

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 919**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.11.2018** **PCT/US2018/059271**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.05.2019** **WO19090263**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2018** **E 18812446 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2024** **EP 3707510**

54 Título: **Procedimientos diagnósticos y terapéuticos para el cáncer**

30 Prioridad:

**06.11.2017 US 201762582207 P**  
**07.12.2017 US 201762595957 P**  
**13.04.2018 US 201862657468 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente:  
**31.10.2024**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GUAN, YINGHUI;**  
**SENBABAOGLU, YASIN;**  
**TURLEY, SHANNON y**  
**WANG, YULEI**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

### Observaciones:

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

ES 2 984 919 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

Procedimientos diagnósticos y terapéuticos para el cáncer

## 5 Campo de la invención

La presente invención está dirigida a procedimientos diagnósticos y terapéuticos para el tratamiento del cáncer.

### Antecedentes de la invención

El cáncer sigue siendo una de las amenazas más mortales para la salud humana. En EE. UU., el cáncer afecta a casi 1,3 millones de pacientes nuevos cada año, y es la segunda causa principal de muerte después de cardiopatía, lo que representa aproximadamente 1 de cada 4 muertes. También se predice que el cáncer puede superar a las cardiovasculopatías como la principal causa de muerte en 5 años. Los tumores sólidos son responsables de la mayoría de esas muertes. Aunque han existido avances significativos en el tratamiento médico de determinados cánceres, la tasa de supervivencia global a 5 años para todos los cánceres ha mejorado solo en aproximadamente un 10 % en los últimos 20 años. Los tumores sólidos malignos, en particular, metastatizan y crecen rápidamente de manera incontrolada, lo que hace que su detección y tratamiento a tiempo sean sumamente difíciles.

Los estudios en seres humanos con inhibidores del punto de control inmunitario han demostrado la expectativa de aprovechar el sistema inmunitario para controlar y erradicar el crecimiento tumoral. El receptor de muerte programada 1 (PD-1) y su ligando, el ligando de muerte programada 1 (PD-L1), son proteínas del punto de control inmunitario que se han implicado en la supresión de las respuestas del sistema inmunitario durante infecciones crónicas, embarazo, aloinjertos de tejido, enfermedades autoinmunitarias y cáncer. El PD-L1 regula la respuesta inmunitaria uniéndose al receptor PD-1 inhibidor, que se expresa en la superficie de linfocitos T, linfocitos B y monocitos. El PD-L1 regula negativamente la función de los linfocitos T también a través de la interacción con otro receptor, B7-1. La formación de los complejos PD-L1/PD-1 y PD-L1/B7-1 regula negativamente la señalización del receptor de linfocitos T, lo que da como resultado la posterior regulación por disminución de la activación de linfocitos T y la supresión de la actividad inmunitaria antitumoral.

A pesar del avance significativo en el tratamiento del cáncer, todavía se están buscando procedimientos diagnósticos y tratamientos antineoplásicos mejorados.

Rodríguez-Vida A, et al., ESMO Open 2016; 1:e000013.doi:10.1136/esmoopen-2015-000013 divulga estudios seleccionados sobre el papel de la expresión de PD-L1 como biomarcador predictivo de la respuesta a los inhibidores de PD-1/PD-L1 en ensayos clínicