruro de calcio), sulfatos, nitratos, fosfatos y tiocianatos; (2) las sales metálicas de ácidos carboxílicos alifáticos (p. ej., acetato de calcio, acetato de cinc, propionato de calcio, glicolato de cinc, lactato de calcio, lactato de cinc y tartrato de cinc); y (3) las sales metálicas de ácidos carboxílicos aromáticos de benzoatos (p. ej., benzoato de cinc) y salicilatos.

E. Métodos de tratamiento:

Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosis adecuada de un agente activo, dependerá del tipo de enfermedad que se vaya a tratar, como se ha definido anteriormente, de la gravedad y de la evolución de la enfermedad, de si el agente se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, del historial clínico del paciente y de la respuesta al agente y del criterio del médico a cargo del tratamiento. El agente se administra adecuadamente al paciente de una sola una vez o a lo largo de una serie de tratamientos.

La invención se refiere a la coestimulación resultante de atenuar la señalización a través de PD-1, específicamente mediante la aplicación de anticuerpos PD-L1 que impiden la unión a PD-1 y/o B7.1, así como al tratamiento terapéutico de trastornos disfuncionales de células T.

1. Infecciones

PD-1 y sus ligandos ("PD-1:PD-L") desempeñan un papel importante en la regulación de las defensas inmunitarias contra patógenos que causan infecciones de corta duración y crónicas. La señalización de PD-1:PD-L juega un papel clave en la regulación del equilibrio entre una defensa inmunitaria antimicrobiana eficaz y el daño tisular mediado por el sistema inmunitario. Por ejemplo, mientras que los ratones con desactivación de PD-1 eliminan la infección por adenovirus más rápidamente que sus homólogos de tipo silvestre, desarrollan una lesión hepatocelular más grave. Iwai *et al.*, J. Exp. Med. 198: 39-50 (2003). En un modelo de ratón de queratitis estromal por herpes, el bloqueo del anticuerpo anti-PD-L1 agravó la queratitis, aumentando la expansión de células T CD4 ectoras específicas del VHS-1 y la producción y supervivencia de IFN- γ . Jun *et al.*, FEBS Lett. 579: 6259-64 (2005).

Los microorganismos que causan infecciones crónicas han aprovechado la vía de señalización PD-1:PD-L para evadir las respuestas inmunitarias del hospedador que provocan infecciones crónicas. Los virus que causan infección crónica pueden hacer que las células T específicas del virus dejen de funcionar y, por lo tanto, silenciar la respuesta de las células T antivíricas. Barber *et al.*, Nature 439: 682-87 (2006); Wherry *et al.*, J. Virol. 78: 5535-45 (2004). El agotamiento de las células T o la anergia, de las células T CD8⁺ es una razón importante para el control vírico ineficaz durante las infecciones crónicas y es característico de las infecciones crónicas causadas por el LCMV (virus de la coriomeningitis linfocítica) en ratones, así como de la infecciones causadas por el VIH, VHB, VHC y VLTH en seres humanos e infección causada por el VIS en primates. Parece existir una pérdida de función jerárquica y progresiva dentro del fenotipo de las células T CD8⁺ específicas de virus agotadas, perdiéndose primero la citotoxicidad y la producción de IL-2, seguido de la producción de citocinas ectoras.

PD-1 se regula positivamente en el momento de la activación y su expresión se mantiene a un nivel alto en las células T CD8⁺ agotadas en ratones con infección crónica por LCMV. Barber *et al.*, citado anteriormente. La administración de anticuerpos que bloquearon la unión PD-1: PD-L1 dio como resultado respuestas mejoradas de células T y una reducción sustancial de la carga vírica. En ratones infectados persistentemente con respuesta ineficaz de T_H CD4⁺, el bloqueo de PD-1:PD-L1 restableció las células T CD8⁺ desde un estado disfuncional dando como resultado la proliferación, la secreción de citocinas, la muerte de las células infectadas y la disminución de la carga vírica, lo que sugiere enormemente un enfoque terapéutico para el tratamiento de infecciones víricas crónicas.

Como resultado del papel de PD-1:PD-L en el LCMV, se ha mostrado un gran interés en dirigir esta vía al tratamiento de infecciones crónicas en seres humanos. La expresión de PD-1 es alta en células T específicas del VIH [Petrovas *et al.*, J. Exp. Med. 203: 2281-92 (2006); Day *et al.*, Nature 443: 350-54 (2006); Traumann *et al.*, Nat. Med. 12: 1198-202 (2006)], específicas del VHB [Boettler *et al.*, J. Virol. 80: 3532-40 (2006); Boni *et al.*, J. Virol. 81: 4215-25 (2007)], y específicas del VHC [Urbani *et al.*, J. Virol. 80: 11398-403 (2006)]. PD-L1 también está regulado positivamente en monocitos CD14⁺ de sangre periférica y DC mieloides en pacientes con infección crónica por VHB [Chen *et al.*, J. Immunol. 178: 6634-41 (2007); Geng *et al.*, J. Viral Hepat. 13: 725-33 (2006)], y en células CD14⁺ y células T en pacientes con VIH [Trabattoni *et al.*, Blood 101: 2514-20 (2003)]. El bloqueo de interacciones PD-1:PD-L1 *in vitro* invierte el agotamiento de células T CD8⁺ y CD4⁺ específicas del VIH, específicas del VHB, específicas del VHC y

específicas del VIS y restablece la proliferación y la producción de citocinas. Petrovas *et al.*, J. Exp. Med. 203: 2281-92 (2006); Day *et al.*, citado anteriormente; Trautmann *et al.*, citado anteriormente; Boni *et al.*, citado anteriormente; Urbani *et al.*, citado anteriormente; Velu *et al.*, J. Virol. 81: 5819-28 (2007).

5 El grado de expresión de PD-1 también puede ser un marcador de diagnóstico útil en células T CD8⁺ específicas de virus para indicar el grado de agotamiento de las células T y la gravedad de la enfermedad. El nivel de expresión de PD-1 en células T CD8⁺ específicas del VIH se correlaciona con la carga vírica, con la reducción de los recuentos de CD4⁺ y con la disminución de la capacidad de proliferación de las células T CD8⁺ en respuesta al antígeno del VIH *in vitro*. De acuerdo con las observaciones *in vivo*, existe una correlación directa entre la expresión de PD-1 en las células
10 T CD4⁺ específicas del VIH y la carga vírica. D'Souza *et al.*, J. Immunol. 179: 1979-87 (2007). Las personas no progresoras a largo plazo, tienen células T CD8⁺ de memoria específicas del VIH funcionales con una expresión de PD-1 notablemente inferior, al contrario de lo que ocurre con las progresoras habituales que expresan PD-1 regulado significativamente de manera positiva, que se correlacionan con un número reducido de células T CD4⁺, una
15 disminución del número de células T CD4⁺, una disminución de la función de células T CD8⁺ de memoria efectoras específicas del VIH y una carga vírica en plasma elevada. Zhang *et al.*, Blood 109: 4671-78 (2007).

La vía PD-1:PD-L también se ha implicado en la cronicidad de las infecciones bacterianas. *Helicobacter pylori* causa gastritis crónica y úlceras gastroduodenales y es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico. Durante una
20 infección por *H. pylori*, las respuestas de las células T son insuficientes para eliminar la infección, dando lugar a una infección persistente. Después de la exposición a *H. pylori in vitro* o *in vivo*, PD-L1 está regulado positivamente en las células epiteliales gástricas. Las células epiteliales gástricas expresan moléculas de MHC de clase II y se cree que desempeñan una importante función de APC durante infección causada por *H. pylori*. Los anticuerpos anti-PD-L1 que bloquean la interacción entre PD-1 y PD-L1 mejoran la proliferación de células T y la producción de IL-2 en cultivos de células epiteliales gástricas expuestas a *H. pylori* y a células T CD4. El bloqueo de PD-L1 con anticuerpos o ARNip
25 impidió la generación de células T reguladoras, lo que sugiere que PD-L1 puede promover la supresión de células T y las infecciones persistentes al controlar la dinámica entre las células T reguladoras y efectoras durante infección causada por *H. pylori*. Beswick *et al.*, Infect. Immun. 75: 4334-41 (2007).

Los gusanos parásitos también han aprovechado la vía PD-1:PD-L1 para inducir macrófagos que suprimen la
30 respuesta inmunitaria. Durante la infección causada por *Taenia crassiceps* (es decir, tenia) en ratones, PD-1 y PD-L2 están regulados positivamente en macrófagos activados y las células T CD4⁺ expresan PD-1. El bloqueo de PD-1, PD-L1 o PD-L2 disminuyó significativamente la supresión de la proliferación de células T *in vitro* por macrófagos de ratones infectados con tenia. Terrazas *et al.*, Int. J. Parasitol. 35: 1349-58 (2005). Durante la infección causada por *Shistosoma mansoni* infección en ratones, los macrófagos expresan niveles elevados de PD-L1 y niveles más moderados de PD-L2. El anti-PD-L1 eliminó la capacidad de estos macrófagos para suprimir la proliferación de células
35 T *in vitro*, mientras que el anti-PD-L2 no tuvo efecto. La expresión de PD-L1 en macrófagos de ratones infectados disminuye después de 12 semanas de infección, correlacionándose con una interrupción en la anergia de las células T. Smith *et al.*, J. Immunol. 173: 1240-48 (2004).

40 2. Inmunidad tumoral

Las pruebas empíricas de la inmunidad tumoral incluyen (i) la observación de remisión espontánea, (ii) la presencia de una respuesta inmunitaria detectable pero ineficaz del hospedador contra tumores, (iii) el aumento de la prevalencia de neoplasias malignas primarias y secundarias en pacientes inmunodeficientes, (iv) la detección de niveles elevados
45 de anticuerpos y linfocitos T en pacientes con tumor, y (v) la observación de que los animales de prueba pueden inmunizarse contra varios tipos de tumores.

Los estudios han demostrado que la mayoría de los tumores humanos expresan antígenos asociados a tumores (AAT) que pueden ser reconocidos por las células T y, por lo tanto, son potencialmente capaces de inducir una respuesta
50 inmunitaria. Boon *et al.*, Immunol. Today 16:334-336 (1995). Se han iniciado ensayos clínicos en fase temprana vacunando a pacientes con cáncer con AAT o células presentadoras de antígenos profesionales pulsadas con AAT. Dudley *et al.*, Science 298: 850-854 (2002); Gajewski *et al.*, Clin. Cancer Res. 7: 895s-901s (2001); Marincola *et al.*, Adv. Immunol. 74: 181-273 (2000); Peterson *et al.*, J. Clin. Oncol. 21: 2342-2348 (2003). En muchos de estos ensayos se ha logrado la inducción de células T CD8⁺ específicas de antígenos tumorales. Mackensen *et al.*, Eur. Cytokine
55 Netw 10: 329-336 (1999); Peterson *et al.*, citado anteriormente. También se ha investigado la transferencia adoptiva de células T específicas de antígenos tumorales en pacientes y se ha revelado el asentamiento de los linfocitos T citotóxicos (CTL) expandidos en los sitios tumorales. Meidenbauer *et al.*, J. Immunol. 170: 2161-2169 (2003). Sin embargo, a pesar de la infiltración tumoral de células inmunoefectoras, el crecimiento del tumor rara vez fue controlado.

60 Está bien establecido que el microambiente tumoral puede proteger a las células tumorales de la destrucción inmunitaria. Ganss *et al.*, Cancer Res. 58: 4673-4681 (1998); Singh *et al.*, J. Exp. Med. 175: 139-146 (1992). Se ha descubierto que los factores solubles, así como las moléculas unidas a la membrana, incluido el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), interleucina (IL)-10, prostaglandina E₂, FASL, ligandos de CTLA-4, ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL) y ligando 1 del receptor de muerte programada (PD-
65 L1, también conocido como B7-H1), se expresan en tumores y se cree que actúan como mediadores en la evasión inmunitaria. Por tanto, el bloqueo de estas señales inmunorreguladoras negativas en las células tumorales es un

enfoque prometedor para mejorar la inmunidad de las células T CD8+ específicas de tumor *in vivo*.

La expresión de PD-L1 en muchos tumores es un componente de esta supresión y puede actuar en conjunto con otras señales inmunosupresoras. PD-L1 regula negativamente la señalización del receptor de células T. Se ha observado la expresión de PD-L1 *in situ* en una amplia diversidad de tumores sólidos, entre los que se incluyen los cánceres de pulmón, colon, ovario, melanoma, vejiga, hígado, glándulas salivares, estómago, gliomas, tiroides, timo, epitelial, cabeza y cuello. Brown *et al.*, *J. Immunol.* 170: 1257-66 (2003); Dong *et al.*, *Nat. Med.* 8: 793-800 (2002); Hamanishi *et al.*, *PNAS* 104: 3360-65 (2007); Strome *et al.*, *Cancer Res.* 63: 6501-5 (2003); Inman *et al.*, *Cancer* 109: 1499-505 (2007); Konishi *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 10: 5094-100 (2004); Nakanishi *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 56: 1173-82 (2007); Nomi *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 13: 2151-57 (2004); Thompson *et al.*, *PNAS* 101: 17174-79 (2004); Wu *et al.*, *Acta Histochem.* 108: 19-24 (2006).

La tinción inmunológica también revela la expresión de PD-1: PD-L en varios cánceres.

De manera interesante, el cáncer también se ha caracterizado como una enfermedad inflamatoria crónica. Coussens *et al.*, *Nature* 420: 860-867 (2002). Mientras que hasta el 15 % de los cánceres en todo el mundo tienen un origen infeccioso directo [Kuper *et al.*, *J. Intern. Med.* 248: 171-183 (2000)], muchos tumores humanos están relacionados con irritación e inflamación crónicas. Zou *et al.*, *Ntu. Rev. Cancer* 5: 263-274 (2005).

Los estudios relacionados con la expresión de PD-L1 en tumores y el resultado de la enfermedad muestran que la expresión de PD-L1 se correlaciona sumamente con un pronóstico desfavorable en el cáncer de riñón, ovario, vejiga, mama, gástrico y pancreático, pero quizás no en el cáncer de pulmón microcítico. Hamanishi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 3360-65 (2007), Inman *et al.*, *Cancer* 109: 1499-505 (2007), Konishi *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 10:5094-100 (2004); Nakanishi *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 56: 1173-82 (2007); Nomi *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 13: 2151-57 (2007); Thompson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 17174-79 (2004); Wu *et al.*, *Acta Histochem.* 108: 19-24 (2006). Además, estos estudios sugieren que niveles más altos de expresión de PD-L1 en los tumores pueden facilitar el avance del estadio del tumor y la invasión a estructuras tisulares más profundas.

La vía PD-1:PD-L también puede desempeñar un papel en las neoplasias hemáticas. PD-1 o PD-L1 rara vez se expresan en neoplasias malignas de células B, pero PD-L2 se sobreexpresa en neoplasias malignas de células del manto. Brown *et al.*, citado anteriormente; Rosenwald *et al.*, *J. Exp. Med.* 198: 851-62 (2003). PD-L1 se expresa en células de mieloma múltiple, pero no en células plasmáticas normales. Se mejora la expansión de las células T en respuesta a las células de mieloma *in vitro* por bloqueo de PD-L1. Liu *et al.*, *Blood* 110: 296-304 (2007). PD-L1 se expresa en algunos linfomas primarios de células T, particularmente linfomas T anaplásicos de células grandes, y PD-L1 se expresa en la red de células dendríticas foliculares asociada. Dorfinan *et al.*, *Am. J. Surg. Pathol.* 30: 802-10 (2006). El análisis de micromatrices sugiere además que las células T asociadas a tumores están respondiendo a las señales de PD-1 *in situ* en el linfoma de Hodgkin. Chemnitz *et al.*, *Blood* 110: 3226-33 (2007). PD-1 y PD-L1 se expresan en células T CD4⁺ en leucemia y linfoma de células T adultas mediadas por el VLTH-1. Shimauchi *et al.*, *Int. J. Cancer* 121: 2585-90 (2007). Estas células tumorales no responden a las señales de TCR y el bloqueo de PD-1 aumentó su expresión de TNF- α , pero no de IFN- γ . Los estudios en modelos animales demuestran que la expresión de PD-L1 en tumores inhibe la activación de las células T y la lisis de las células tumorales y, en algunos casos, conduce a un aumento de la muerte de las células T específicas del tumor. Dong *et al.*, *Nat. Med.* 8: 793-800 (2006); Hirano *et al.*, *Cancer Res.* 65: 1089-96 (2005).

Por tanto, la supresión de la señalización a través de PD-L1 con los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención, para mejorar la función de las células T, parece prometedor para atenuar la inmunidad tumoral y, como resultado, puede ser un tratamiento eficaz para el cáncer.

F. Combiterapias

El método descrito en el presente documento se puede combinar con métodos conocidos de tratamiento de infecciones crónicas o cáncer, ya sea como etapas de tratamiento combinadas o adicionales o como componentes adicionales de una formulación terapéutica.

1. Cáncer:

La mejora de la función inmunitaria del hospedador para combatir los tumores es un tema de creciente interés. Los métodos convencionales incluyen (i) mejora de APC, tal como (a) inyección en el tumor de ADN que codifica aloantígenos de MHC exógenos, o (b) transfección de células tumorales biopsiadas con genes que aumentan la probabilidad de reconocimiento de antígenos inmunitarios (p. ej., citocinas inmunoestimuladoras, GM-CSF, moléculas coestimuladoras B7.1, B7.2) del tumor, (iii) inmunoterapia celular adoptiva o tratamiento con células T activadas específicas de tumores. La inmunoterapia celular adoptiva incluye el aislamiento de linfocitos T del hospedador infiltrantes en tumor, expandiendo la población *in vitro*, tal como a través de estimulación por IL-2 o tumor o ambos. Adicionalmente, las células T aisladas que son disfuncionales también pueden ser activadas por la aplicación *in vitro* de los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención. Las células T que están así activadas pueden después volver a administrarse al hospedador.

Las terapias tradicionales para el cáncer incluyen las siguientes: (i) *terapia con radiación* (p.ej, radioterapia, terapia con rayos X, irradiación) o el uso de radiación ionizante para destruir células cancerosas y reducir tumores. La terapia con radiación puede administrarse por vía externa a través de radioterapia de haz externo (EBRT, *external beam radiotherapy*) o por vía interna a través de braquiterapia; (ii) *quimioterapia*, o la aplicación de fármacos citotóxicos que generalmente afectan a las células que se dividen rápidamente; (iii) *terapias dirigidas* o agentes que afectan específicamente a las proteínas desreguladas de las células cancerosas (p. ej., inhibidores de la tirosina cinasa, imatinib, gefitinib; anticuerpos monoclonales, terapia fotodinámica); (iv) *inmunoterapia*, o mejora de la respuesta inmunitaria del hospedador (p. ej., vacuna); (v) *terapia hormonal*, o bloqueo hormonal (p. ej., cuando el tumor es sensible a hormonas), (vi) *inhibidor de la angiogénesis*, o bloqueo de la formación y crecimiento de vasos sanguíneos, y (vii) *cuidados paliativos*, o tratamiento dirigido a mejorar la calidad de la atención para reducir el dolor, náuseas, vómitos, diarrea y hemorragia. Los medicamentos para el dolor, tales como morfina y oxicodona, y los antieméticos, tales como ondansetrón y aprepitant, puede permitir regímenes de tratamiento más agresivos.

En el tratamiento del cáncer, cualquiera de los tratamientos convencionales descritos anteriormente para el tratamiento de la inmunidad contra el cáncer puede realizarse, antes, después o en simultáneo con la administración de los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención. Adicionalmente, los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden administrarse antes, después o en simultáneo con tratamientos convencionales contra el cáncer, tales como la administración de anticuerpos de unión a tumores (p. ej., anticuerpos monoclonales, anticuerpos monoclonales conjugados con toxina) y/o la administración de agentes quimioterápicos.

2. Infección:

En el tratamiento de infecciones (p. ej., de corta duración y/o crónicas), la administración de los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención puede combinarse con tratamientos convencionales además de, o en lugar de, estimular las defensas inmunitarias naturales del hospedador contra la infección. Las defensas inmunitarias naturales del hospedador contra la infección incluyen, pero sin limitación, defensa del hospedador mediada por inflamación, fiebre, anticuerpos, defensas del hospedador mediadas por linfocitos T, incluyendo la secreción de linfocinas y células T citotóxicas (especialmente durante la infección vírica), lisis y opsonización mediadas por el complemento (fagocitosis facilitada) y fagocitosis. La capacidad de los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención para reactivar células T disfuncionales sería particularmente útil para tratar infecciones crónicas, en particular aquellas en las que la inmunidad mediada por células es fundamental para una recuperación completa.

a. bacterias

Para infecciones resultantes de una infección bacteriana, los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención se pueden combinar mediante administración simultánea con, antes o después de las terapias estándar para el tratamiento de infecciones bacterianas. Las infecciones bacterianas se tratan más comúnmente hoy en día con antibióticos antibacterianos, pero también puede ser eficaz el suero que contiene anticuerpos específicos de patógenos procedentes de hospedadores inmunizados.

Las bacterias que son patógenas como resultado de la secreción de toxinas, (bacterias toxógenas), la vacunación con toxina inactiva y/o la administración de agentes terapéuticos que bloquean la toxicidad de las toxinas, suelen ser eficaces (p. ej., suero policlonal, anticuerpos, antibióticos etc.). Estos organismos incluyen *Clostridium spp.*, *Bacillus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Vibrio cholerae*, *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* Las bacterias gramnegativas que también suelen responder a este tipo de terapias tradicionales incluyen enterobacterias (p. ej., *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Yersinia*, *Erwinia*), *Salmonella* y *Pseudomonas aeruginosa*. Bacterias encapsuladas, que son resistentes a la fagocitosis y a la opsonización y, por tanto, a menudo impiden una exposición más significativa para el aclaramiento inmunitario incluyen: *Streptococcus spp.*, *Haemophilus spp.*, *Neisseria spp.*, *Klebsiella spp.* y *Bacterioides fragillis*.

Las bacterias que evaden las defensas del hospedador invadiendo células para evadir los anticuerpos séricos y el complemento plantean un reto particular. La eliminación de estas infecciones depende casi por completo de la inmunidad mediada por linfocitos T y son especialmente propensas a convertirse en infecciones crónicas. Los ejemplos específicos incluyen *Salmonella* (*S. typhi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*), *Legionella spp.*, *Listeria spp.*, *Brucella spp.* and *Mycobacterium*, incluyendo *M. tuberculosis*, *M. avium* y *M. leprae*.

Las espiroquetas, entre las que se incluyen, *Treponema spp.*, *Borrelia spp.* y *Leptospira spp.*, son bacterias que causan infecciones persistentes y latentes. *Treponema palladium*, el patógeno que causa la sífilis es una enfermedad de transmisión sexual que puede tener graves consecuencias patológicas si no se trata. La enfermedad evoluciona a través de distintos estadios. El estadio clínico inicial es una úlcera o chancro en el lugar de la inoculación treponémica. A esto le sigue un período de espiroquetemia y distribución metastásica de microorganismos que continúa, incluyendo ciclos repetidos de infección y resolución en una afección conocida como sífilis secundaria. Tras la resolución de la sífilis secundaria, la enfermedad entra en un período de latencia asintomática que puede concluir en sífilis terciaria, que es una afección grave y a menudo mortal. La sífilis terciaria puede manifestarse en (i) el corazón como aortitis con formación de aneurisma e insuficiencia del valor aórtico secundario, (ii) sistema nervioso central (tabes dorsal,

parecia general), (iii) ojos (queratitis intersticial) u (iv) oídos (sordera nerviosa). Las formas no venéreas se parecen a las manifestaciones clínicas de las formas venéreas, pero se transmiten primariamente por contacto directo y mala higiene. Estas incluyen piana (*T. pallidum* subsp. *pertenue*), pinta (*T. carateum*) y bejel (*T. pallidum* subsp. *endemicum*).

- 5 Los tratamientos para la sífilis incluyen penicilina (por ejemplo, penicilina G.), tetraciclina, doxiciclina, ceftriaxona y azitromicina. Los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención se administrarían de manera más ventajosa para tratar el período de infección latente.

10 La enfermedad de Lyme, causada por *Borrelia burgdorferi* se transmite a los humanos a través de la picadura de la garrapata. La enfermedad se manifiesta inicialmente como una erupción localizada, seguido de síntomas parecidos a los de la gripe, incluyendo malestar general, fiebre, cefalea, rigidez de nuca y artralgias. Las manifestaciones posteriores pueden incluir artritis migratoria y poliarticular, afectación neurológica y cardíaca con parálisis de nervios craneales y radiculopatía, miocarditis y arritmias. Algunos casos de enfermedad de Lyme se vuelven persistentes, produciendo un daño irreversible análogo a la sífilis terciaria.

15 La terapia actual para la enfermedad de Lyme incluye principalmente la administración de antibióticos. Las cepas resistentes a los antibióticos pueden tratarse con hidroxiclороquina o metotrexato. Los pacientes resistentes a los antibióticos con dolor neuropático pueden tratarse con gabapentina. La minociclina puede ser útil en la enfermedad de Lyme tardía o crónica con manifestaciones neurológicas o inflamatorias de otro tipo. Los anticuerpos anti-PD-L1 serían más ventajosamente administrados para tratar el período de infección latente.

20 Otras formas de borreliosis, tales como las resultantes de *B. recurrentis*, *B. hermsii*, *B. turicatae*, *B. parkeri*, *B. hispanica*, *B. duttonii* y *B. persica*, así como leptospirosis (p. ej., *L. interrogans*), normalmente se resuelven espontáneamente a menos que los títulos sanguíneos alcancen concentraciones que causen obstrucción intrahepática.

25 b. virus

30 Para las infecciones resultantes de causas víricas, los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden combinarse mediante aplicación simultánea con, antes o después de la aplicación de terapias convencionales para el tratamiento de infecciones víricas. Dichas terapias convencionales varían dependiendo del tipo de virus, aunque en casi todos los casos, la administración de suero humano que contiene anticuerpos (p. ej., IgA, IgG) específicos para el virus puede ser eficaz.

35 1) Gripe

La infección por gripe provoca fiebre, tos, mialgia, cefalea y malestar general, que con frecuencia se producen en epidemias estacionales. La gripe también se asocia con varios trastornos postinfecciosos, tales como encefalitis, miopericarditis, síndrome de Goodpasture y síndrome de Reye. La infección por gripe también suprime las defensas antibacterianas pulmonares normales, de modo que el paciente que se recupera de la gripe tiene un mayor riesgo de desarrollar neumonía bacteriana.

40 Las proteínas víricas de superficie de la gripe muestran variación antigénica notable, resultante de mutación y recombinación. Por tanto, los linfocitos T citotóxicos son el principal vehículo del hospedador para la eliminación del virus después de la infección. La gripe se clasifica en tres tipos principales: A, B y C. La gripe A es singular porque infecta tanto a seres humanos como a muchos otros animales (p. ej., cerdos, caballos, aves y focas) y es la principal causa de la gripe pandémica. Además, cuando una célula está infectada por dos cepas diferentes de gripe A, los genomas de ARN segmentados de dos tipos de virus parentales se mezclan durante la replicación para crear un replicante híbrido, lo que da como resultado nuevas cepas epidémicas. La gripe B no se replica en animales y, por tanto, tiene menos variación genética y la gripe C tiene un solo serotipo.

50 La mayoría de las terapias convencionales son paliativas de los síntomas resultantes de la infección, mientras que la respuesta inmunitaria del hospedador elimina de hecho la enfermedad. Sin embargo, determinadas cepas (p. ej., gripe A) pueden provocar enfermedades más graves y la muerte. La gripe A puede tratarse tanto clínicamente como profilácticamente mediante la administración de los inhibidores de aminos cíclicas amantadina y rimantadina, que inhiben la replicación vírica. Sin embargo, la utilidad clínica de estos fármacos está limitada debido a la incidencia relativamente alta de reacciones adversas, su estrecho espectro antivírico (solo gripe A) y la propensión del virus a volverse resistente. La administración de anticuerpo IgG en suero a las principales proteínas de superficie de la gripe, la hemaglutinina y la neuraminidasa, puede prevenir la infección pulmonar, mientras que la IgA de la mucosa es necesaria para prevenir la infección de las vías respiratorias altas y la tráquea. El tratamiento actual más eficaz para la gripe es la vacunación con la administración de virus inactivado con formalina o β -propiolactona.

55 2) Virus del sarampión

Después de una incubación de 9-11 días, los hospedadores infectados con el virus del sarampión desarrollan fiebre, tos, rinitis y conjuntivitis. En un período de 1-2 días, se desarrolla una erupción maculopapular eritematosa que se extiende rápidamente por todo el cuerpo. Debido a que la infección también suprime la inmunidad celular, el

hospedador tiene mayor riesgo de desarrollar superinfecciones bacterianas, incluyendo otitis media, neumonía y encefalomiелitis postinfecciosa. La infección de corta duración se asocia a morbilidad y mortalidad significativas, especialmente en adolescentes desnutridos.

5 El tratamiento para el sarampión incluye la administración pasiva de IgG humana agrupada, que puede prevenir la infección en sujetos no inmunes, incluso si se proporciona hasta una semana después de la exposición. Sin embargo, la inmunización previa con virus vivos, atenuados es el tratamiento más eficaz y previene la enfermedad en más del 95 % de los inmunizados. Ya que hay un serotipo de este virus, una sola inmunización o infección normalmente da como resultado protección de por vida contra infección posterior.

10 En una pequeña proporción de hospedadores infectados, el sarampión puede convertirse en SSPE, que es un trastorno neurológico progresivo crónico resultante de una infección persistente del sistema nervioso central. El SSPE está provocado por variantes clonales del virus del sarampión con defectos que interfieren con el ensamblaje y la gemación del virión. Para estos pacientes, sería deseable la reactivación de células T con los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención para facilitar la eliminación del virus.

3) *Virus de la hepatitis B*

20 El virus de la hepatitis B (VHB) es el patógeno transmitido por la sangre más infeccioso conocido. Es una de las principales causas de hepatitis de corta duración y crónica y de carcinoma hepático, así como de infección crónica de por vida. Después de la infección, el virus se replica en hepatocitos, que también liberan después el antígeno de superficie HBsAg. La detección de niveles excesivos de HBsAg en suero se utiliza como método convencional para diagnosticar una infección por hepatitis B. Una infección de corta duración puede resolverse o puede convertirse en una infección crónica persistente.

25 Los tratamientos actuales para VHB crónico incluyen interferón α , que aumenta la expresión de antígeno leucocitario humano (HLA) de clase I en la superficie de los hepatocitos, facilitando de este modo su reconocimiento por linfocitos T citotóxicos. Adicionalmente, los análogos nucleosídicos ganciclovir, famciclovir y lamivudina, también han demostrado tener alguna eficacia en el tratamiento de la infección por VHB en ensayos clínicos. Otros tratamientos para el VHB incluyen α -interferón pegilado, adenofovir, entecavir y telbivudina. Aunque puede conferirse inmunidad pasiva a través de la administración parenteral de anticuerpos séricos anti-HBsAg, la vacunación con HBsAg inactivado o recombinante también confiere resistencia a la infección. Los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden combinarse con tratamientos convencionales para infecciones por el virus de la hepatitis B para obtener ventajas terapéuticas.

35 4) *Virus de la hepatitis C*

40 La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) puede conducir a una forma crónica de la hepatitis, que da lugar a cirrosis. Aunque los síntomas son similares a infecciones resultantes de la hepatitis B, en claro contraste con el VHB, los hospedadores infectados pueden ser asintomáticos durante 10-20 años. El tratamiento para la infección por VHC incluye la administración de una combinación de α -interferón y ribavirina. Una posible terapia prometedora para la infección por el VHC es el inhibidor de la proteasa telaprevir (VX-960). Otros tratamientos incluyen: anticuerpo anti-PD-1 (MDX-1106, Medarex), bavituximab (un anticuerpo que se une a fosfatidilserina de fosfolípido aniónico de manera dependiente de B2-gluco proteína I, Peregrine Pharmaceuticals), anticuerpo o anticuerpos anti-proteína E2 de la envoltura del virus VPH (p. ej., ATL 6865 - Ab68 + Ab65, XTL Pharmaceuticals) y Civacir® (policlonal anti-inmunoglobulina humana VHC). Los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden combinarse con uno o más de estos tratamientos para las infecciones causadas por el virus de la hepatitis C para obtener ventajas terapéuticas.

50 Los inhibidores de proteasa, polimerasa y NS5A que pueden utilizarse junto con los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención para tratar específicamente la infección de la hepatitis C incluyen los siguientes identificados en la Tabla B

Tabla B

Inhibidores de proteasa y polimerasa de la hepatitis C		
Tipo de inhibidor	Nombre del inhibidor	Fabricante(s)
Proteasa	R7227/ITMN 191	Roche/InterMune
	CTS-1027	Roche Biociencias
	VX500, VX813, VX985	Vertex
	Telaprevir (VX950)	Vertex/Tibotec
	TMC435350/TMC 435	Medivir/Tibotec

(continuación)

Inhibidores de proteasa y polimerasa de la hepatitis C		
Tipo de inhibidor	Nombre del inhibidor	Fabricante(s)
	Boceprevir (SCH503034), Narlaprevir (SCH900518/SP900518)	Schering-Plough
	BI201335, BILN 2061	Boehringer Ingelheim
	MK7009	Merck
	IDX-136, IDX-316	Idenix
	BMS-790052, BMS-791325	Bristol Myers Squibb
	PHX-1766	Phenomix
	ACH-806	Achillion/Gilead
	ACH-1625	Achillion
	ABT-450	Abbott Labs
	VBY 376	Virobay
Inhibidores de polimerasa	R1626	Roche
	R7128	Roche/Pharmasset
	NM283	Idenix
	HCV796	Wyeth
	BILB 1941, BI-207127	Boehringer Ingelheim
	GL60667, GS9190	Gilead
	PF-00868554	Pfizer
	VCH757, VCH916	Virochem
	VX222, VX759	Vertex
	MK-3281	Merck
	ANA598	Anadys
	IDX184, IDX375	Idenix
	PSI-7851	Pharmasset
	ABT-072, ABT-333	Abbott Labs
	BMS650032	Bristol Myers Squibb
Inhibidores de NS5A	BMS790052, BMX824393	Bristol Myers Squibb
	AZD 2836, AZD 7295	Arrow Therapeutics
	GSK 625433	Glaxo Smith Kline

5) Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)

- 5 El VIH ataca a células CD4+, incluyendo linfocitos T, monocitos, macrófagos, a células dendríticas foliculares y a células de Langerhan, y las células auxiliares/inductoras CD4+ se agotan. Como resultado, el hospedador adquiere un defecto grave en la inmunidad mediada por células. La infección por VIH produce SIDA en al menos el 50 % de las personas y se transmite por contacto sexual, administración de sangre o productos sanguíneos infectados, inseminación artificial con semen infectado, exposición a agujas o jeringas que contienen sangre y por transmisión de una madre infectada al bebé durante el parto.
- 10

Un hospedador infectado con VIH puede ser asintomático, o desarrollar una enfermedad de corta duración parecida a la de la mononucleosis - fiebre, cefalea, dolor de garganta, malestar general y sarpullido. Los síntomas pueden evolucionar a una disfunción inmunitaria progresiva, incluyendo fiebre persistente, sudores nocturnos, pérdida de peso,

diarrea idiopática, eccema, soriasis, dermatitis seborreica, herpes zóster, candidiasis bucal y leucoplasia vellosa. Las infecciones oportunistas causadas por una gran cantidad de parásitos son comunes en pacientes cuyas infecciones se convierten en SIDA.

5 Los tratamientos para el VIH incluyen terapias antivíricas que incluyen análogos nucleosídicos, zidovudina (AZT), sola o junto con didanosina o zalcitabina, didesoxiinosina, didesoxicitidina, lamivudina, estavudina; inhibidores de transcriptasa inversa tales como delavirdina, nevirapina, lorigida e inhibidores de proteinasa tales como saquinavir, ritonavir, indinavir y nelfinavir. Los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden combinarse con tratamientos convencionales para infecciones causadas por el VIH para obtener ventajas terapéuticas.

10

6) *Citomegalovirus*

15 La infección por citomegalovirus (CMV) a menudo se asocia con infección persistente, latente y recurrente. El CMV infecta y permanece latente en monocitos y células progenitoras de granulocitos y monocitos. Los síntomas clínicos del CMV incluyen síntomas similares a los de la mononucleosis (es decir, fiebre, glándulas inflamadas, malestar general) y tendencia a desarrollar erupciones cutáneas alérgicas a los antibióticos. El virus se transmite por contacto directo. El virus se elimina por la orina, la saliva, el semen, y en menor medida, por otros fluidos corporales. La transmisión también puede producirse desde una madre infectada a su feto o recién nacido y por transfusión de sangre y trasplantes de órganos. La infección por CMV produce un deterioro general de la inmunidad celular, caracterizado por respuestas blastogénicas alteradas a mitógenos inespecíficos y a antígenos específicos del CMV, disminución de la capacidad citotóxica y elevación del número de linfocitos CD8 y de linfocitos CD4+.

20

25 Los tratamientos de la infección por CMV incluyen los antivíricos ganciclovir, foscarnet y cidovir, pero estos medicamentos normalmente sólo se recetan a pacientes inmunodeprimidos. Los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden combinarse con tratamientos convencionales para infecciones causadas por citomegalovirus para obtener ventajas terapéuticas.

25

7) *Virus de Epstein-Barr*

30 El virus de Epstein-Barr (VEB) puede establecer infecciones persistentes y latentes y ataca principalmente a las células B. La infección por VEB produce el cuadro clínico de mononucleosis infecciosa, que incluye fiebre, dolor de garganta, a menudo con exudado, linfadenopatía generalizada y esplenomegalia. También se manifiesta hepatitis, que puede convertirse en ictericia.

35 Si bien los tratamientos habituales para las infecciones por VEB son paliativos de los síntomas, el VEB está asociado al desarrollo de determinados cánceres tales como el linfoma de Burkitt y el cáncer de nasofaringe. Por tanto, la eliminación de la infección vírica antes de que se produzcan estas complicaciones sería de gran beneficio. Los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden combinarse con tratamientos convencionales para infecciones por el virus de Epstein-Barr para obtener ventajas terapéuticas.

40

8) *Virus del herpes*

45 El virus del herpes simple (VHS) se transmite por contacto directo con un hospedador infectado. Una infección directa puede ser asintomática, pero normalmente se producen ampollas que contienen partículas infecciosas. La enfermedad se manifiesta como ciclos de períodos activos de enfermedad, en la que las lesiones aparecen y desaparecen a medida que el virus infecta de forma latente el ganglio nervioso para brotes posteriores. Las lesiones pueden estar en la cara, los genitales, ojos y/o manos. En algún caso, una infección también puede causar encefalitis.

45

50 Los tratamientos para las infecciones por herpes están dirigidos principalmente a resolver los brotes sintomáticos e incluyen medicamentos sistémicos antivíricos tales como: aciclovir (p. ej., Zovirax®), valaciclovir, famciclovir, penciclovir y medicamentos tópicos tales como docosanol (Abreva®), tromantadina y zilactina. La eliminación de infecciones latentes de herpes sería de gran beneficio clínico. Los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden combinarse con tratamientos convencionales para infecciones por el virus del herpes para obtener ventajas terapéuticas.

55

9) *HTLV*

60 El virus Linfotrópico de células T humanas (VLTH-1, VLTH-2) se transmite por contacto sexual, lactancia materna o exposición a sangre contaminada. El virus activa un subconjunto de T_H células llamadas células Th1, dando como resultado su sobreproliferación y sobreproducción de citocinas relacionadas con Th1 (p. ej., IFN- γ y TNF- α). Esto a su vez da como resultado una supresión de los linfocitos Th2 y una reducción de la producción de citocinas Th2 (p. ej., IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13), causando una reducción en la capacidad de un hospedador infectado para generar una respuesta inmunitaria adecuada a los organismos invasores que requieren una respuesta dependiente de Th2 para su eliminación (p. ej., infecciones parasitarias, producción de anticuerpos en la mucosa y humorales).

65

Las infecciones causadas por el VLTH provocan infecciones oportunistas que causan bronquiectasia, dermatitis y

sobreinfecciones con *Staphylococcus spp.* y *Strongyloides spp.* produciendo la muerte por septicemia polimicrobiana. La infección por el VLTH también puede provocar directamente leucemia/linfoma de células T en adultos y la enfermedad desmielinizante progresiva de la neurona motora superior conocida como HAM/TSP. La eliminación de las infecciones latentes por el VLTH sería de gran beneficio clínico. Los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden combinarse con tratamientos convencionales para infecciones por el VLTH para obtener ventajas terapéuticas.

10) VPH

El virus del papiloma humano (VPH) afecta principalmente a los queratinocitos y se presenta de dos formas: cutánea y genital. Se cree que la transmisión se produce a través del contacto directo y/o las relaciones sexuales. La infección por el VPH, tanto cutánea como genital, puede provocar verrugas e infecciones latentes y, a veces, infecciones recurrentes, que están controladas por la inmunidad del hospedador que controla los síntomas y bloquea la aparición de verrugas, pero permite que el hospedador transmita la infección a otras personas.

La infección por el VPH también puede dar lugar a determinados cánceres, tales como, cervicouterino, anal, vulvar, peneano y orofaríngeo. No se conocen curas para la infección por el VPH, pero el tratamiento actual es la aplicación tópica de Imiquimod, que estimula el sistema inmunitario para atacar la zona afectada. La eliminación de las infecciones latentes por el VPH sería de gran beneficio clínico. Los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden combinarse con tratamientos convencionales para infecciones por HPV para obtener ventajas terapéuticas.

c. hongos

Las infecciones por hongos o micosis, pueden resultar como una infección primaria o como una colonización oportunista de hospedadores con sistemas inmunitarios comprometidos por flora endógena. La inmunidad a la micosis es principalmente celular, involucrando neutrófilos, macrófagos, linfocitos y probablemente linfocitos citolíticos naturales (NK). Por lo general, las micosis no son susceptibles a la destrucción directa por anticuerpos y complemento. Las micosis sistémicas invasivas resultantes de una infección primaria incluyen blastomicosis, coccidioidomicosis, histoplasmosis y paracoccidioidomicosis. Para las infecciones crónicas resultantes de infecciones por hongos, los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden administrarse antes, de forma simultánea o posterior, a cualquiera de los tratamientos convencionalmente conocidos para estas micosis.

La blastomicosis, causada por *Blastomyces dermatitis* se adquiere por inhalación y produce una infección pulmonar primaria o una enfermedad diseminada por vía hematógena que afecta predominantemente a la piel, huesos y aparato genitourinario masculino. La exposición primaria puede ser asintomática o puede producir un síndrome similar a la gripe. Esta enfermedad puede manifestarse de forma crónica e indolente. La enfermedad también se asocia con inmunidad comprometida, como es el caso de los pacientes con SIDA. La terapia convencional para la infección por *B. dermatitis* incluye itraconazol, ketoconazol o inyección intravenosa de anfotericina B.

La coccidioidomicosis, causada por *Coccidioides immitis*, se adquiere por inhalación y puede causar infección pulmonar primaria, enfermedad pulmonar progresiva, o enfermedad diseminada por vía hematógena que afecta predominantemente a la piel, tejidos subcutáneos, huesos, articulaciones y meninges. La exposición primaria puede ser asintomática (60 %) o estar asociada a un síndrome similar a la gripe. Puede producirse neumonía, pleuritis y cavitación pulmonar. Las manifestaciones metastásicas incluyen lesiones cutáneas, incluyendo nódulos, úlceras, fístulas de lugares más profundos y granulomas verrugosos, huesos, articulaciones, vainas tendinosas y meninges, incluyendo meningitis. La enfermedad también se asocia a inmunidad comprometida, como es el caso de los pacientes con SIDA. El tratamiento para la coccidioidomicosis incluye ketoconazol, intraconazol y fluconazol, especialmente para la terapia de mantenimiento a largo plazo de enfermedades no meningiales. Las formas meníngeas generalmente se tratan con la administración intratecal de anfotericina B.

La histoplasmosis, causada por *Histoplasma capsulatum*, es una enfermedad del sistema reticuloendotelial que se adquiere por inhalación en la que pequeñas levaduras residen en los macrófagos. Puede producir infección pulmonar primaria, enfermedad pulmonar progresiva o enfermedad diseminada por vía hematógena que afecta predominantemente al sistema reticuloendotelial, a las superficies mucosas y glándulas suprarrenales. La reactivación de infecciones latentes suele ocurrir en pacientes con inmunidad comprometida, como es el caso de los pacientes con SIDA. La exposición primaria puede ser asintomática o estar asociada con un síndrome similar a la gripe, incluyendo neumonía, pleuritis, cavitación pulmonar y adenopatía mediastínica. Los sitios metastásicos incluyen el sistema reticuloendotelial (hepatoesplenomegalia, linfadenopatía, anemia, leucopenia y trombocitopenia), las membranas mucosas (ulceraciones oronasofaríngeas), el tubo gastrointestinal (malabsorción) e insuficiencia suprarrenal. Si bien la mayoría de las infecciones primarias se resuelven espontáneamente, cuando se asocian a inmunidad comprometida, tal como en pacientes con SIDA, la recidiva es continua y a menudo se asocia a neumonía hematógena, SDRA, coagulación intravascular diseminada (CID), papulopústulas y meningitis de distribución por vía hematógena. La histoplasmosis se trata con anfotericina B (especialmente en pacientes inmunodeprimidos gravemente enfermos con diseminación hematógena), intraconazoles y ketoconazol.

La paracoccidioidomicosis, causada por *Paracoccidioides brasiliensis*, es una micosis adquirida por inhalación que puede producir infección pulmonar primaria o enfermedad diseminada por vía hematógena que afecta

predominantemente a la piel, membranas mucosas, sistema reticulendotelial y suprarrenales. La infección puede ser inicialmente asintomática pero latente y luego revivir. El tratamiento de esta infección utiliza ketoconazol, itraconazol y sulfonamidas.

5 Las micosis sistémicas invasivas resultantes de patógenos oportunistas, que se producen en hospedadores inmunodeprimidos, incluyen candidiasis, criptococosis, aspergilosis, mucormicosis y neumocistosis. Al aumentar la respuesta inmunitaria en un sistema inmunitario comprometido, los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención también pueden tener valor terapéutico en el tratamiento de estas afecciones, especialmente cuando se combinan con terapias convencionales.

10 Los tratamientos para la candidiasis (causada por *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*), criptococosis (causada por *Cryptococcus neoformans*), aspergilosis (causada por *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus* y *A. niger*) y mucormicosis (causada por *Rhizopus arrizus*, *Rhizomuco*, *Absidia*, *Cunninghamella*, *Mortierella*, *Saksenaea spp.*) pueden ser tratamientos mediante uno o más de los siguientes, imidazol, ketoconazol, intraconazol, fluconazol, anfotericina B con y sin flucitosina. La neumocistitis (causada por *Pneumocystis carinii*) recientemente reclasificada de protozoo a hongo se trata con trimetoprim-sulfametoxol (TMP-SMZ) e isetionato de pentamidina intravenoso, así como dapsona, TMP-dapson, trimetrexato, clindamicina-primaquina y atovagnona.

15 La microsporidiosis causada por parásitos Microsporidia, recientemente se reclasificó de protozoo a hongo. Se trata de organismos unicelulares que tienen mitosomas en lugar de mitocondrias. Los organismos que pueden causar enfermedades en seres humanos incluyen: *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon hellem*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Pleistophora spp.*, *Trachipleistophora hominis*, *Trachipleistophora anthropophthera*, *Nosema connori*, *Nosema oculorum*, *Brachiola vesicularum*, *Vittaforma corneae*, *Microsporidium ceylonensis*, *Microsporidium africanum*, *Brachiola algerae*.

20 Se cree que las infecciones se transmiten a los humanos por contacto directo con animales, agua contaminada u otro hospedador infectado. Después de infectar las células hospedadoras, el esporoplasma crece, dividiendo o formando un plasmodio multinucleado que puede tener ciclos de vida complejos que incluyen reproducción tanto asexual como sexual. La autoinfección por generaciones sucesivas y las enfermedades debilitantes y crónicas a menudo caracterizan a las infecciones por microsporidios.

25 Las manifestaciones clínicas de la enfermedad pueden variar según la especie y el estado inmunitario del hospedador, e incluyen conjuntivitis (p. ej., *V. corneae*), diarrea crónica, malabsorción y emaciación (p. ej., *E. bieneusi*, *E. intestinalis*).

30 El tratamiento de la microsporosis ocular, intestinal y diseminada incluye la administración de albendazol. La aplicación tópica de fumagilina también se puede utilizar eficazmente para tratar la queratoconjuntivitis por microsporidios. Otros fármacos incluyen antihelmínticos (p. ej., albendazol), antibióticos (p. ej., fumagilina), inmunomoduladores (p. ej., talidomida), antiprotozoarios, (p. ej., metronidazol).

40 d. protozoo

Las enfermedades derivadas de trastornos parasitarios como el paludismo, la esquistosomiasis y la leishmaniasis figuran entre los problemas sanitarios más prevalentes e importantes en los países en desarrollo. Estas enfermedades plantean retos particulares porque pueden evadir la inmunidad del hospedador por diversos medios, que incluyen: 1) vivir dentro de las células hospedadoras (p. ej., Leishmania), 2) cambian rápidamente los antígenos de superficie (p. ej., tripanosomas) y 3) "disfrazarse" de células hospedadoras mostrando antígenos del hospedador (p. ej., esquistosomiasis). El uso de fármacos inmunosupresores en el tratamiento del cáncer y junto con trasplantes de órganos, así como la prevalencia global del SIDA puede reactivar infecciones latentes o subclínicas de *Plasmodium spp.*, *Toxoplasma spp.*, *Leishmania spp.*, *Cryptosporidium spp.*, *Trypanosoma spp.* y helmintos.

50 Para infecciones crónicas resultantes de infecciones con parásitos protozoarios, los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden combinarse mediante administración junto con, antes que o después de las terapias antiprotozoarias estándar.

55 *El paludismo*, causado por parásitos del género *Plasmodium* (p. ej., *P. ovale*, *P. malariae*, *P. falciparum*, *P. vivax*), comienza el ciclo infeccioso como un esporozoíto que se desarrolla en el intestino de la hembra del mosquito *Anopheles*. Después de la transmisión a humanos, estos esporozoítos invaden y se multiplican dentro de las células hepáticas sin inducir una reacción inflamatoria. La descendencia de estos organismos, denominados merozoítos, invade después las células eritrocíticas e inician la fase clínica de la enfermedad, caracteriza habitualmente por fiebre y escalofríos. En zonas del mundo donde la infección es endémica, casi todos los residentes albergan infecciones crónicas continuas de bajo nivel de patogenicidad baja a moderada, con niveles crecientes de anticuerpos IgG que brindan protección contra la entrada de merozoítos a los eritrocitos.

65 Los fármacos antipalúdicos actualmente disponibles tanto para el tratamiento de la enfermedad clínica como para la profilaxis incluyen: Arteméter-lumefantrina (terapia, p. ej., Coartem® y Riamet®), artesunato-amodiaquina (terapia),

artesanato-mefloquina (terapia), artesunato-sulfadoxina/pirimetamina (terapia), atovacuona-proguanil, (terapia y profilaxis, p. ej., Malarone®), quinina (terapia), cloroquina (terapia y profilaxis), cotrifazida (terapia y profilaxis), doxiciclina (terapia y profilaxis), mefloquina, (terapia y profilaxis, p. ej., Lariam®), primaquina (terapia en *P. vivax* y *P. ovale* únicamente; no para profilaxis), proguanil (profilaxis), sulfadoxina-pirimetamina (terapia y profilaxis), hidroxicloquina, (terapia y profilaxis, p. ej., Plaquenil®)

Al reactivar las células T anérgicas, los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden ser particularmente terapéuticos para ayudar a eliminar los parásitos del paludismo.

La toxoplasmosis, causada por parásitos del género *Toxoplasma*, suele ser asintomática, pero una pequeña fracción puede desarrollar enfermedad clínica, que puede variar desde linfadenopatías benignas de corta duración hasta infecciones mortales del sistema nervioso central. Las fuentes de infección incluyen quistes en carne de cerdo o cordero cruda o parcialmente cocida y ovocitos eliminados en las heces de gatos infectados. La infección se produce en seres humanos generalmente a través del tubo gastrointestinal, y los protozoos pueden entrar y proliferar (como taquizoítos) en prácticamente todas las células del organismo. Estos taquizoítos pueden producir quistes llenos de diminutos cuerpos infecciosos de crecimiento lento (bradizoítos) que permanecen viables durante largos períodos de tiempo, dando como resultado una infección crónica latente. Los hospedadores con sistemas inmunitarios comprometidos, como los que toman fármacos inmunosupresores o padecen VIH son particularmente propensos a padecer toxoplasmosis.

Los medicamentos que se utilizan para tratar la toxoplasmosis primaria incluyen los siguientes: pirimetamina, con y sin antibióticos concomitantes (p. ej., sulfadiazina, clindamicina, espiramicina y minociclina). La toxoplasmosis latente puede tratarse con los antibióticos atovacuona, con y sin clindamicina.

La leishmaniasis, causada por parásitos del género *Leishmania*, infecta a los macrófagos de la piel y las vísceras y se transmite a los humanos a través de moscas de arena (flebotomos). Como hay pocos o ningún anticuerpo sérico específico, la inmunidad mediada por células a través de células T activadas parece ser una ruta crítica por la que se elimina la infección. La leishmaniasis del viejo mundo, también conocida como llaga tropical, es causada por varias especies de *Leishmania*: *L. tropica*, *L. major* y *L. aethiopica*. La leishmaniasis del nuevo mundo es causada por varias subespecies de *L. mexicana* y *L. braziliensis*. Estos parásitos inducen una fuerte respuesta inmunitaria mediada por células, pero el resultado de la enfermedad clínica también depende en parte de la respuesta del hospedador. Si el hospedador desarrolla una respuesta mediada por células suprimida o inadecuada, el resultado es la leishmaniasis cutánea crónica difusa, con pocas esperanzas de curación espontánea (p. ej., *L. aethiopica*, *L. mexicana*). Si el hospedador genera una respuesta mediada por células excesiva, la respuesta es una leishmaniasis lupoides o recidivante, con nódulos linfoides no ulcerados persistentes que aparecen en el borde de las lesiones primarias (p. ej., *L. tropica*). La leishmaniasis recidivante puede aparecer entre 1 y 10 años después de la lesión inicial. Hay dos formas de la enfermedad, cutánea y visceral, manifestándose la forma cutánea en lesiones cutáneas con inmunidad mediada por células y es fundamental para su eliminación. En la forma visceral, la inmunidad mediada por células es insuficiente o inexistente, y la enfermedad se manifiesta clínicamente como hipergammaglobulinemia policlonal de células B, leucocitopenia, esplenomegalia y producción elevada de TNF- α .

La miltefosina (p. ej., Impavido®) y la paramiocina son tratamientos actualmente disponibles para la leishmaniasis tanto cutánea como visceral.

La criptosporidiosis, está causada por infecciones de protozoos del género *Cryptosporidia* y resulta del contacto humano directo con excrementos fecales de hospedadores infectados. La infección del tejido de la mucosa intestinal puede provocar diarrea. La enfermedad suele manifestarse como una infección de corta duración, pero puede volverse crónica, especialmente en personas inmunodeprimidas. Los tratamientos suelen ser paliativos, especialmente la hidratación, pero la paromomicina, la azitromicina y las Ig séricas (por ejemplo, Lactobin-R®) han conseguido eliminar la infección.

La tripanosomiasis, causada por el parásito *Trypanosoma* (p. ej., *T. brucei*, subsp. *gambiense*, *rhodesiense*) infecta a seres humanos y ganado a través de la picadura de la mosca tsetsé. La exposición que plantea este patógeno es el resultado de generaciones sucesivas de poblaciones que muestran diferentes antígenos de superficie. Las infecciones se caracterizan por niveles elevados de inmunoglobulinas séricas no específicas y no protectoras.

Los tratamientos para la *Tripanosomiasis* incluyen la administración intravenosa de lo siguiente: pentamidina (para *T. b gambiense*), suramina intravenosa (para *T. b rhodesiense*), eflomitina, melarsoprol con y sin nifurtimox.

La infección helmíntica, producida por trematodos (p. ej., *Schistosoma spp.*), cestodos y nematodos comparte las respuestas inmunitarias comunes de eosinófilos y anticuerpos reagínicos, respuestas que dependen de las células T.

La *esquistosomiasis* (también conocida como bilharziasis), causada por *Shistosoma mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium* y *S. mekongi*, inician su ciclo de vida como huevos en agua, que después se convierten en miracidios, que se introducen en los caracoles y crean múltiples generaciones de esporocistos. Estos, a su vez, producen cercarias con cola bífida que pueden infectar el torrente sanguíneo de un hospedador humano como esquistosoma,

que migran inicialmente a los pulmones y después al hígado. Estos gusanos trematodos con el tiempo se emparejan, se aparean y ponen huevos en las vénulas mesentéricas. Aunque muchos de estos huevos viajan a los intestinos y se excretan, algunos quedan atrapados en la submucosa, las vénulas porta del hígado y otros órganos del cuerpo. La inflamación granulomatosa asociada con los huevos atrapados es el síntoma definitivo de la esquistosomiasis crónica.

5 Los tratamientos para la esquistosomiasis incluyen la administración de Praziquantel®, antimonio, Oxamniquina (*S. mansoni*) y Mirazid®.

10 Las infecciones por cestodos se pueden clasificar en dos grupos, uno son las tenias adultas que habitan en el intestino, como *Diphyllobothrium latum* y *Taenia saginata*, que tienen un efecto inmunitario, restringido, no humoral. El segundo grupo describe tenias larvianas que se enquistan en tejidos migratorios, tales como *Hymenolepis nana*, *Echinococcus granulosus* y *Taenia solium*, que inducen fuertes respuestas del hospedador precursor y anticuerpos protectores en suero. La infección por cestodos más grave en humanos es la equinococosis, que cuando se implanta en el hígado, pulmones, cerebro, riñones u otras partes del cuerpo, puede producir la formación de quistes hidatídicos.

15 Los tratamientos para la equinococosis incluyen la administración de metronidazol, albendazol e intervención quirúrgica, tal como extirpación, aspiración, marsupialización u omentopexia.

20 Los nematodos son los helmintos más comunes, variados y ampliamente distribuidos que infectan al ser humano, causando trastornos tales como triquinosis, ascariosis, filariosis y estrogilodiosis. La triquinosis, producida por *Trichinella spiralis*, puede ser el resultado de la ingestión de larvas de *T. spiralis* en carne cruda o parcialmente cocida como la carne de cerdo. En el ser humano, las infecciones suscitan una fuerte respuesta humoral con niveles elevados de IgM, seguida de la producción de IgG, seguida de una rápida expulsión de los gusanos dañados por anticuerpos por parte de los linfocitos T.

25 El único tratamiento conocido para destruir a los gusanos adultos en el intestino es el tiabendazol, mientras que no se conoce ningún tratamiento para destruir a las larvas.

30 El *Ascaris*, también conocido como lombriz gigante (*Ascaris lumbricoides*), es un parásito común en seres humanos resultante de la ingestión de sustancias contaminadas con heces. Aunque los pacientes pueden permanecer asintomáticos durante períodos de tiempo muy prolongados, a medida que los estadios larvales viajan por el cuerpo, pueden causar daño visceral, peritonitis e inflamación, agrandamiento del hígado o del bazo, toxicidad y neumonía.

35 Los tratamientos para la ascariosis incluyen la administración de mebendazol (p. ej., Vermox®), piperazina, pamoato de pirantel (p. ej., Antiminth®, Pin-Rid®, Pin-X®), albendazol, tiabendazol con o sin piperazina, hexilresorcinol, santonina y aceite de *Chenopodium*. Los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención también pueden administrarse junto con, antes o después de la administración de estas terapias para el tratamiento de la ascariosis.

40 La filariosis, causada por nematodos filarídicos, se introduce en los seres humanos a través de insectos vectores. *Onchocerca volvulus*, que produce oncoceriasis o ceguera de los ríos, se transmite por picaduras de la mosca negra. Las larvas infecciosas se alojan subcutáneamente y se desarrollan hasta convertirse en adultos, inducen una respuesta fibrogénica del hospedador y liberan una gran cantidad de microfilarias, que se dispersan por vía subcutánea y por los ojos, induciendo aún más una queratosis o retinitis que después hace que la córnea se vuelva opaca. La filariosis linfática es el resultado de una infección por *Brugia spp.* y *Wuchereria spp.* Con el tiempo, la cicatrización del tejido linfático, especialmente en la ingle, puede impedir el drenaje, provocando una afección desfigurante, la elefantiasis.

45 El tratamiento primario para la filariosis es la administración del antibiótico ivermectina, albendazol y citrato de dietilcarbamazina (DEC, Hetrazan®) con o sin ivermectina o albendazol. Otras perspectivas de tratamiento incluyen doxiciclina, que destruye a una bacteria simbiótica, *Wolbachia*.

50 La estrogilodiosis, producida por parásitos del género *Strongyloides* (p. ej., *S. stercoralis*, *S. fülleborni*), es una enfermedad que se transmite a los humanos a través del suelo contaminado con heces. Pueden existir tanto en un ciclo de vida libre (larvas rabsitiformes que maduran hasta convertirse en gusanos adultos) como en un ciclo parasitario (larvas filariformes que maduran hasta convertirse en gusanos adultos) que se introducen en la piel, viajan a los pulmones, después a la faringe y finalmente residen en el intestino. También se conoce la autoinfección por *Strongyloides*, que consiste esencialmente en la infección repetida por generaciones sucesivas de larvas filariformes.

55 Las infecciones pueden ser asintomáticas o pueden caracterizarse por dolor y diarrea en el tubo gastrointestinal, síndrome de Löffler en los pulmones (es decir, eosinofilia) y urticaria. También puede haber eosinofilia en sangre. Como la infección persistente de *Strongyloides* puede imitar una úlcera péptica, enfermedad de la vesícula biliar y enfermedad de Crohn, el diagnóstico erróneo es frecuente. Es un problema particular en hospedadores inmunodeprimidos.

60 Los tratamientos conocidos para estrogilodiosis son ivermectina, albendazol o tiabendazol, pero como este medicamento sólo destruye a los gusanos adultos, es necesaria la administración repetida.

e. vacunación

La vacunación o la administración de material antigénico para inducir inmunidad a una enfermedad se utiliza habitualmente para prevenir o mejorar los efectos de la infección por un patógeno. La mejora de la inmunidad del hospedador puede utilizarse en antígenos no deseados que se encuentran no sólo en patógenos infecciosos, sino también tejidos del hospedador que han enfermado (p. ej., cancerosos). Tradicionalmente, las vacunas proceden de patógenos enteros debilitados o muertos, pero también pueden ser péptidos que representan epítomos en el patógeno intacto que son reconocidos específicamente por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I o clase II en seres humanos. Los antígenos peptídicos de particular interés son los que las células T reconocen específicamente.

Recientemente, se ha demostrado que la combinación de una vacunación terapéutica con la administración del bloqueo de PD-L1 en células T CD8+ agotadas dio como resultado una función y un control vírico mejorados en un modelo de ratón con infección crónica. Ha *et al.*, J. Exp. Med. 205(3): 543-555 (2008). Como resultado, los anticuerpos anti-PD-L1 descritos en el presente documento también pueden combinarse con vacunación antigénica (p. ej., administrarse antes, de manera simultánea o después) para tratar la infección (p. ej., de corta duración y crónica) resultantes de la invasión vírica, bacteriana, fúngica o protozoaria, así como de la inmunidad tumoral.

G. Dosis Farmacéuticas:

Las dosis y la concentración de fármaco deseada de las composiciones farmacéuticas pueden variar dependiendo del uso particular previsto. La determinación de la dosis o vía de administración apropiada está dentro de la habilidad de un experto común. Los experimentos con animales proporcionan una orientación fiable para la determinación de dosis eficaces para la terapia humana. La gradación a escala entre especies de dosis eficaces puede realizarse siguiendo los principios establecidos por Mordenti, J. y Chappell, W. "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics", In Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi *et al.*, Eds, Pergamon Press, Nueva York 1989, págs. 42-46.

Cuando la administración de los polipéptidos o anticuerpos descritos en el presente documento se utiliza *in vivo*, las cantidades normales de dosificación pueden variar desde aproximadamente 10 ng/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal de mamífero o más por día, preferentemente de aproximadamente 1 mg/kg/día a 10 mg/kg/día, dependiendo de la vía de administración. En la bibliografía se proporciona orientación sobre dosis y métodos de suministro particulares; véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 4.657.760, 5.206.344; o 5.225.212. Está dentro del alcance de la invención que diferentes formulaciones serán eficaces para diferentes tratamientos y diferentes trastornos, y que la administración destinada a tratar un órgano o tejido específico puede requerir el suministro de una manera diferente a la de otro órgano o tejido. Así mismo, las dosis pueden administrarse mediante una o más administraciones distintas o mediante infusión continua. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, se continuará el tratamiento hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

H. Administración de la Formulación

Las formulaciones de la presente invención, incluyendo, pero sin limitación, formulaciones líquidas y reconstituídas, se administran a un mamífero que necesita tratamiento con los anticuerpos anti-PD-L1, preferentemente a un ser humano, de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa en embolada o mediante infusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinoval, intratecal, oral, tópica o inhalación.

Las formulaciones se pueden administrar al mamífero mediante administración subcutánea (es decir, debajo de la piel). Para tales fines, la formulación se puede inyectar utilizando una jeringa. Sin embargo, se dispone de otros dispositivos para la administración de la formulación, tales como dispositivos de inyección (p. ej., los dispositivos INJECT-EASE™ y GENJECT™); plumas inyectoras (como el GENPEN™); dispositivos de autoinyección, dispositivos sin agujas (p. ej., MEDIJECTOR™ y BIOJECTOR™); y sistemas de suministro de parches subcutáneos.

En el presente documento también se describen kits para una unidad de administración de dosis única. Dichos kits pueden comprender un recipiente de una formulación acuosa de proteína o anticuerpo terapéutico, incluidas jeringas precargadas de una o varias cámaras. Vetter GmbH, Ravensburg, Alemania, dispone de jeringas precargadas ilustrativas.

La dosis adecuada ("cantidad terapéuticamente eficaz") de la proteína dependerá, por ejemplo, de la afección que se vaya a tratar, de la gravedad y el transcurso de la dolencia, de si la proteína se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, del historial clínico del paciente y de la respuesta al anticuerpo anti-PD-L1, del formato de la formulación utilizada y del criterio del médico tratante. El anticuerpo anti-PD-L1 se administra adecuadamente al paciente en un momento o durante una serie de tratamientos y se puede administrar al paciente en cualquier momento desde el diagnóstico en adelante. El anticuerpo anti-PD-L1 se puede administrar como único

tratamiento o junto con otros fármacos o terapias útiles para tratar la afección en cuestión.

Para los anticuerpos anti-PD-L1, una dosis candidata inicial puede variar entre aproximadamente 0,1 y 20 mg/kg para la administración al paciente, que puede tomar la forma de una o más administraciones distintas. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. El progreso de dicha terapia se controla fácilmente mediante técnicas convencionales.

I. Artículos de Fabricación

La divulgación también se refiere a un artículo de fabricación que contiene la formulación y preferentemente proporciona instrucciones para su uso. El artículo de fabricación comprende un recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales (p. ej., viales de doble cámara), jeringas (tales como jeringas de una o dos cámaras) y tubos de ensayo. Los recipientes pueden conformarse a partir de diversos materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene la formulación. La etiqueta, que está en el recipiente o asociada al mismo, puede indicar instrucciones de reconstitución y/o uso. La etiqueta puede indicar además que la formulación es útil o está destinada a la administración subcutánea y/o al tratamiento de un trastorno disfuncional de las células T. El recipiente que contiene la formulación puede ser un vial de usos múltiples, lo que permite administraciones repetidas (p. ej., de 2 a 6 administraciones) de la formulación reconstituida. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que contenga un diluyente adecuado (p. ej., BWF1). Al mezclar el diluyente y la formulación liofilizada, la concentración final de proteína en la formulación reconstituida será generalmente de al menos 50 mg/ml. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas y prospectos con instrucciones de uso.

La invención se entenderá de forma más completa con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos no deberían interpretarse como limitativos del alcance de la invención.

La divulgación también se refiere a un artículo de fabricación que comprende las formulaciones descritas en el presente documento para administración en un dispositivo autoinyector. Un autoinyector puede describirse como un dispositivo de inyección que, al activarse, suministrará su contenido sin ninguna acción adicional necesaria por parte del paciente o administrador. Son especialmente adecuados para la automedicación de formulaciones terapéuticas cuando la velocidad de suministro debe ser constante y el tiempo de administración sea superior a unos instantes.

EJEMPLO 1

Identificación de anticuerpos anti-PD-L1 en bibliotecas de fases

Clasificación y detección de bibliotecas para identificar anticuerpos anti-PD-L1

Como antígenos para la clasificación alternativa de bibliotecas, se utilizaron fusiones de PD-L1-Fc de ser humano (R&D Systems, cat. n.º 156-B7) y de murino (R&D Systems, cat. n.º 1019-B7). Específicamente, en primer lugar, se clasificaron fagotecas contra el antígeno humano, seguido del antígeno murino, humano y murino en las tres rondas posteriores. Inmunoplasmas Nunc de 96 pocillos Maxisorp® se recubrieron durante la noche a 4 °C con antígeno diana (10 µg/ml) y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con tampón de bloqueo de fagos PBST (solución salina tamponada con fosfato (PBS) y seroalbúmina bovina (BSA) al 1 % (p/v) y tween-20 al 0,05 %). A las placas con el antígeno, se añadieron fagotecas de anticuerpos VH (véase, p. ej., Lee *et al.*, J. Immunol. Meth. 284: 119-132, 2004) y VH/VL (véase Liang *et al.*, J. Mol. Biol. 366: 815-829, 2007) por separado y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, las placas recubiertas con antígeno se lavaron diez veces con PBT (PBS con Tween-20 al 0,05 %) y los fagos unidos se eluyeron con HCl 50 mM y NaCl 500 mM durante 30 minutos y se neutralizaron con un mismo volumen de base Tris 1 M. (pH 7,5). Los fagos recuperados se amplificaron en células de *E. coli* XL-1 Blue. Durante las siguientes rondas de selección, la incubación de fagos de anticuerpo con las placas recubiertas de antígeno se redujo a 2-3 horas y se aumentó gradualmente la rigurosidad del lavado de las placas.

Después de 4 rondas de selección, se observó un enriquecimiento significativo. Se seleccionaron 96 clones cada uno de la clasificación de bibliotecas VH y VH/VL para determinar si se unían específicamente a PD-L1-Fc tanto humano como murino. Las regiones variables de estos clones se secuenciaron mediante PCR para identificar clones de secuencia singulares.

Los clones progenitores de interés se reformatearon en las IgG clonando regiones VL y VH de clones individuales en el vector LPG3 y LPG4 (Lee *et al.*, citado anteriormente), respectivamente, expresándose de manera transitoria en células CHO de mamíferos y purificándose con una columna de proteína A. Los anticuerpos de 13 fagos se evaluaron en cuanto a su capacidad para bloquear la interacción entre la proteína de fusión PD-1-Fc soluble y la PD-L1 humana o de ratón expresada en células 293 (los valores de CI₅₀ se indican en la Tabla 1, mitad superior). YW243.55, el anticuerpo con la CI₅₀ más baja para bloquear la unión de PD-L1 humano a PD-1, se seleccionó para una maduración de afinidad posterior con objeto de mejorar su afinidad por PD-L1 tanto humano como de ratón. (Tabla 1). Un anticuerpo con reactividad cruzada comparable contra especies de primates y murinos (además de conservar la afinidad con el ser humano) proporcionaría una terapia de mayor valor, en el sentido de que el mismo anticuerpo que

ha sido bien caracterizado en modelos experimentales puede usarse en ensayos clínicos en humanos. Esto evita la incertidumbre resultante del uso de un sustituto específico del modelo.

Construcción de bibliotecas para mejorar la afinidad de clones procedentes de la biblioteca V_H

El fagémido pW0703 (procedente del fagémido pV0350-2b (Lee *et al.*, J. Mol. Biol 340: 1073-1093 (2004)), que contiene el codón de parada (TAA) en todas las posiciones de la CDR-L3 y que presenta Fab monovalente en la superficie del bacteriófago M13) sirvió como molde de biblioteca para injertar dominios variables de cadena pesada (V_H) de clones de interés de la biblioteca de V_H para la maduración por afinidad. Para la maduración por afinidad se utilizaron estrategias de aleatorización estricta y suave. Para la aleatorización estricta, se aleatorizó una biblioteca de cadenas ligeras con posiciones seleccionadas de las tres CDR de cadenas ligeras utilizando aminoácidos diseñados para imitar anticuerpos humanos naturales y la degeneración del ADN diseñada fue como se describe en Lee *et al.* (J. Mol. Biol 340, 1073-1093 (2004)). Para la aleatorización suave, los restos en las posiciones 91-94 y 96 de CDR-L3, 28-31 y 34-35 de CDR-H1, 50, 52 y 53-58 de CDR-H2, 95-99 y 100A de CDR-H3, se direccionaron; y dos combinaciones diferentes de bucles CDR, L3/H1/H2 y L3/H3, se seleccionaron para la aleatorización. Para lograr las condiciones de aleatorización suave, que introdujo una tasa de mutación de aproximadamente el 50 % en las posiciones seleccionadas, el ADN mutagénico se sintetizó con mezclas de bases 70-10-10-10 que favorecen los nucleótidos de tipo silvestre (Gallop *et al.*, Journal of Medicinal Chemistry 37: 1233-1251 (1994)).

Clasificación de fagos para generar mejora de afinidad

Los clones de fagos previamente identificados se sometieron a clasificación en placa para la primera ronda, seguido de cinco o seis rondas de clasificación de soluciones. Las bibliotecas se clasificaron frente a PD-L1-Fc humana y murina por separado (R&D Systems, cat. n.º 156-B7, cat. n.º 1019-B7, respectivamente). Para la diana PD-L1-Fc humana, en la primera ronda de clasificación en placa, se clasificaron tres bibliotecas frente a una placa (placa NUNC Maxisorp®) específica recubierta por separado con entrada de fagos aproximadamente 3 D.O./ml en BSA al 1 % y Tween 20 al 0,05 % durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de la primera ronda de clasificación en placa, se realizó la clasificación en solución para aumentar la rigurosidad de la selección. Para la clasificación en solución, se incubaron 1 D.O./ml de fagos propagados a partir de la primera ronda de clasificación en placa con proteína diana biotinilada 20 nM (la concentración se basa en el valor de CI_{50} del fago clon precursor) en 100 μ l de tampón que contenía Superblock al 1 % (Pierce Biotechnology) y Tween-20 al 0,05 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó 10 veces más con Superblock al 1 % y se aplicaron 100 μ l/pocillo a pocillos recubiertos con neutravidina (5 μ g/ml) durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación suave para que el fago diana biotinilado se uniera. Los pocillos se lavaron 10 veces con PBS-Tween-20 al 0,05 %. Para determinar la unión de fondo, los pocillos de control que contenían fagos con dianas que no estaban biotinilados se capturaron en placas recubiertas de neutravidina. El fago unido se eluyó con HCl 0,1 N durante 20 minutos, se neutralizó mediante un volumen 1/10 de Tris 1 M a un pH de 11, se tituló y propagó para la siguiente ronda. Seguidamente, se llevaron a cabo cinco rondas más de clasificación en solución junto con dos métodos para aumentar la rigurosidad de la selección. La primera de ellas es para la selección de la velocidad de asociación (*on-rate*) disminuyendo la concentración de proteína diana biotinilada de 4 nM a 0,5 nM, y la segunda es para la selección de la velocidad de disociación (*off-rate*) añadiendo cantidades excesivas de proteína diana no biotinilada (100~2000 veces más) para competir con los aglutinantes más débiles, ya sea a temperatura ambiente o a 37 °C. Además, la entrada de fagos se redujo (0,1 ~ 0,5 D.O./ml) para reducir la unión de fagos de fondo. Para la diana murina PD-L1-Fc, el método de clasificación de fagos es similar al descrito anteriormente para el antígeno Fc PD-L1 humano, con algunas modificaciones. Específicamente, para la selección en solución inmediatamente después de la primera ronda de selección en placa se utilizó PD-L1-Fc murino biotinilado 100 nM. En las cuatro rondas posteriores de selección en solución, la diana biotinilada se redujo de 10 nM a 1 nM, y se añadió un exceso de 200 a 500 veces de la diana no biotinilada a temperatura ambiente.

A continuación, los clones madurados por afinidad se examinaron adicionalmente con el procedimiento ELISA de exploración de afinidad de alto rendimiento descrito en el siguiente ejemplo.

ELISA de exploración de afinidad de alto rendimiento (competencia de un solo punto)

Se seleccionaron colonias de las exploraciones de la séptima y sexta ronda para la diana PD-L1 humana y murina, respectivamente. En una placa de 96 pocillos (Falcon) se cultivaron colonias durante la noche a 37 °C en 150 μ l/pocillo de medio 2YT con 50 μ g/ml de carbenicilina y 1E10/ml KO7. De la misma placa, se seleccionó como control una colonia de fagos precursores infectados con XL-1. Placas Nunc Maxisorp® de 96 pocillos se recubrieron con 100 μ l/pocillo de proteína PD-L1-Fc humana y murina (2 μ g/ml) por separado en PBS a 4 °C durante la noche o a temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas se bloquearon con 65 μ l de BSA al 1 % durante 30 minutos y 40 μ l de Tween 20 al 1 % durante otros 30 minutos.

El sobrenadante de fagos se diluyó 1:10 en tampón ELISA (enzimoimmunoanálisis de adsorción) (PBS con BSA al 0,5 %, Tween-20 al 0,05 %) con o sin proteína diana 10 nM en 100 μ l de volumen total y se incubó al menos 1 hora a temperatura ambiente en una placa F (NUNC). Se transfirieron 75 μ l de mezcla con o sin proteína diana, juntos, a las placas recubiertas con proteína diana. La placa se agitó suavemente durante 15 minutos para permitir la captura del fago no unido a la placa recubierta de proteína diana. La placa se lavó al menos cinco veces con PBS-Tween-20 al

0,05 %. La unión se cuantificó añadiendo anticuerpo anti-M13 conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) en tampón ELISA (1:5000) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS-Tween 20 al 0,05 % al menos cinco veces. Seguidamente, se añadieron 100 µl/pocillo de una proporción 1:1 de sustrato de peroxidasa de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y solución de peroxidasa B (H₂O₂) (Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)) al pocillo y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de ácido fosfórico 1 M (H₃PO₄) a cada pocillo y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. La DO (densidad óptica) del color amarillo en cada pocillo se determinó utilizando un lector de placas ELISA estándar a 450 nm. La reducción de la DO (%) se calculó mediante la siguiente ecuación.

$$(\%) \text{ de reducción de la } DO_{450\text{nm}} = [(DO_{450\text{nm}} \text{ de los pocillos con competidor}) / (DO_{450\text{nm}} \text{ de los pocillos sin competidor})] \times 100$$

En comparación con el (%) de reducción de la DO_{450nm} del pocillo del fago precursor (100 %), los clones que tenían un (%) de reducción de la DO_{450nm} inferior al 50 %, se escogieron para el análisis de secuencia de la diana tanto humana como murina. Para la preparación de fagos, se seleccionaron clones singulares para determinar la afinidad de unión (CI₅₀ del fago) contra PD-L-Fc tanto humana como murina en comparación con clones precursores.

Materiales

hPD-1-Fc, hPD-L1-Fc, hB7.1-Fc, mPD-1-Fc, mPD-L1-Fc y mB7.1, se adquirieron en R & D Systems. Utilizando técnicas convencionales, en Genentech, se generaron células 293 que expresaban hPD-L1. El anti-Fc de IgG humana de cabra F(ab')₂ se adquirió en los laboratorios Jackson ImmunoResearch.

Conjugación de proteínas

Las proteínas PD-1-Fc y B7.1-Fc se biotinilaron con EZ-Link sulfo-NHS-LC-LC-biotina (Pierce) durante 30 minutos a temperatura ambiente como describe el fabricante. El exceso de biotina que no reaccionó se eliminó con columnas Quick Spin de alta capacidad, G50-Sephadex (Roche) como describe el fabricante.

El anti-Fc de IgG humana de cabra F(ab')₂ se marcó con rutenio con MSD Sulfo-Etiqueta NHS-Ester (Meso Scale Discovery) como describe el fabricante y el exceso de Sulfo-Etiqueta que no reaccionó se eliminó con una columna Quick Spin de alta capacidad, G50-Sephadex.

Ensayo de unión celular EQL para probar anticuerpos de fagos

Mediante un ensayo de unión celular electroquimioluminiscente (EQL), se midieron las concentraciones de anticuerpo que daban como resultado una inhibición del 50 % (CI₅₀) de las células 293 que expresaban la unión de hPD-1-Fc a hPD-L1. Las células 293 con expresión de hPD-L1 se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se sembraron a razón de 25.000 células por pocillo en 25 µl de PBS en una placa de alta unión de 96 pocillos (Meso Scale Discovery). La placa se incubó a temperatura ambiente para permitir que las células se adhirieran a la superficie de carbono de la placa. Se añaden 25 µl de FBS al 30 % a cada pocillo y la placase incubó durante 30 minutos con agitación suave para bloquear los sitios de unión no específicos. La placa se lava tres veces con PBS en una lavadora de microplacas ELISA (ELx405 Select, Bio-Tek Instruments) en condiciones suaves de dispensación y aspiración. Se retira el exceso de PBS de los pocillos secando la placa en toallitas de papel. Se añaden 12,5 µl de 2 veces la concentración de anticuerpos a cada pocillo en FBS al 3 % en PBS (tampón de ensayo) y seguido de 12,5 µl de 4 µg/ml (2 veces la concentración) de hPD-1-biotina en tampón de ensayo y la placa se incubó durante una hora con agitación suave. La placa se lava 3 veces con PBS en una lavadora de microplacas y se seca en toallitas de papel. Se añaden 25 µl de 2 µg/ml de estreptavidina-rutenio (Meso Scale Discovery) y se incubó en tampón de ensayo a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación suave. Se lava 3 veces con PBS en una lavadora de microplacas y la placa se seca en toallitas de papel. Se añaden 150 µl de tampón de lectura MSD 1X sin tensioactivo (Meso Scale Discovery). La lectura de la luz luminiscente emitida a 620 nm se realiza en el lector Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery). Los valores de EQL se analizaron con las concentraciones de los anticuerpos de prueba utilizados en el ensayo, utilizando un ajuste de mínimos cuadrados no lineal de cuatro parámetros, para obtener los valores de CI₅₀ de cada competidor en el ensayo.

Resultados y análisis:

Se eligieron quince anticuerpos de fagos singulares derivados de YW243.55 que se unían a PD-L1 tanto humano como murino y se reformatearon en anticuerpos de IgG1 de longitud completa para una evaluación adicional. Las secuencias de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de estos anticuerpos se presentan en las Figuras 11A y B.

Mediante un ensayo de unión celular electroquimioluminiscente (EQL), se analizó la capacidad de los quince Ab reformateados para bloquear la unión de PD-1 a células 293 que expresan PD-L1 humano o de ratón. (Tabla 1 - mitad inferior: En la Tabla 1, el "Formato 1" describe la unión de PD-1-Fc humano soluble a células 293 transfectadas con PD-L1 humano; el "Formato 2" describe la unión de PD-1-Fc murino a células 293 transfectadas con PD-L1 murino, y

el "Formato 3" describe la unión de PD-1 humano a células 293 transfectadas con PD-L1 murino. Si bien los quince Ab con afinidad mejorada habían adquirido una reactividad cruzada significativa con PD-L1 de ratón, YW243.55S70 se seleccionó como el principal candidato a seguir debido a su capacidad para bloquear la unión de PD-L1 humano y de ratón a PD-1 (Tabla 1: valores de Cl_{50} de 49 pM y 22 pM, respectivamente).

5

Tabla 1

Clon	Formato 1	Formato 2	Formato 3
	hPD1-Fc-biotina/hPDL1-293 Cl_{50} en nM	mPD1-Fc-biotina/mPDL1-293 Cl_{50} en nM	hPD1-Fc-biotina/mPDL1-293 Cl_{50} en nM
YW251.11	8,6		
YW243.1	0,234		
YW243.55	0,099		>100
YW254.1	>100	0,795	
YW254.2	>100	3,76	
YW254.3	>100	>100	
YW254.4	1,73	15,6	
YW254.9	>100	0,224	
YW254.33	2,2	>100	
YW262.4	50	1,42	
YW262.5	90	25	
YW262.16	7,5	0,626	
YW262.64	0,256	100	
YW243.55.5	0,104		0,141
YW243.55.8	0,061		0,063
YW243.55.30	0,108		0,100
YW243.55.34	0,084		0,049
YW243.55.49	0,08		0,032
YW243.55.51	0,078		0,031
YW243.55.62	0,096		0,066
YW243.55.84	0,124		0,051
YW243.55.89	0,066		0,13
YW243.55.H12	0,103		0,156
YW243.55.H37	0,109		0,163
YW243.55.H70	0,084		0,042
YW243.55.S1	0,114		0,074
YW243.55.S37	0,100		0,024
YW243.55.S70	0,049		0,022

EJEMPLO 2

10 Caracterización de anticuerpos anti-PD-L1 (BIAcore)

Las afinidades de unión de los anticuerpos de fago anti-PD-L1, YW243.55 y YW243.55S70 contra PD-L1 recombinante de ser humano y de ratón, se midieron mediante resonancia de plasmón superficial (RPS) utilizando un instrumento BIAcore™-3000. PD-L1-Fc de ser humano recombinante (R&D Systems, cat. n.º 156-B7) y PD-L1-Fc de ratón recombinante (R&D Systems, cat. n.º 1019-B7), se recubrieron directamente en microplacas biodetectoras CM5 para lograr aproximadamente 500 unidades de respuesta (UR). Para las mediciones de cinética, se inyectaron diluciones en serie con factor 2 (de 3,9 nM a 500 nM) en tampón PBT (PBS con Tween-20 al 0,05 %) a 25 °C con un caudal de 30 µl/min. Las velocidades de asociación (k_{on}) y de disociación (k_{off}) se calcularon utilizando un modelo de unión de Langmuir unívoco sencillo (programa informático de evaluación BIAcore 3.2). La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calculó como la relación k_{off}/k_{on} .

20

Las afinidades de unión de los clones de anticuerpos del fago anti-PD-L1, YW243.55 y YW243.55.S70, medidas se indican a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2

Afinidades de unión de BIAcore						
Clon	Fc rhPD-L1 inmovilizado			Fc rmPD-L1 inmovilizado		
	$k_{on}/(1/Ms)$	$k_{off}/(1/s)$	$kD(M)$	$k_{on}/(1/Ms)$	$k_{off}/(1/s)$	$kD(M)$
YW243.55 (Fab)	$5,80 \times 10^5$	$7,30 \times 10^{-3}$	$1,26 \times 10^{-8}$	--	--	$> 1 \times 10^{-6}$
YW243.55 (IgG)	$2,70 \times 10^5$	$2,60 \times 10^{-4}$	$9,63 \times 10^{-10}$	$5,80 \times 10^4$	$9,20 \times 10^{-3}$	$1,59 \times 10^{-7}$
YW243.55.S70 (Fab)	$5,30 \times 10^5$	$1,00 \times 10^{-4}$	$1,89 \times 10^{-10}$	$4,80 \times 10^5$	$1,40 \times 10^{-3}$	$2,92 \times 10^{-9}$
YW243.55.S70 (IgG)	$3,90 \times 10^5$	$6,30 \times 10^{-5}$	$1,62 \times 10^{-10}$	$2,80 \times 10^5$	$1,80 \times 10^{-4}$	$6,43 \times 10^{-10}$

EJEMPLO 3A

- 5 Especificidad de los Ab anti-PD-L1 por PD-L1 de ser humano, macaco de la india y ratón - FACS y ensayo de unión celular con radioligando Este ejemplo muestra la especificidad del anticuerpo anti-PD-L1 de la invención por PD-L1 de ser humano, macaco de la india y ratón.

10 Además, muestra la afinidad del Ab por PD-L1 de ser humano y de ratón expresado en la membrana celular en células 293 transfectadas.

PD-L1 de ser humano y de ratón se transfectaron de manera estable en células 293. Para los estudios de unión, las células se recogieron y se sembraron en placas de 150.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos.

- 15 La sangre de macaco de la india se obtuvo en la Fundación del Suroeste para la Investigación Biomédica (San Antonio, Tejas). La sangre se diluyó con un mismo volumen de PBS y se cubrió con Ficoll-Paque al 96 % (GE Healthcare) para la separación de las células mononucleares. Utilizando tampón de lisis de eritrocitos (Qiagen), las células mononucleares se lisaron de glóbulos rojos y se cultivaron durante la noche a $1,5 \times 10^6$ células/ml con PMA 5 ng/ml más ionomicina 1 μM en placas de 6 pocillos. El medio de cultivo era RPMI 1640 con suero bovino fetal al 10 %, HEPES 20 μM y diluciones 1:100 de los siguientes complementos de Gibco: Gluta-MAX, piruvato de sodio,
- 20 penicilina/estreptomina y aminoácidos no esenciales. Las células se recogieron al día siguiente y se distribuyeron en alícuotas en una placa de 96 pocillos para los estudios de unión (aproximadamente 120.000 células por pocillo).

- 25 El anticuerpo PD-L1 YW243.55.S70 o Herceptin® el control de anticuerpo, se tituló comenzando con 10 $\mu g/ml$, en diluciones en serie de factor 3 y se unieron a las células en volúmenes de 50 μl durante 25 minutos en hielo. Las células se lavaron y después se unieron con anti-IgG de ser humano PE (Caltag) a 20 $\mu g/ml$ durante 25 minutos en hielo. Las células de macaco de la india también se tiñeron conjuntamente con CD3 FITC y CD4 APC (BD Biosciences) para diferenciar las células T CD4+.

- 30 Todas las muestras se procesaron en un FACSCalibur de Beckman Dickinson y utilizando el programa informático Tree Star. Inc. FlowJo® se analizó la intensidad de fluorescencia media de los datos de unión de PD-L1 como una función de la concentración de anticuerpos anti-PD-L1; Los valores de CE_{50} (concentración de Ab asociada a la unión semimáxima) se calcularon utilizando Kaleidagraph. Además, se realizaron estudios de unión en equilibrio para definir afinidades (Kd) exactas de la unión de YW24355S70 a PD-L1 de ser humano y de ratón expresada en células 293
- 35 (Ejemplo 3B). Estos resultados se resumen a continuación en la Tabla 3:

Tabla 3

Resumen CE_{50}		
Especie	CE_{50} (nm) FACS	Kd (nM) unión de radioligando en equilibrio
Ser humano	0,4	0,4
Macaco de la India	0,3	
Ratón	0,3	0,13
Rata	0,8	

EJEMPLO 3B

- 40 Medición de la afinidad de los Ab anti-PD-L1 por PD-L1 de ser humano y ratón - Ensayo de unión celular con radioligando de unión en equilibrio

Se cultivaron células 293 transfectadas con PD-L1 de ser humano o de ratón en medio de crecimiento, que consistía en medio RPMI 1640 complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 %, L-glutamina 2 mM, penicilina-estreptomicina 1X, a 37 °C en CO₂ al 5 %. Las células se lavaron con tampón de unión (DMEM/F12 50:50 con FBS al 2 % y Hepes 50 mM, pH 7,2) y se colocaron en placas de 96 pocillos a aproximadamente 230.000 células en 0,2 ml de tampón de unión. El anticuerpo anti-PD-L1, YW243.55.S70.hlgG, se marcó con yodo utilizando el método Iodogen. Los anticuerpos anti-PD-L1 radiomarcados se purificaron a partir de ¹²⁵I-NA libre mediante filtración en gel utilizando una columna NAP-5; el Ab purificado tenía una actividad específica de 17,41 µCi/µg. En placas de 96 pocillos se colocaron mezclas de reacción de competencia de un volumen de 50 µl que contenían una concentración fija de anticuerpo yodado y concentraciones decrecientes de anticuerpo no marcado diluido en serie. Las líneas celulares transfectantes estables 293 que expresaban PD-L1 de ser humano y PD-L1 murino, se cultivaron en medio de crecimiento, que consistía en medio DMEM/F12 50:50 complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 %, L-glutamina 2 mM, 1× penicilina-estreptomicina, a 37 °C en CO₂ al 5 %. Las células se lavaron con tampón de unión (DMEM/F12 50:50 con FBS al 2 %, HEPES 50 mM, pH 7,2 y azida sódica 2 mM) y se añadieron a una densidad aproximada de 200.000 células en 0,2 ml de tampón de unión a los 50 µl de las mezclas de reacción de competencia. La concentración final del anticuerpo yodado en cada reacción de competencia con células fue de ~150 pM (~120.000 cpm por 0,25 ml) y la concentración final del anticuerpo no marcado en la reacción de competencia con células varió, comenzando a 500 nM y después disminuyendo 2 veces para 10 concentraciones. Las reacciones de competencia con células se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. La reacción de competencia con células para cada concentración de anticuerpo no marcado se analizó por triplicado. Después de 2 horas de incubación, las reacciones de competencia se transfirieron a una placa de filtro Millipore Multiscreen y se lavó 4 veces con tampón de unión para separar el anticuerpo yodado libre del unido. Los filtros se contaron en un contador gamma Wallac Wizard 1470 (PerkinElmer Life y Analytical Sciences Inc. Wellesley, MA). Los datos de unión se evaluaron utilizando el programa informático NewLigand (Genentech), que utiliza el algoritmo de ajuste de Munson y Robard para determinar la afinidad de unión del anticuerpo. Musson *et al.*, Anal. Biochem. 107: 220-39 (1980).

Los valores de K_d determinados mediante análisis de Scatchard corroboran los valores de CE₅₀ de la unión del anticuerpo anti-PD-L1 a PD-L1 de ser humano y de ratón como se muestra en la Tabla 3.

EJEMPLO 4

Selectividad y afinidad de los Ab anti-PD-L1 (CI₅₀)

Este ejemplo muestra la selectividad y afinidad de unión (como CI₅₀) de ensayo utilizado para evaluar los anticuerpos anti-PD-L1 de longitud completa de la presente invención en cuanto a su capacidad para bloquear la unión de PD-L1 tanto a PD-1 como a B7.1.

Métodos:

Unión de hB7.1-Fc-biotina y hPD-1-Fc-biotina a hPD-L1-Fc mediante ensayo ELISA (Formato 4):

Se recubrió una placa de 384 pocillos Nunc Maxisorp con 25 µl de hPD-L1-Fc 250 ng/ml en PBS durante la noche. Los pocillos se lavaron tres veces en PBS (tampón de lavado) con Tween al 0,05 % en una lavadora de microplacas y se bloquearon en PBS con BSA al 0,5 %. Se añadieron 12,5 µl de 2× la concentración de anticuerpos a cada pocillo en Tween al 0,05 %, BSA al 0,5 % en PBS (diluyente de ensayo) y seguido de 12,5 µl de 250 ng/ml (concentración 2X) de hB7.1-Fc-biotina en diluyente de ensayo y la placa se incubó durante una hora y media con agitación. Los pocillos se lavaron seis veces con tampón de lavado y se añadieron 25 µl de estreptavidina-HRP (1:40.000 en diluyente de ensayo, GE Healthcare). La placa se incubó durante 30 minutos con agitación y los pocillos se lavaron seis veces con tampón de lavado. Durante una hora se añadieron 25 µl de sustrato TMB (Laboratorios Kirkegaard y Perry) y la reacción se detuvo con 25 µl de ácido fosfórico 1 M. La absorbancia se lee a 450 nm y se analizan los valores de CI₅₀ como se describe en el ensayo de unión celular EQL en el Ejemplo 1.

Formatos 5, 6, 7:

Para la unión de hPD-1-Fc-biotina a hPD-L1-Fc (Formato 5), el formato es similar al del ensayo anterior excepto que para la unión se utilizó hPD-1-Fc-biotina en lugar de hB7.1-Fc-biotina. El tiempo de reacción del sustrato TMB fue de 17 minutos.

Para la unión de mB7.1-Fc-biotina a mPD-L1-Fc (Formato 6), el formato es similar al Formato 5, excepto que se utilizó mPD-L1-Fc para recubrir la placa en lugar de hPD-L1-Fc y se utilizó mB7.1-Fc-biotina para la unión en lugar de hB7.1-Fc-biotina. El tiempo de reacción del sustrato TMB fue de 7 minutos.

Para la unión de mPD-1-Fc-biotina a mPD-L1-Fc (Formato 7), el formato es similar al del ELISA de ratón mencionado anteriormente excepto que se utilizó mPD-1-Fc-biotina para la unión en lugar de mB7.1-Fc-biotina. El tiempo de reacción del sustrato TMB fue de 5 minutos.

Resultados:

5 En la Tabla 4 se muestra la evaluación de la CI_{50} del anticuerpo anti-PD-L1 de fago madurado por afinidad YW243.55.S70 para bloquear las interacciones entre los pares de unión indicados. YW243.55S70 pudo bloquear la unión de PD-L1 de ser humano a hB7.1 Fc con una concentración inhibitoria semimáxima de 38 pM, una concentración relativamente comparable a la de su valor de CI_{50} para bloquear la interacción PD-L1/PD-1 (42 pM). Los estudios de Biacore que midieron la capacidad de YW243.55S70 para bloquear ambas interacciones de PD-L1 con PD-1 y B7.1 estaban en consonancia con estos resultados de ELISA (datos no mostrados).

Tabla 4

Anticuerpo	Formato 4	Formato 5	Formato 6	Formato 7
	hB7.1-biotina/hPD-L1 CI_{50} en pM	hPD-1-biotina/hPD-L1 CI_{50} en pM	mB7.1-biotina/mPD-L1 CI_{50} en pM	mPD-1-biotina/mPD-L1 CI_{50} en pM
YW243.55.S70	38	42	29	48

10

EJEMPLO 5

15 Ensayo *in vitro* PMEL/B16 de la mejora de la actividad de las células T CD4+ y CD8+ *in vitro* por el anticuerpo anti-PD-L1, YW243.55.S70

15

Este ejemplo muestra el efecto de los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención sobre la activación de células T CD8+ transgénicas con receptor de células T PMEL, medido por la mejora de la producción de γ -IFN en respuesta al péptido melanocitario, gp100. En este procedimiento, células T CD8+ se obtienen a partir de ratones transgénicos PMEL TCR cuyas células T CD8+ expresan un TCR específico para el péptido gp100. Después de la purificación de las células T CD8+, se realizan múltiples rondas de estimulación para generar y expandir las células T CD8+ activadas, que después, a su vez, regularán positivamente la expresión de PD-1. En paralelo, células de melanoma B16 se tratan con IFN- γ para regular positivamente su expresión de PD-L1. Después, las células se cultivan conjuntamente en presencia de anticuerpo anti-PD-L1 y se evalúa el efecto sobre la producción de IFN- γ . Se eligieron células B16 para la estimulación terciaria porque expresan endógenamente niveles bajos de péptido gp100 (a diferencia de la aplicación exógena del péptido). Así mismo, como estas células tampoco expresan PD-L2, B7.1 ni B7.2, el efecto de la señalización adicional no relacionada con PD-L1 (p. ej., la señalización a través de CD28 o CTLA-4 o la señalización inducida por PD-L2 a través de PD-1) se minimiza.

20

25

30 Ensayo PMEL:

30

Como se muestra en la Figura 3, los anticuerpos anti-PD-L1 mejoran tanto el porcentaje de células T CD8+ PMEL productoras de IFN- γ como los niveles promedio de IFN- γ producidos en respuesta a las cantidades de péptido gp100 indicadas.

35

Ensayo *in vitro* de D.011.10:

40

Un ensayo similar que utiliza células T CD4+ TCR Tg específicas de Ova, muestra una proliferación mejorada de células T en presencia del Ab anti-PD-L1 después de estimulación previa con el péptido Ova para inducir la expresión de PD-1 (Fig. 4). En la estimulación final, para presentar las concentraciones de péptido Ova indicadas a las células T DO.11.10, se utilizaron células B A20 irradiadas que expresaban PD-L1. Perceptiblemente, la contribución del eje PD-1/PD-L1 es más pronunciada a grados más bajos de estimulación del receptor de antígeno, niveles que reflejan más fielmente la magnitud fisiológicamente pertinente de la estimulación.

45

Materiales y métodos:

Ensayo PMEL

Estimulación primaria (día 0-4)

50

Se extrajeron el bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos de ratones transgénicos con receptor de células T PMEL. Los órganos se trituraron en suspensiones unicelulares y los glóbulos rojos se sometieron a lisis. Las células T CD8+ se aislaron utilizando el kit de aislamiento de células T CD8+ y el separador celular AutoMACS (Miltenyi Biotec) según las instrucciones del fabricante.

55

Se aisló el bazo de un ratón no transgénico del mismo sexo y se trituró en una suspensión unicelular y los glóbulos rojos se sometieron a lisis. Las células se pulsaron con 0,1 μ g/ml de péptido gp100 durante dos horas a 37 °C y se lavaron.

Durante 4 días, las células se cocultivaron en una placa de fondo plano de 96 pocillos con 200.000 células T CD8+

PMEL y 75.000 esplenocitos pulsados con gp100. El medio de cultivo era medio de Dulbecco modificado de Iscove + suero bovino fetal al 10 % + HEPES 20 μ M y diluciones 1:100 de los siguientes complementos de Gibco: Gluta-MAX, piruvato de sodio, penicilina/estreptomicina y aminoácidos no esenciales.

5 Estimulación secundaria (día 4-7)

Los cultivos de PMEL se centrifugaron y los medios se aspiraron utilizando una pipeta multicanal. Se añadió medio reciente y se mezcló para lavar las células, seguido de otro centrifugado. Se eliminó gran parte del medio y se añadieron los anticuerpos (Herceptin®, YW243.55.S70, o ninguno) para una concentración final de 10 μ g/ml. Se establecieron condiciones en pocillos duplicados de modo que la producción promedio de IFN- γ pudiera evaluarse al criterio de valoración.

10 Durante 2 horas, células DC-1 se pulsaron con 0,1 μ g/ml de péptido gp100 a 37 °C y se lavaron. Se añadieron células DC-1 pulsadas con gp100 a cultivos PMEL lavados a razón de 40.000 células/pocillo. Durante 3 días PMEL y los anticuerpos DC-1 + se cultivaron conjuntamente.

15 Tercera estimulación (día 7-8)

Un día antes de la tercera estimulación el día 6, se incubaron células de melanoma B16 con 20 ng/ml de IFN- γ de ratón (R&D Systems) durante la noche para regular positivamente su expresión de PD-L1.

El día 7, los cultivos de PMEL se centrifugaron y los medios se aspiraron utilizando una pipeta multicanal. Se añadió medio reciente y se mezcló, seguido de otro centrifugado. Se eliminó gran parte del medio y se añadieron los anticuerpos para una concentración final de 10 μ g/ml.

25 Después de la estimulación nocturna con IFN- γ , las células B16 se lavaron y se dividieron en tres grupos para una incubación de dos horas sin gp100, gp100 a 1 ng/ml (gp100 bajo) y gp100 a 10 ng/ml (gp100 alto). Las células se lavaron y después se añadieron a los cultivos de PMEL + Ab lavados a razón de 40.000 células por pocillo y se incubaron durante la noche.

30 Día 8 Tinción intracelular de IFN- γ

Se añadió Golgi-Plug (BD Biosciences) durante las 5 últimas horas de cultivo según las instrucciones del fabricante. La tinción intracelular de IFN- γ se realizó utilizando el kit de solución de fijación/permeabilización Cytfix/Cytoperm de BD Biosciences, según las instrucciones del fabricante y todos los anticuerpos de tinción también eran de BD Biosciences. La superficie de las células se tiñó con PE para CD8a y FITC para Thy1.1 y se tiñeron intracelularmente con APC para IFN- γ a concentraciones de saturación.

40 Todas las muestras se procesaron en un FACSCalibur de Beckman Dickinson y los datos se analizaron utilizando el programa informático Tree Star, Inc. FLOWJO™.

Ensayo in vitro con D011.10

45 Se extrajeron el bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos de ratones transgénicos DO11.10, se trituraron en suspensiones unicelulares y los glóbulos rojos se sometieron a lisis. Las células se cultivaron durante 72 horas a una densidad de 1×10^6 células por ml en placas de 6 pocillos con péptido Ova a 0,3 μ M. El medio de cultivo era RPMI 1640 + suero bovino fetal al 10 % + HEPES 20 μ M y diluciones 1:100 de los siguientes complementos de Gibco: Gluta-MAX, piruvato de sodio, penicilina/estreptomicina y aminoácidos no esenciales.

50 Después de la estimulación primaria, las células se recogieron y purificaron para obtener células T CD4⁺ utilizando un kit de purificación de células T CD4 de ratón según las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec). Después, las células T CD4⁺ purificadas se dejaron reposar durante la noche.

55 Al día siguiente, las células se recogieron, se lavaron y se cultivaron conjuntamente con células A20 irradiadas (10.000 rads). El cocultivo se estableció en placas de fondo en U de 96 pocillos en pocillos por triplicado, con 50.000 células T CD4⁺ a 40.000 células A20 con péptido Ova titulado y anticuerpo a una concentración final de 20 μ g/ml. Después de 48 horas, los cultivos se pulsaron durante la noche con 1 μ Ci/pocillo de 3H-timidina y se congelaron al día siguiente. Posteriormente las placas se descongelaron, las células se recogieron con un recogedor celular y en un contador beta se efectuó la lectura.

60 EJEMPLO 6

Proliferación mejorada de células T CD8⁺ humanas en una reacción linfocitaria mixta mediante Anti-PD-L1

65 La Figura 5 demuestra la capacidad del anti-PD-L1 (p. ej., YW243.55.S1) para mejorar la proliferación de células T CD8 humanas en respuesta a células de un donante no compatible con MHC. Las células T CD8⁺ que respondieron

se enriquecieron a partir de sangre completa del donante A utilizando primero RosetteSep® de células T CD8+ (StemCell Technologies) según las instrucciones del fabricante. Después, las células se diluyeron con un mismo volumen de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se separaron mediante centrifugación en gradiente cubriendo con Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). Después de la separación, las células se tiñeron con APC CD8 (BD Biosciences) y se descubrió que el 78 % eran células T CD8+. Las células se marcaron con fluorescencia con el colorante indicador CFSE (Molecular Probes) 2,5 µM.

Para actuar como células presentadoras de antígenos (APC) alogénicas, las células mononucleares se aislaron primero de sangre completa del donante B y después se agotaron las células T CD3+. La sangre se diluyó con un mismo volumen de PBS y las células mononucleares se aislaron después de una centrifugación en gradiente sobre Ficoll. Las células se tiñeron con FITC para CD3 (BD Biosciences), se lavaron y después se incubaron con microperlas anti-FITC (Miltenyi Biotec). A continuación, las células CD3 positivas para FITC se agotaron en el separador de células AutoMACS (Miltenyi Biotec). Después, las células se irradiaron con 2500 rads en un irradiador de cesio.

Las células se cultivaron conjuntamente en una placa de fondo plano de 96 pocillos con 150.000 células T CD8+ y 150.000 APC durante 5 días con anticuerpos a 10 µg/ml. El medio de cultivo era RPMI 1640 + suero bovino fetal al 10 % + HEPES 20 µM y diluciones 1:100 de los siguientes complementos de Gibco: Gluta-MAX, piruvato de sodio, penicilina/estreptomicina y aminoácidos no esenciales.

El día 5, las células se recogieron, se lavaron y se tiñeron con CD8-biotina seguido de estreptavidina-PerCp (BD Biosciences). Las muestras se procesaron en un FACSCalibur de Beckman Dickinson y los datos se analizaron utilizando el programa informático Tree Star, Inc. FlowJo.

En presencia del anti-PD-L1, se observó una mejora de aproximadamente un 45 % en la proliferación de células T CD8 que responden a células de un donante no compatible con MHC.

EJEMPLO 7

Efectos del bloqueo de PD-L1 sobre el modelo *in vivo* del LCMV

Se ha demostrado que, en condiciones de estimulación crónica, las células T regulan positivamente la expresión del receptor inhibitor PD-1 y mantienen su expresión. El ligamiento de PD-1 por cualquiera de sus dos ligandos, PD-L1 y PD-L2, contribuye al estado resistente de las células T crónicamente activadas, atenuando su respuesta contra a su antígeno afín. En ratones infectados persistentemente con el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV, *lymphocytic choriomeningitis virus*), el bloqueo de PD-1 o de su ligando PD-L1, es suficiente para revitalizar las células T crónicamente resistentes, mejorar la magnitud y la calidad funcional de la respuesta de las células T antivirales. De manera similar, los seres humanos infectados crónicamente con el VIH o el VHC, muestran células T resistentes a la simulación cuya actividad puede mejorarse *in vitro* a través del bloqueo de PD-1 o PD-L1. Por lo tanto, la actividad del bloqueo de PD-L1 en el modelo del LCMV sugiere un potencial terapéutico para mejorar la inmunidad antivírica y antitumoral.

Para los experimentos *in vivo* del LCMV en el ratón, se procedió a reformatear el anticuerpo anti-PD-L1 humanizado (YW243.55S70), clonando las secuencias de la región variable de las cadenas pesada y ligera derivadas de fagos en dirección 5' de los dominios constantes de la cadena pesada de IgG2a de ratón y de la cadena ligera kappa de ratón. Para impedir la citotoxicidad mediada por anticuerpos de las células que expresan PD-L1, al inhibir la unión del receptor Fcγ, las posiciones 265 (ácido aspártico) y 297 (asparagina) se cambiaron a alanina (DANA). Shields, RL et al J. Biol Chem 2001 276 (9): 6591-6604. Para probar la capacidad del anticuerpo anti-PD-L1 para mejorar la inmunidad antivírica en una infección crónica, los ratones se infectaron el día 0 con 2×10^6 unidades formadoras de placa (ufp) del clon 13 del LCMV o de la cepa Armstrong de LCMV como control de referencia. El esquema del diseño experimental se muestra en la Figura 6. La infección con el Clon 13 produce una infección crónica, caracterizada por células T que se expanden pero no pueden eliminar eficazmente el virus, mientras que la cepa Armstrong del LCMV desaparece al cabo de 8-10 días posteriores a la infección. El día 14, los ratones comenzaron el tratamiento con anti-PD-L1 o mIgG de control suministrado a dosis de 10 mg/kg 3 veces por semana. Los días 21 y 28, se realizaron análisis de la función de las células T CD8 y de los títulos víricos en sangre y tejidos.

En consonancia con los datos publicados de Barber et. al., Nature 439:682-7 (2006), este ejemplo muestra la capacidad del Ab anti-PD-L1 para mejorar la respuesta de los linfocitos citotóxicos al LCMV después de un régimen de tratamiento de 2 semanas en una infección crónica por LCMV. La Figura 7A muestra el % de células T CD8 que expresan CD107a en su superficie celular en respuesta al péptido gp33, específico del LCMV. La expresión de CD107a en la membrana plasmática, que normalmente se expresa intracelularmente, viene acompañada del proceso de desgranulación y, por lo tanto, sirve como marcador indirecto de la desgranulación. En relación con la respuesta de las células procedentes de la infección de corta duración por la cepa Armstrong del LCMV, las células de animales infectados con la cepa crónica, clon 13, tienen alterada la desgranulación (grupo de Ig de control), mientras que el bloqueo de PD-L1 pudo restaurar la desgranulación de CD8+ a niveles comparables a los observados en la infección por la cepa Armstrong. De manera similar, 7B demuestra el aumento del % de células T CD8 productoras de IFN-γ en respuesta a gp33 del LCMV en el grupo tratado con anti-PD-L1 en relación con la Ig de control.

Seguidamente, se probó el impacto del Ab anti-PD-L1 sobre la reducción o erradicación del virus LCMV en sangre y tejidos. En la Figura 8A, los gráficos muestran títulos logarítmicos de virus en el tejido indicado de los animales tratados con Ig de control y PD-L1 los días 21 y 28 después de la infección con el clon 13 del LCMV. El tratamiento con anticuerpos comenzó el día 14 después de la infección. El bloqueo de PD-L1 produjo una reducción sumamente significativa de los títulos víricos en sangre, hígado, cerebro, pulmón y riñón. Sorprendentemente, en 3 de 5 ratones, el Ab α -PD-L1 redujo los títulos del LCMV en sangre a niveles por debajo de la detección ($<1 \times 10^{-5}$). En un experimento posterior de diseño comparable, se observó erradicación del virus en sangre e hígado en 5 de 5 ratones tratados durante 2 semanas con anti-PD-L1 a dosis de 10 mg/kg o 2 mg/kg 3 veces por semana (datos no mostrados). El gráfico inferior muestra la cinética de reducción de los títulos de virus en la sangre y demuestra una reducción promedio del 96,8 % en el grupo tratado con anti-PD-L1 el día 28 en relación con el control. Estos datos corroboran la importancia de la vía PD-1/PD-L1 en cuanto a la inhibición de las respuestas de las células T en infecciones crónicas y están en consonancia con los efectos del bloqueo *in vitro* de PD-L1 en células T que se obtienen de seres humanos con infecciones crónicas tales como la hepatitis C y el VIH.

Materiales y métodos:

Determinación del % de Producción de IFN-gamma por células T CD8 en respuesta al péptido gp33 del LCMV

Se aislaron bazos de ratones infectados y se generó una suspensión unicelular triturando los órganos en medio completo: IMDM (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) que contiene suero bovino fetal al 10 % termoinactivado, L-glutamina 2 mM, Penicilina/Estreptomicina 100 U/ml y 2-mercaptoetanol 10 mM. Los glóbulos rojos se sometieron a lisis utilizando tampón de lisis ACK (NH_4Cl , 0,15 M, KHCO_3 10 mM, EDTA 0,1 mM). Para medir las respuestas de las células T CD8 específicas de antígeno, los esplenocitos se lavaron en medio completo y se reestimularon *in vitro* durante 4 horas con el péptido GP33 del LCMV (KAVYNFATC, ProImmune Inc., Bradenton, FL). En placas de fondo plano de 96 pocillos, se cultivaron 1×10^6 esplenocitos con 100 ng/ml de péptido GP33 en presencia de 100 unidades/ml de interleucina-2 humana (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 1 $\mu\text{l/ml}$ de brefeldina A y 1 $\mu\text{l/ml}$ (dilución 1:1000) de monensina (BD Pharmingen) y FITC anti-CD107a (clon ID4B, BD Biosciences, San José, CA). Después de la incubación, las células se lavaron una vez en PBS que contenía suero bovino fetal al 2 % y los marcadores de la superficie celular se tñeron con anticuerpos conjugados con fluorocromo: anti-CD8 APC (clon 53.67, BD Biosciences, San José, CA) anti-CD4 PerCp-Cy5.5 (clon RM4-5, BD Biosciences, San José, CA) y PE anti-PD-1 (clon J43, BD Biosciences, San José, CA). La tinción de IFN- γ intracelular se realizó utilizando el kit Cytofix Cytoperm Plus (BD Biosciences, San José, CA) según las instrucciones del fabricante utilizando anti-IFN- γ PE-Cy7 (clon XMG1.2, eBioscience Inc. San Diego, CA). Para detectar la cantidad de células T CD8 específicas de GP33, esplenocitos recientes se tñeron con pentámeros GP33 (H2-Db ligado a APC, ProImmune Inc., Bradenton, FL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos se recopilaron utilizando un BD FACSAria (BD Biosciences, San José, CA) y se analizaron con el programa informático FlowJo (Tree Star Inc. Ashland OR).

Determinación de títulos víricos del LCMV:

Células de fibrosarcoma MC57 se infectan con diluciones en serie de factor 10 de homogeneizado de sangre o tejido que contiene LCMV en IMDM completo. Después, en una incubadora de cultivo tisular, la reacción se incuba durante 2 a 6 horas a 37 °C, a continuación se cubre con DMEM que contiene metilcelulosa al 1 %. A esto le sigue una incubación durante 3-5 días, y después, se elimina la capa de metilcelulosa mediante aspiración. Las células se fijan con PBS/paraformaldehído al 4 %, después se permeabilizan con Triton-x al 0,5 % durante 20 minutos, se lavan en PBS, y se bloquean en FCS al 10 % durante 1 hora con suave balanceo. La tinción para detectar el LCMV se realiza con anticuerpo VL4 (1 hora), se lava 2 veces, y después se revela con HRP anti-rata (1:400) en tampón de bloqueo. A continuación se lava 3 veces, se añade sustrato de o-fenilendiamina (SIGMA P8806-50TAB 3 mg/comprimido) a los pocillos para el revelado.

EJEMPLO 8

Bloqueo de PD-L1 en el cáncer

Ahora es evidente que muchos tumores aprovechan la expresión de los ligandos PD-1 como medio para atenuar las respuestas de las células T antitumorales. Se han caracterizado varios cánceres humanos por expresar niveles elevados de PD-L1 tanto en tumores como en leucocitos infiltrantes de tumores y esta expresión elevada de PD-L1 a menudo se asocia a un mal pronóstico. Los modelos de tumores de ratón demuestran aumentos similares en la expresión de PD-L1 dentro de los tumores y demuestran un papel de la vía PD-1/PD-L1 en la inhibición de la inmunidad tumoral.

Aquí presentamos un experimento que demuestra el impacto del bloqueo de PD-L1 en el crecimiento de tumores ortotópicos de células de carcinoma colorrectal murino MC38. Ova en ratones C57B6 singénicos (Figura 9A). Estas células expresan ovoalbúmina mediante transducción retroviral y expresan PD-L1, aunque no PD-L2, en su superficie celular según lo evaluado mediante citometría de flujo (histograma - Figura 10A). El día 0, se inocularon ratones por vía subcutánea con 0,5 millones de células MC38.Ova. El día 1 o el día 14 (cuando los tumores habían alcanzado un

tamaño promedio de 250 mm³) 10 ratones/grupo se trataron con 10 mg/kg de anti-PD-L1 (YW243.55S70-IgG2a de ratón-DANA), Ig de control o Ab anti-CTLA4 bloqueante, (UC10-4F10-11) 3 veces por semana durante todo el estudio. El bloqueo de PD-L1, ya sea en una intervención temprana o tardía, es sumamente eficaz como terapia con un solo agente para prevenir el crecimiento tumoral. Por el contrario, el bloqueo de CTLA4, otra molécula inhibidora expresada en células T, no mostró pruebas de inhibir el crecimiento tumoral. Estos resultados demuestran el papel singular del eje PD-1/PD-L1 sobre CTLA4/B7 en la supresión de la respuesta inmunitaria antitumoral y corroboran la posibilidad del tratamiento de cánceres humanos con anticuerpos que bloquean la interacción de PD-L1 con PD-1 y B7.1.

Modelo de tumor singénico MC38.Ova: Métodos. El día 0, se inocularon por vía subcutánea 70 animales con 0,5 millones de células MC38.Ova en 100 microlitros de HBSS + matrigel. A partir del D1, se incluyeron 20 ratones en uno de los 2 grupos de tratamiento (véase más adelante: grupo 1 o grupo 2). A los 40 ratones restantes se les permitió desarrollar tumores hasta el día 14. De estos 40 ratones, 30 con tumores de tamaño similar, se incluyeron en uno de los 3 grupos de tratamiento (Grupos 3-5). Se midieron los tumores y los ratones pesaron 2 veces por semana. Los ratones no incluidos en los siguientes grupos de tratamiento, debido a un volumen tumoral diferente, se sacrificaron:

Grupo 1: anticuerpo anti-gp120, 10 mg/kg IP, 100 µl, D1, 3 veces/semana
 Grupo 2: anticuerpo anti-PD-L1, 10 mg/kg IP, 100 µl, D1, 3 veces/semana
 Grupo 3: anticuerpo anti-gp120, 10 mg/kg IP, 100 µl, D14, 3 veces/semana
 Grupo 4: anticuerpo anti-PD-L1, 10 mg/kg IP, 100 µl, D14, 3 veces/semana
 Grupo 5: anticuerpo anti-CTLA-4, 10 mg/kg IP, 100 µl, D14, 3 veces/semana

Los grupos 1 y 2 iniciaron la dosificación el D1; los grupos 3, 4 y 5 el D14.

EJEMPLO 9

Combinaciones de anti-PD-L1 con otros agentes para proporcionar un efecto antitumoral o terapia de mejora inmunitaria - modelo MC38.Ova

El día 0, se inoculan 150 animales por vía subcutánea con 0,5 millones de células MC38.Ova en 100 microlitros de HBSS + matrigel. Se permite que los ratones desarrollen los tumores. Los ratones se pesan y miden 2 veces por semana hasta el día 11 (cuando el volumen del tumor está entre 100 y 200 mm³). El día 11, después de la medición del tumor, los ratones se incluyen en 1 de los 12 grupos de tratamiento indicados más adelante. Los ratones que se no incluyen en los grupos de tratamiento indicados más adelante, se debe a un volumen tumoral diferente y se sacrifican. El tratamiento con gemcitabina (Grupo 4) comienza el día 12, mientras que el tratamiento para los grupos de anticuerpos restantes comienza el día 14. Todos los volúmenes son de 100 µl en vehículo inerte, con detalles adicionales como se indica a continuación:

Grupo 1: anticuerpo anti-gp120, 10 mg/kg IP, 100 µl, 3 veces/semana × 5, n=10
 Grupo 2: anticuerpo anti-PD-L1, 10 mg/kg IP, 100 µl, 3 veces/semana × 5, n=10
 Grupo 3: anticuerpo anti-VEGF, 5 mg/kg IP, 100 µl, 2 veces/semana × 5, n=10
 Grupo 4: Gemcitabina, 40 mg/kg IP, 100 µl, Día 12, 16, 20, n=10
 Grupo 5: anticuerpo anti-PD-L1 + anticuerpo anti-gp120, n=10
 Grupo 6: anticuerpo anti-PD-L1 + anticuerpo anti-VEGF, n=10
 Grupo 7: anticuerpo anti-PD-L1 + Gemcitabina, n=10
 Grupo 8: anticuerpo anti-gp120 + Gemcitabina, n=10
 Grupo 9: anticuerpo anti-gp120 + anti-VEGF, n=10

Día 12: Para el análisis del hemograma completo (CBC, *complete blood count*), por vía retroorbital y con anestesia, se extrae sangre (100 microlitros) de los ratones del grupo 1.
 Días 14 y 22: Para el análisis del hemograma completo, por vía retroorbital y con anestesia, se extrae sangre (100 microlitros) de los ratones del grupo 4.
 Día 19: Para el análisis del hemograma completo, por vía retroorbital y con anestesia, se extrae sangre (100 microlitros) de todos los ratones, salvo de los del grupo 4.
 Día 26: Para el análisis FC (farmacocinético), por vía retroorbital y con anestesia, se extrae sangre (100 microlitros) de todos los ratones, salvo de los del grupo 4.

Los tumores se miden y los ratones se pesan 2 veces por semana. Los animales que tengan una pérdida de peso >15 % se pesarán diariamente y si pierden >20 % de peso corporal se sacrificarán. Los ratones se sacrificarán cuando los volúmenes tumorales superen los 3.000 mm³, o al cabo de 3 meses si no se forman tumores.

Este estudio muestra (Figura 10) que el bloqueo de PD-L1 fue más eficaz que el α-VEGF y que un régimen inductivo sólo de gemcitabina.

EJEMPLO 10

Expresión del anticuerpo anti-PD-L1 en células de mamífero

Este ejemplo ilustra la preparación de formas posiblemente glucosiladas de anticuerpo anti-PD-L1 mediante expresión

recombinante en células de mamífero.

Como vector de expresión se emplea el vector pRK5 (véase el documento EP 307.247, publicado el 15 de marzo de 1989). Opcionalmente, el ADN que codifica la cadena ligera y/o pesada del anticuerpo se liga en pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción de dicho ADN utilizando métodos de ligamiento tales como los descritos en Sambrook *et al.*, citado anteriormente.

En una realización, las células hospedadoras seleccionadas pueden ser células 293. Células 293 humanas (ATCC CCL 1573) se hacen crecer hasta alcanzar la confluencia en placas de cultivo tisular en medio tal como DMEM complementado con suero fetal de ternera y, opcionalmente, componentes nutritivos y/o antibióticos. Aproximadamente 10 µg si el ADN que codifica el anticuerpo pRK5 se mezclan con aproximadamente 1 µg de ADN que codifica el gen del ARN VA [Thimmappaya *et al.*, Cell, 31:543 (1982)] y se disuelven en 500 µl de Tris-HCl 1 mM, EDTA 0,1 mM, CaCl₂ 0,227 M. A esta mezcla se le añaden, gota a gota, 500 µl de HEPES 50 mM (pH 7,35), NaCl 280 mM, NaPO₄ 1,5 mM y se deja que se forme un precipitado durante 10 minutos a 25 °C. El precipitado se suspende y se añade a las células 293 y se deja reposar durante aproximadamente cuatro horas a 37 °C. Se aspira el medio de cultivo y se añaden 2 ml de glicerol al 20 % en PBS durante 30 segundos. Después, las células 293 se lavan con medio asérico, se añade medio reciente y las células se incuban durante aproximadamente 5 días.

Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, el medio de cultivo se retira y se reemplaza por medio de cultivo (sólo) o medio de cultivo que contiene ³⁵S-cisteína 200 µCi/ml y ³⁵S-metionina 200 µCi/ml. Después de una incubación de 12 horas, se recoge el medio acondicionado, se concentra en un filtro giratorio y se carga en un gel de SDS al 15 %. El gel procesado puede secarse y exponerse a una película durante un período de tiempo seleccionado para revelar la presencia del anticuerpo. Los cultivos que contienen células transfectadas pueden someterse a una incubación adicional (en medio asérico) y el medio se analiza en bioensayos seleccionados.

En una técnica alternativa, el anticuerpo puede introducirse en células 293 de forma transitoria utilizando el método del sulfato de dextrano descrito por Sompanyrac *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981). En un matraz giratorio se cultivan células 293 hasta su densidad máxima y se añaden 700 µg de ADN que codifica el anticuerpo pRK5. Primero se concentran las células del matraz giratorio mediante centrifugación y se lavan con PBS. El precipitado de ADN-dextrano se incuba durante cuatro horas sobre el sedimento celular. Las células se tratan con glicerol al 20 % durante 90 segundos, se lavan con medio de cultivo tisular y se vuelven a introducir en el matraz giratorio que contiene medio de cultivo tisular, 5 µg/ml de insulina bovina y 0,1 µg/ml de transferrina bovina. Después de aproximadamente cuatro días, el medio acondicionado se centrifuga y se filtra para eliminar células y residuos. La muestra que contiene el anticuerpo expresado puede después concentrarse y purificarse mediante cualquier método seleccionado, tal como diálisis y/o cromatografía en columna.

En otra realización, el anticuerpo se puede expresar en células CHO. El ADN que codifica el anticuerpo ligado a pRK5 se puede transfectar en células CHO utilizando reactivos conocidos como CaPO₄ o DEAE-dextrano. Como se ha descrito anteriormente, los cultivos celulares se pueden incubar y el medio se puede reemplazar por medio de cultivo (solo) o medio que contenga un radiomarcador tal como ³⁵S-metionina. Después de determinar la presencia del anticuerpo, el medio de cultivo puede reemplazarse por medio sin suero. Preferentemente, los cultivos se incuban durante aproximadamente 6 días y después se recoge el medio condicionado. A continuación, el medio que contiene el anticuerpo expresado puede concentrarse y purificarse mediante cualquier método seleccionado.

Las variantes del anticuerpo marcadas con epítipo también pueden expresarse en células CHO hospedadoras. El ADN que codifica el anticuerpo ligado en pRK5 se puede subclonar a partir del vector pRK5. El inserto de subclon puede someterse a PCR para fusionarse dentro del marco de lectura con una etiqueta epitópica seleccionada, tal como una etiqueta de poli-his, en un vector de expresión de Baculovirus. El ADN con etiqueta de poli-his que codifica el inserto de anticuerpo puede subclonarse después en un vector dirigido por SV40 que contiene un marcador de selección tal como DHFR para la selección de clones estables. Por último, las células CHO se pueden transfectar (como se ha descrito anteriormente) con el vector dirigido por SV40. Para verificar la expresión, puede realizarse un etiquetado, como se ha descrito anteriormente. El medio de cultivo que contiene el anticuerpo expresado, etiquetado con poli-His, puede después concentrarse y purificarse mediante cualquier método seleccionado, tal como por cromatografía de afinidad de quelatos de Ni²⁺.

El anticuerpo también puede expresarse en células CHO y/o COS mediante un procedimiento de expresión transitoria o en células CHO mediante otro procedimiento de expresión estable.

La expresión estable en células CHO se realiza utilizando el siguiente procedimiento. Las proteínas se expresan como una construcción de IgG (inmunoadhesina), en la que las secuencias codificantes de las formas solubles (*p. ej.*, dominios extracelulares) de las proteínas respectivas se fusionan a una secuencia de región constante de IgG1 que contiene la bisagra, CH2 y los dominios CH2 y/o es una forma etiquetada con poli-His.

Después de la amplificación por PCR, los ADN respectivos se subclonan en un vector de expresión CHO utilizando técnicas estándar como se describe en Ausubel *et al.*, Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997). Los vectores de expresión de CHO se construyen para que tengan sitios de restricción compatibles

5= y 3= del ADN de interés para permitir el barajado conveniente de los ADNc. El vector de expresión utilizado en células CHO es el descrito en Lucas *et al.*, Nucl. Acids Res. 24:9 (1774-1779 (1996), y utiliza el promotor/potenciador temprano de SV40 para dirigir la expresión del ADNc de interés y la dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de la DHFR permite la selección para el mantenimiento estable del plásmido después de la transfección.

Se introducen doce microgramos del ADN plasmídico deseado en aproximadamente 10 millones de células CHO utilizando reactivos de transfección disponibles en el comercio SUPERFECT® (Quiagen), DOSPER® o FUGENE® (Boehringer Mannheim). Las células se cultivan como se describe en Lucas *et al.*, citado anteriormente. Aproximadamente 3×10^7 células se congelan en una ampolla para su mayor crecimiento y producción como se describe a continuación.

Las ampollas que contienen el ADN plasmídico se descongelan colocándolas en un baño de agua y se mezclan mediante agitación vortical. El contenido se pipetea en un tubo de centrifuga que contiene 10 ml de medio y se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos. Se aspira el sobrenadante y las células se resuspenden en 10 ml de medio selectivo (PS20 filtrado a 0,2 μ m con suero bovino fetal diafiltrado al 5 % a 0,2 μ m). Después, se distribuyen partes alícuotas de las células en una centrifuga de 100 ml que contiene 90 ml de medio selectivo. Transcurridos 1-2 días, las células se transfieren a una centrifuga de 250 ml rellena con 150 ml de medio de crecimiento selectivo y se incuban a 37 °C. Después de otros 2-3 días, centrifugas de 250 ml, 500 ml y 2000 ml se siembran con 3×10^5 células/ml. El medio celular se intercambia con medio reciente mediante centrifugación y resuspensión en medio de producción. Aunque se puede emplear cualquier medio CHO adecuado, realmente puede utilizarse un medio de producción descrito en la patente de EE.UU. nº 5.122.469, concedida el 16 de junio de 1992. Una centrifuga de producción de 3 l se siembra a $1,2 \times 10^6$ células/ml. El día 0, se determina el número de células y el pH. El día 1, se toma una muestra de la centrifuga y se comienza a rociar con aire filtrado. El día 2, se toma una muestra de la centrifuga, la temperatura se cambia a 33 °C y se añaden 30 ml de 500 g/l de glucosa y 0,6 ml de antiespumante al 10 % (p. ej., emulsión de polidimetilsiloxano al 35 %, emulsión de calidad médica Dow Corning 365). A lo largo de la producción, el pH se ajusta según sea necesario para mantenerlo en torno a 7,2. Después de 10 días, o hasta que la viabilidad descienda por debajo del 70 %, el cultivo celular se recoge mediante centrifugación y filtración a través de un filtro de 0,22 μ m. El filtrado se conserva a 4 °C o se carga inmediatamente en columnas para su purificación.

Para las construcciones etiquetadas con poli-His, las proteínas se purifican utilizando una columna Ni-NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añade imidazol al medio acondicionado a una concentración de 5 mM. El medio acondicionado se bombea a una columna de Ni-NTA de 6 ml equilibrada a 4 °C, en tampón Hepes 20 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 0,3 M e imidazol 5 mM a un caudal de 4-5 ml/min. Tras la carga, la columna se lava con tampón de equilibrio adicional y la proteína se eluye con tampón de equilibrio que contiene imidazol 0,25 M. La proteína sumamente purificada se desaliniza posteriormente en un tampón de almacenamiento que contiene Hepes 10 mM, NaCl 0,14 M y manitol al 4 %, pH 6,8, con una columna G25 Superfine (Pharmacia) de 25 ml y se conserva a -80 °C.

Las construcciones de inmuno adhesina (que contienen Fc) se purifican de los medios acondicionados de la siguiente manera. El medio acondicionado se bombea a una columna de Proteína A de 5 ml (Pharmacia) que se había equilibrado en tampón fosfato Na 20 mM, pH 6,8. Tras la carga, la columna se lava extensamente con tampón de equilibrio antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluida se neutraliza inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 μ l de tampón Tris 1 M, pH 9. La proteína sumamente purificada se desaliniza posteriormente en un tampón de almacenamiento, como se ha descrito anteriormente, para las proteínas con etiqueta de poli-His. La homogeneidad se evalúa mediante geles de poli acrilamida con SDS y mediante secuenciación de aminoácidos aminoterminal mediante degradación de Edman.

Ejemplo 11

Expresión del anticuerpo anti-PD-L1 en *E. coli*

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma no glucosilada de anticuerpo anti-PD-L1 mediante expresión recombinante en *E. coli*.

La secuencia de ADN que codifica el anticuerpo anti-PD-L1 se amplifica inicialmente utilizando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores deben contener sitios de enzimas de restricción que correspondan a los sitios de enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado. Se pueden emplear diversos vectores de expresión. Un ejemplo de un vector adecuado es pBR322 (derivado de *E. coli*; véase Bolivar *et al.*, Gene, 2:95 (1977)) que contiene genes de resistencia a ampicilina y tetraciclina. El vector se digiere con enzima de restricción y se desfosforila. Después, las secuencias amplificadas por PCR se ligan al vector. El vector incluirá preferentemente secuencias que codifican un gen de resistencia a antibióticos, un promotor de *trp*, un líder polihis (incluidos los seis primeros codones STII, la secuencia polihis y el sitio de escisión de enterocinasa), la región codificante NPOR, el terminador transcripcional lambda y un gen argU.

La mezcla de ligamiento se utiliza después para transformar una cepa de *E. coli* seleccionada utilizando los métodos descritos en Sambrook *et al.*, citado anteriormente. Los transformantes se identifican con respecto a su capacidad para crecer en placas con LB y después se seleccionan colonias resistentes a antibióticos. El ADN plasmídico se

puede aislar y confirmar mediante análisis de restricción y secuenciación de ADN.

Los clones seleccionados se pueden cultivar durante la noche en un medio de cultivo líquido como el caldo LB complementado con antibióticos. El cultivo nocturno se puede utilizar posteriormente para inocular un cultivo a mayor escala. Después, las células se cultivan hasta alcanzar la densidad óptica deseada, durante lo cual se activa el promotor de expresión.

Después de cultivar las células durante varias horas más, las células se pueden recoger mediante centrifugación. El sedimento celular obtenido mediante centrifugación se puede solubilizar utilizando diversos agentes conocidos en la técnica y el anticuerpo solubilizado se puede purificar después utilizando una columna quelante de metales en condiciones que permitan una unión estrecha del anticuerpo.

El anticuerpo anti-PD-L1 también se puede expresar en *E. coli* en una forma etiquetada con poli-His, utilizando el siguiente procedimiento. El ADN que codifica el anticuerpo se amplifica inicialmente utilizando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores contienen sitios de enzimas de restricción que corresponden a los sitios de enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado y otras secuencias útiles que proporcionan un inicio de la traducción eficaz y fiable, una purificación rápida en una columna quelante de metales y una eliminación proteolítica con enterocinasa. Las secuencias etiquetadas con poli-His, amplificadas con PCR, se ligan después en un vector de expresión, que se utiliza para transformar un hospedador de *E. coli* basado en la cepa 52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)). Los transformantes se cultivan primero en LB que contiene 50 mg/ml de carbenicilina a 30°C con agitación hasta que se alcanza una D.O.600 de 3-5. Después, los cultivos se diluyen 50-100 veces en medio CRAP (preparado mezclando 3,57 g de (NH₄)₂SO₄, 0,71 g de citrato de sodio A2H₂O, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levadura Difco, 5,36 g de Sheffield Hycase SF en 500 ml de agua, así como MPOS 110 mM, pH 7,3, glucosa al 0,55 % (p/v) y MgSO₄ 7 mM) y se cultivan durante aproximadamente 20-30 horas a 30°C con agitación. Se extraen muestras para verificar la expresión mediante análisis SDS-PAGE y el cultivo en masa se centrifuga para sedimentar las células. Los sedimentos celulares se congelan hasta su purificación y replegamiento.

Se resuspende la pasta de *E. coli* de fermentaciones de 0,5 a 1 l (sedimentos de 6-10 g) en 10 volúmenes (p/v) en guanidina 7 M, Tris 20 mM, tampón a pH 8. Se añaden sulfito de sodio sólido y tetrionato de sodio para obtener concentraciones finales de 0,1 M y 0,02 M, respectivamente, y la solución se agita durante la noche a 4 °C. Esta etapa da como resultado una proteína desnaturalizada con todos los restos de cisteína bloqueados por sulfitolización. La solución se centrifuga a 40.000 rpm en una ultracentrífuga Beckman durante 30 min. El sobrenadante se diluye con 3-5 volúmenes de tampón de columna de quelato metálico (guanidina 6 M, Tris 20 mM, pH 7,4) y se filtra a través de filtros de 0,22 micrómetros para clarificar. Dependiendo de la situación, el extracto clarificado se carga en una columna de quelato metálico Qiagen Ni-NTA de 5 ml equilibrada en el tampón de la columna de quelato metálico. La columna se lava con tampón adicional que contiene imidazol 50 mM (Calbiochem, calidad Utrol), pH 7,4. La proteína se eluye con tampón que contiene imidazol 250 mM. Las fracciones que contenían la proteína deseada se reunieron y conservaron a 4°C. La concentración de proteína se estima mediante su absorbancia a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción calculado en función de su secuencia de aminoácidos.

Las proteínas se repliegan diluyendo la muestra lentamente en un tampón de replegamiento recién preparado que consiste en: Tris 20 mM, pH 8,6, NaCl 0,3 M, urea 2,5 M, cisteína 5 mM, glicina 20 mM y EDTA 1 mM. Los volúmenes de replegamiento se eligen de modo que la concentración final de proteína esté entre 50 y 100 microgramos/ml. La solución de replegamiento se agita suavemente a 4 °C durante 12 a 36 horas. La reacción de replegamiento se detiene mediante la adición de TFA a una concentración final del 0,4 % (pH de aproximadamente 3). Antes de una mayor purificación de la proteína, la solución se filtra a través de un filtro de 0,22 micrómetros y se añade acetonitrilo hasta una concentración final del 2 al 10 %. La proteína replegada se cromatografía en una columna de fase inversa Poros R1/H utilizando un tampón móvil de TFA al 0,1 % con elución con un gradiente de acetonitrilo del 10 al 80 %. Se analizan alícuotas de fracciones con absorbancia A280 en geles de poliacrilamida SDS y se reúnen las fracciones que contienen proteína replegada homogénea. Generalmente, las especies correctamente replegadas de la mayoría de las proteínas se eluyen a las concentraciones más bajas de acetonitrilo, ya que esas especies son las más compactas con sus interiores hidrófobos protegidos de la interacción con la resina de fase inversa. Las especies agregadas normalmente se eluyen a concentraciones más altas de acetonitrilo. Además de resolver formas mal plegadas de proteínas a partir de la forma deseada, la etapa de fase inversa también elimina la endotoxina de las muestras.

Se reúnen las fracciones que contienen los anticuerpos anti-PD-L1 plegados deseados y se elimina el acetonitrilo utilizando una suave corriente de nitrógeno dirigida a la solución. Las proteínas se formulan en Hepes 20 mM, pH 6,8 con cloruro de sodio 0,14 M y manitol al 4 % mediante diálisis o mediante filtración en gel utilizando resinas G25 Superfine (Pharmacia) equilibradas en el tampón de formulación y filtradas de forma estéril.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-PD-L1 de longitud completa, bloqueante, aislado, que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y cadena ligera y una región constante, en donde:

5

(a) la cadena pesada comprende la secuencia:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVVVRQAPGKGLEWVAVWISPYGGSTYYADSV
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSA (SEQ ID
NO:20),

10

y

(b) la cadena ligera comprende la secuencia:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISLQPEDFATYYCQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:21)

15

y la región constante es una región constante de IgG1 humana.

2. Una composición que comprende el anticuerpo anti-PD-L1 de longitud completa, bloqueante, aislado, de la reivindicación 1 y al menos un transportador farmacéuticamente aceptable.

Coestimulación de la familia B7

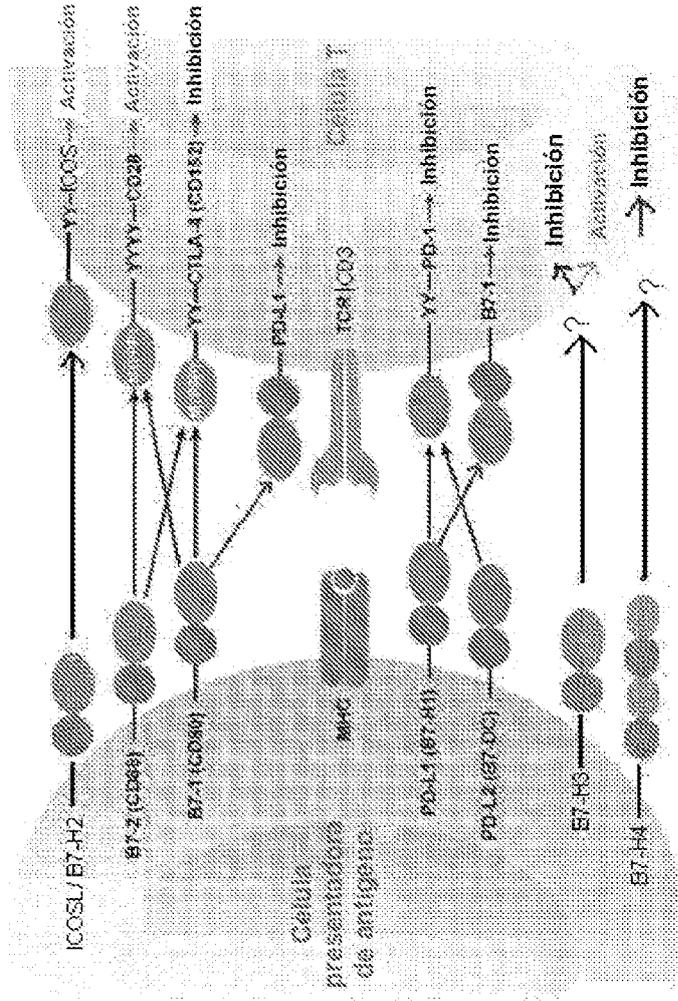


Figura 1

Ensayo *in vitro* de PMEL/B16

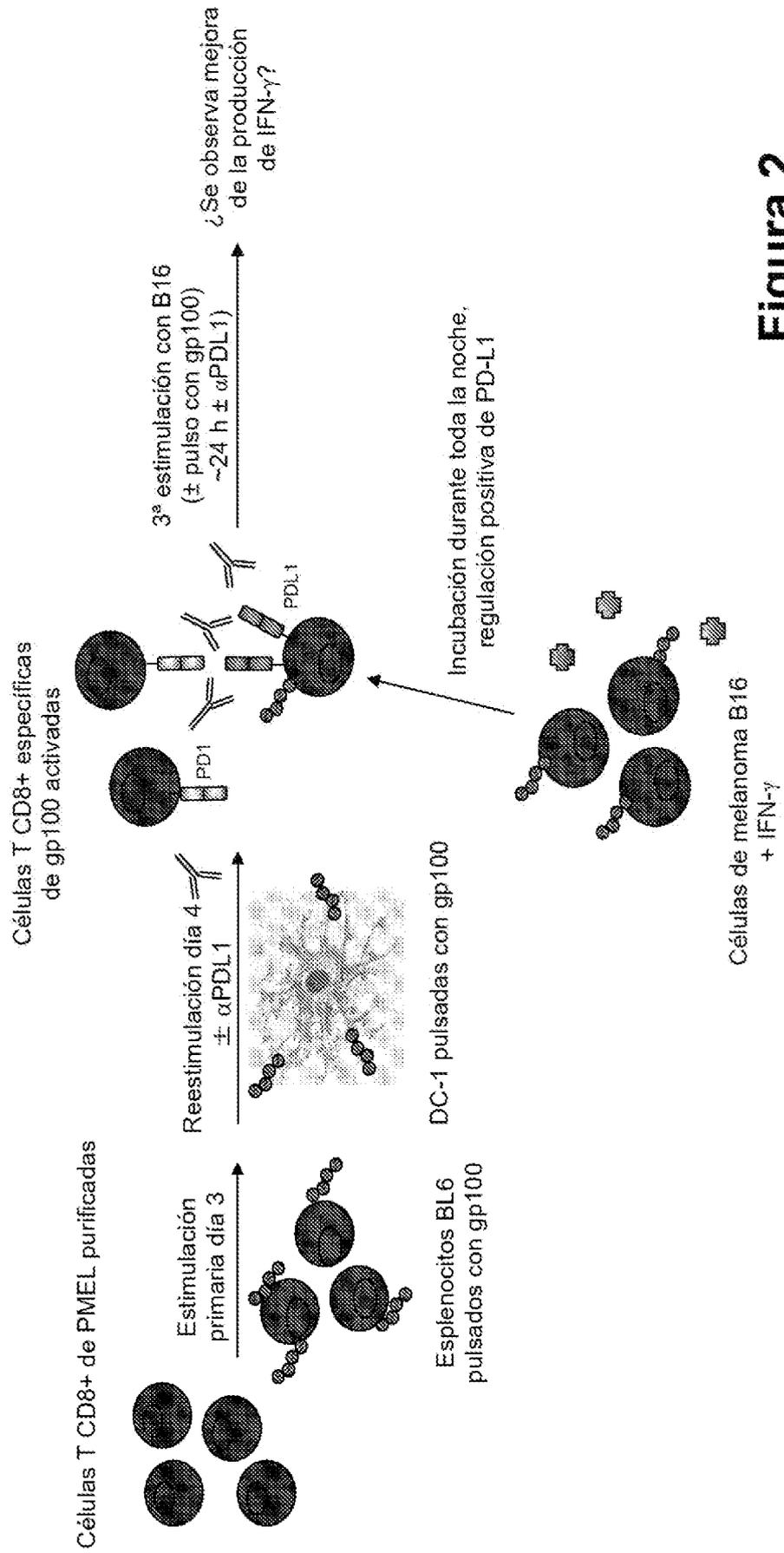


Figura 2

Efecto del anticuerpo anti-PDL1 sobre la producción de IFN- γ por células T CD8+ PMEL

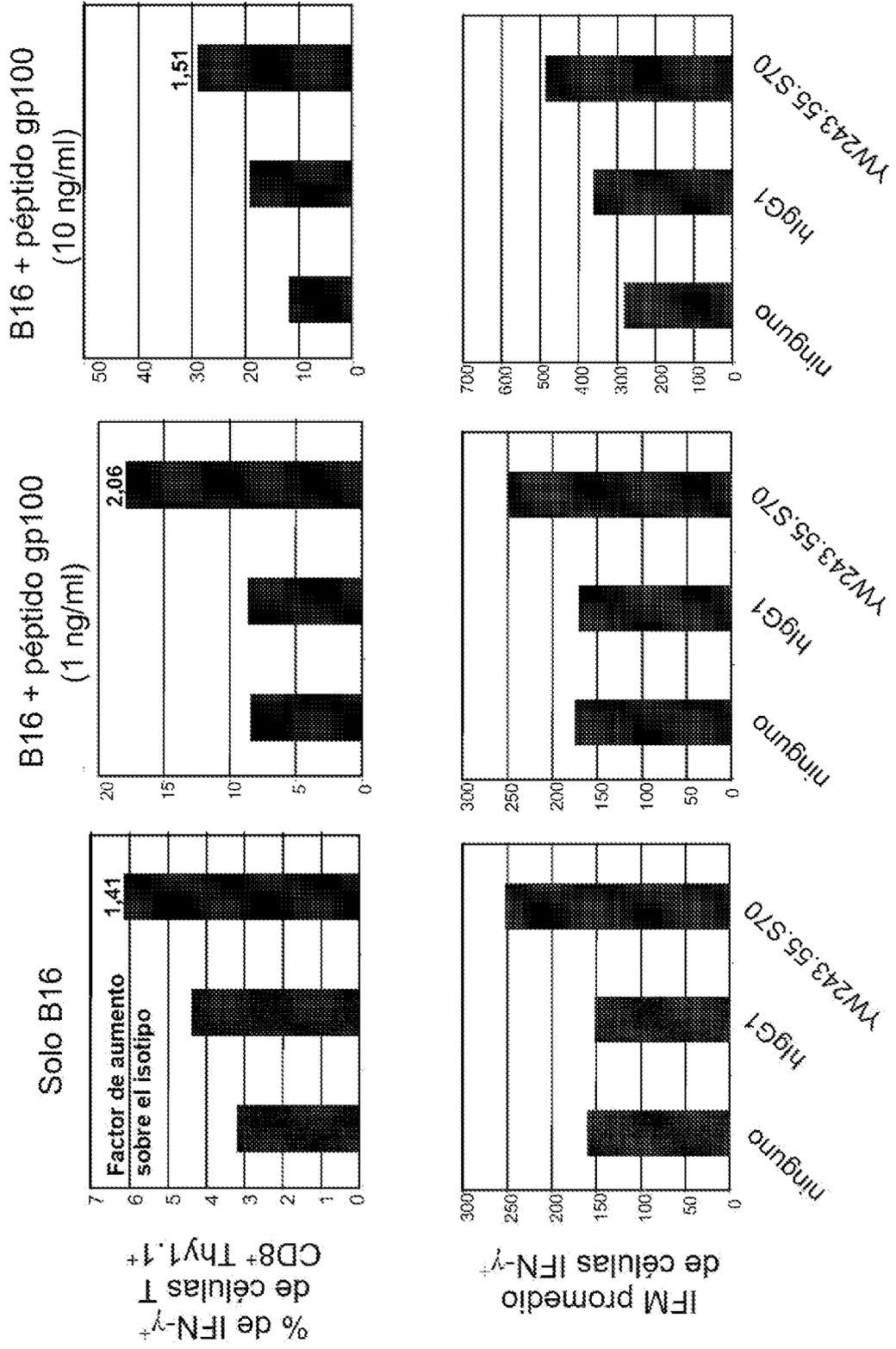


Figura 3

Efecto del anticuerpo anti-PD-L1 sobre la proliferación de células T CD4 sometidas a estimulación secundaria

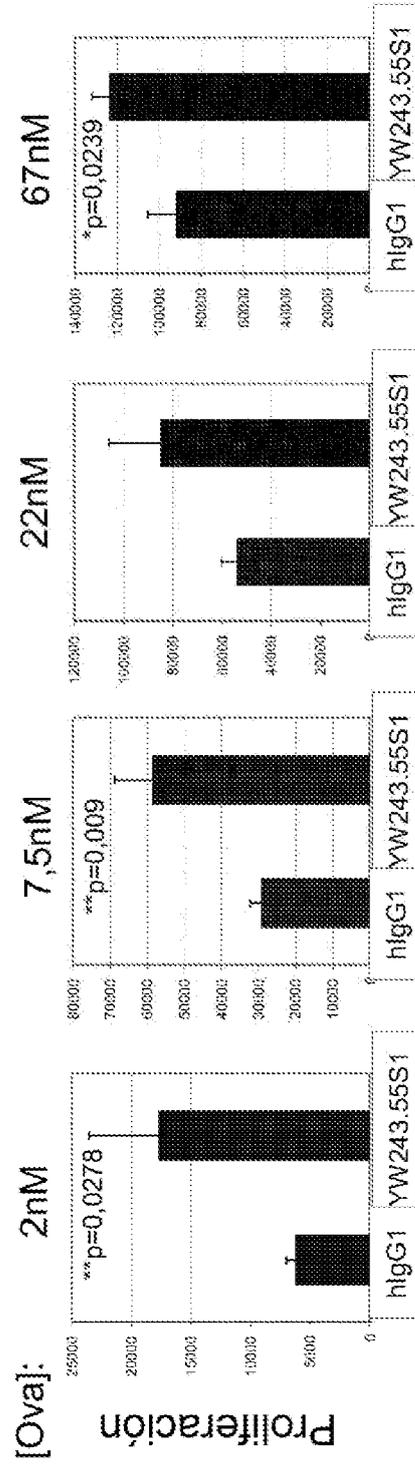


Figura 4

Efecto del Ab anti-PD-L1 sobre la proliferación de células T CD8 humanas en reacción de linfocitos mixta

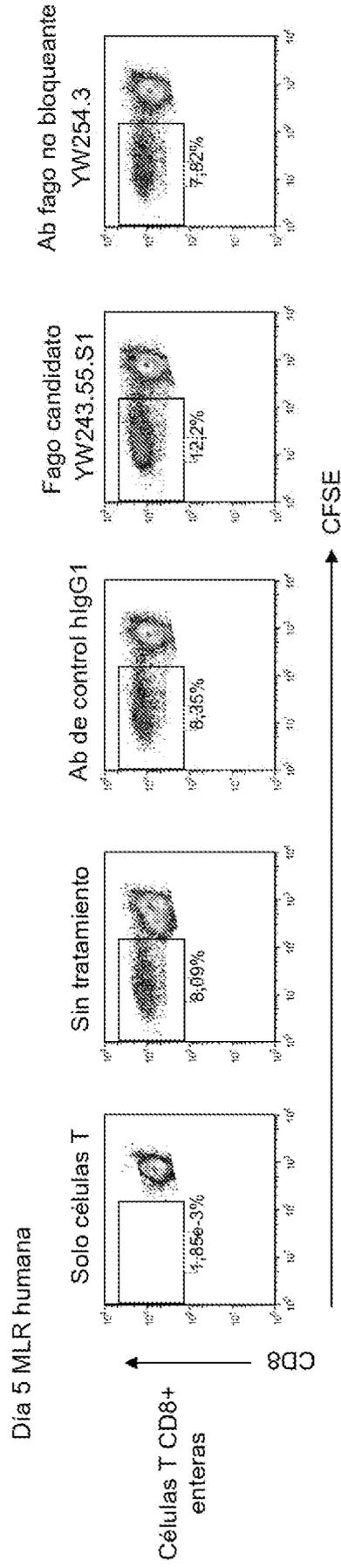


Figura 5

Anti-PDL1 en la infección por el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) crónica (clon 13)

Grupos:

- Clon 13 cepa del LCMV, infecc. crónica (2E6/ratón)

1. IgG1 de control: n= 5 ratones

2. anti-PD-L1 YW243.55.S70 H/m: n= 5 ratones

- Cepa Armstrong del LCMV, infecc. de corta duración (2E6/ratón)

- No infectado

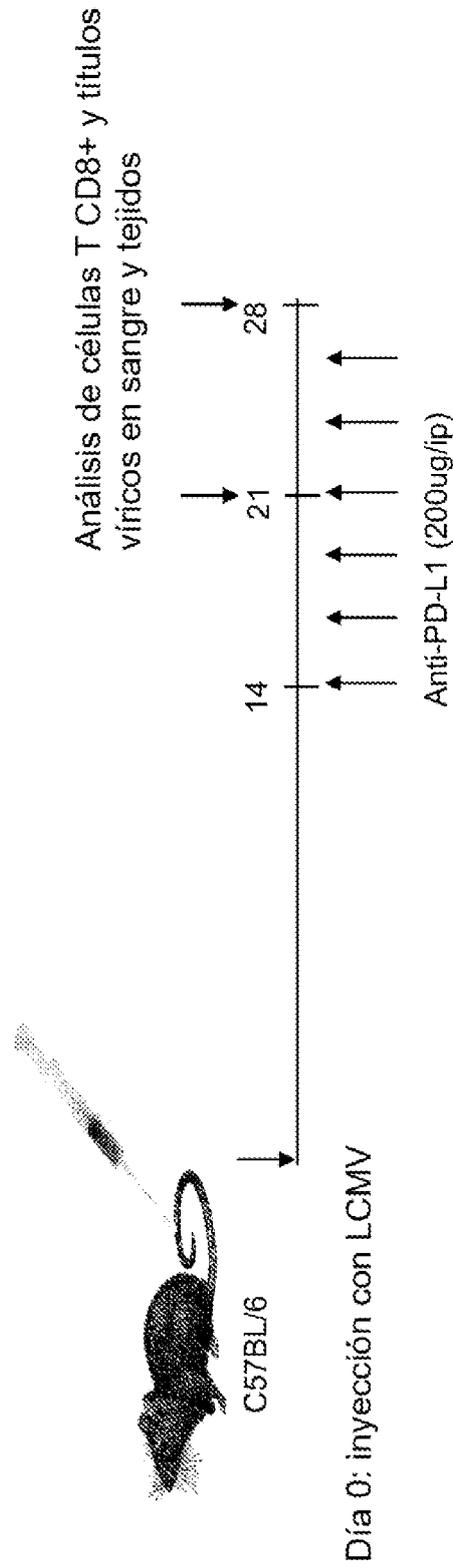
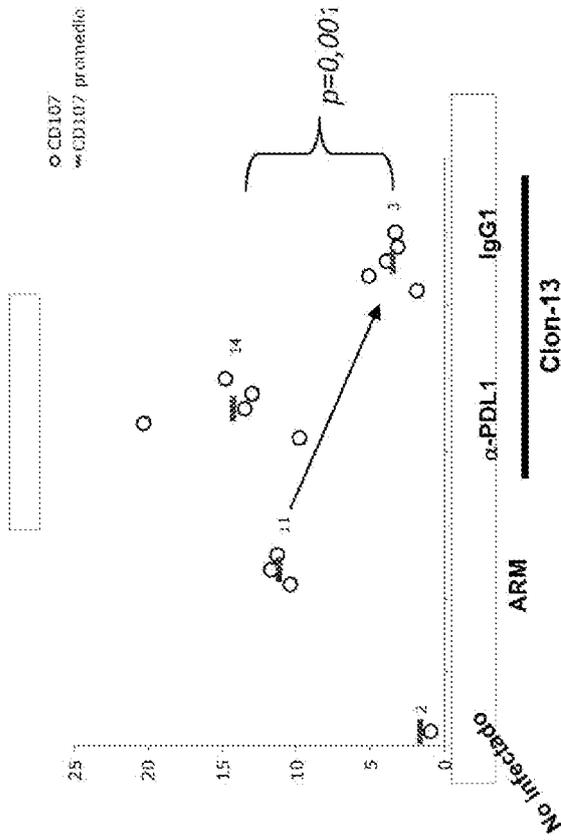


Figura 6

Efecto del Ab anti-PD-L1 sobre la función efectora CD8 en ratones tratados con anti-PDL1

CD107a Día 28



Ensayo con IFN γ Día 28

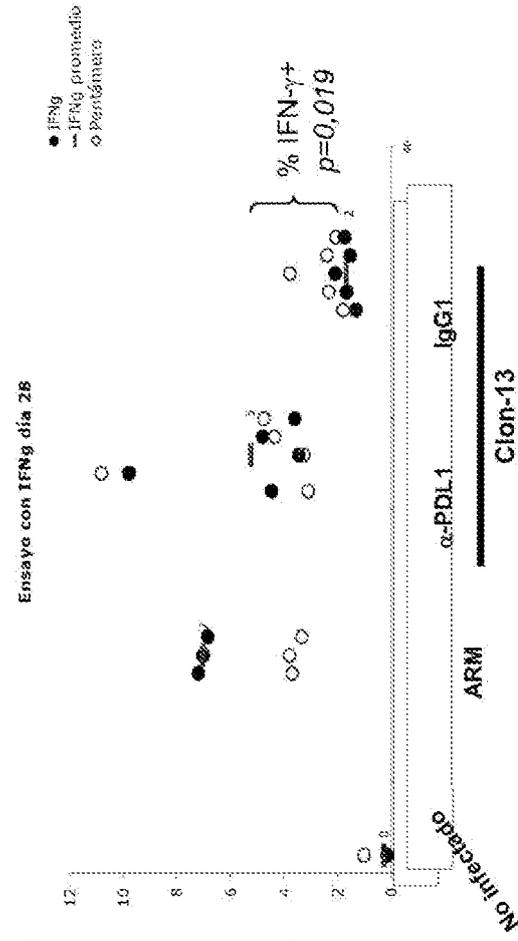


Figura 7A

Figura 7B

Reducción de títulos víricos en sueros y tejido en ratones tratados con α -PD-L1

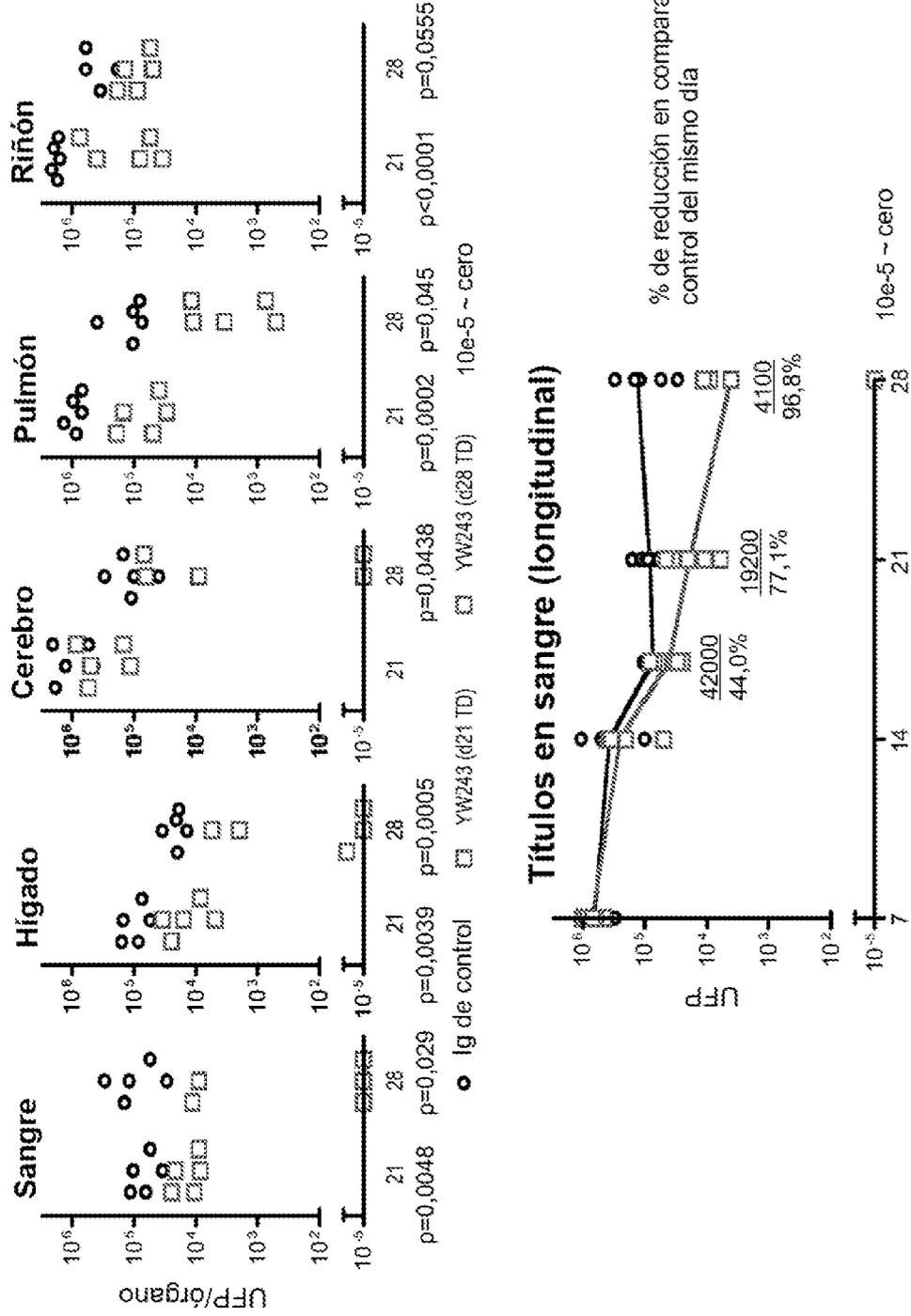


Figura 8

Efecto de la intervención tardía con tratamiento anti-PDL1 en el modelo colorectal MC38.Ova

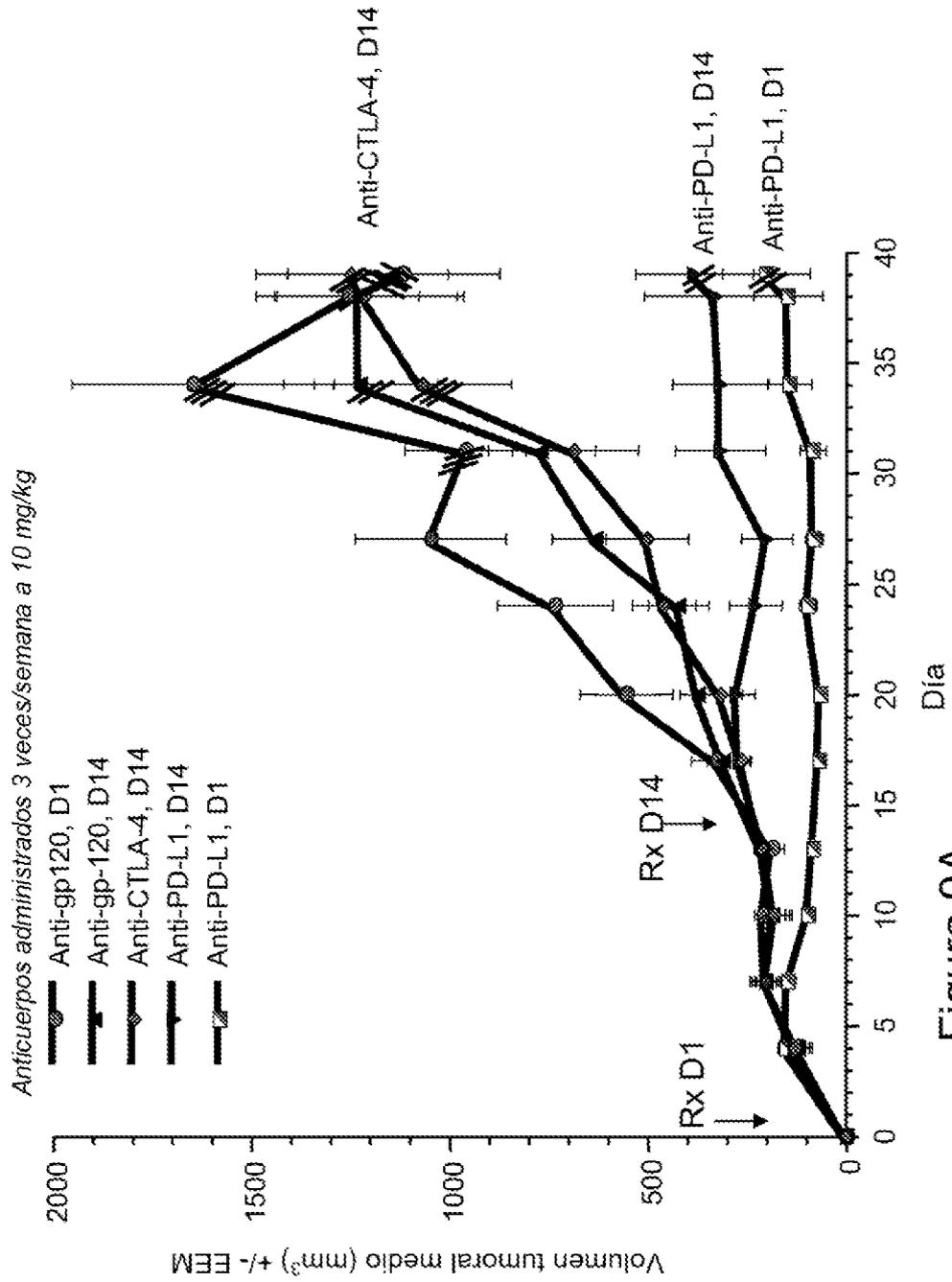


Figura 9A

PD-L1 expresado en células MC38-Ova

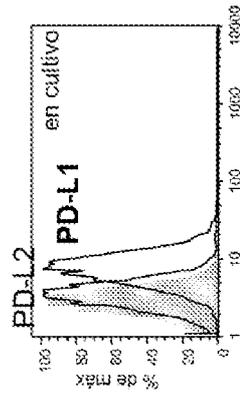


Figura 9B

Efecto del tratamiento del bloqueo con PD-L1 solo y junto con anti-VEGF o Gemcitabina

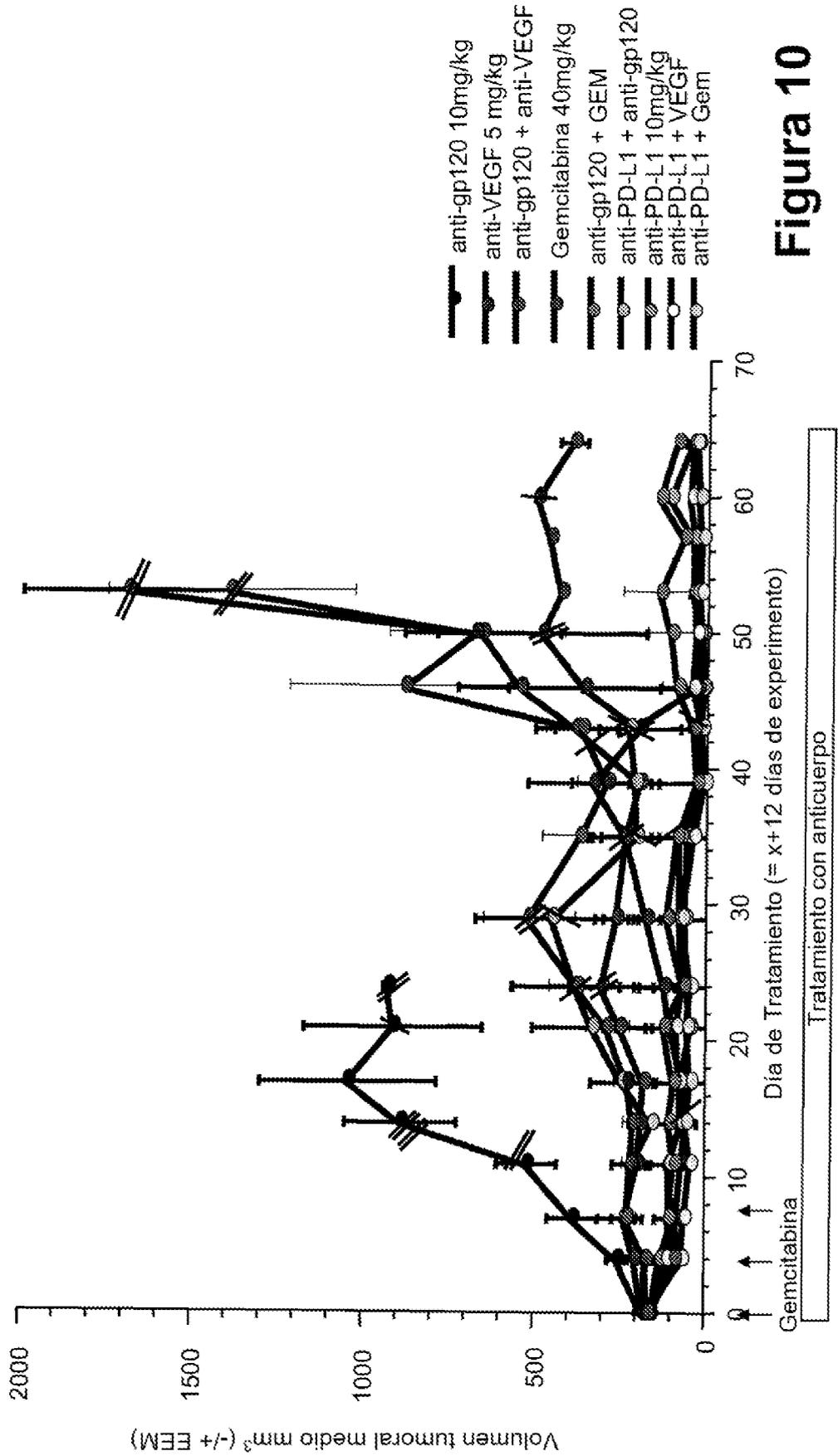


Figura 10

Cadenas pesadas

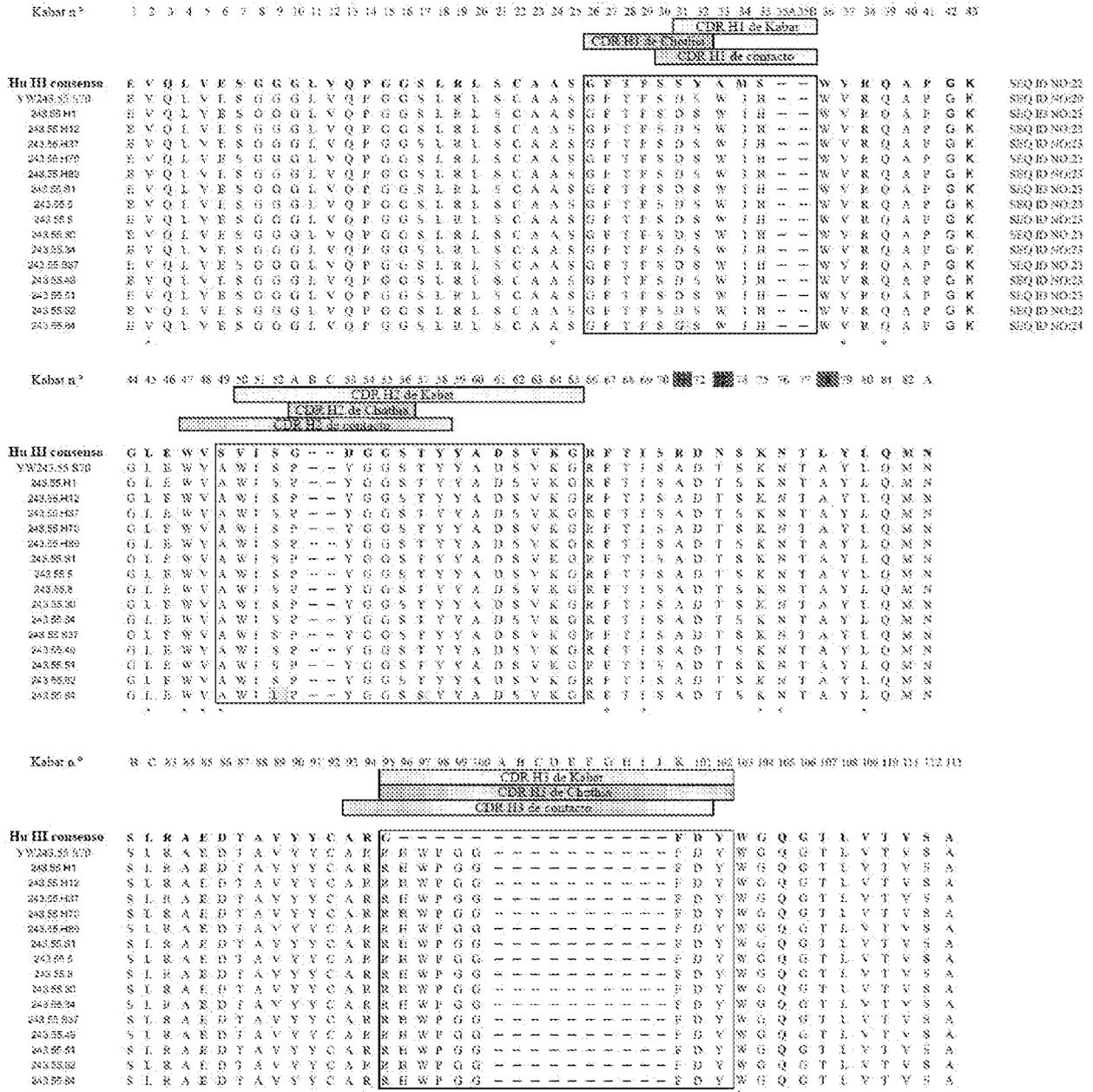


Figura 11A

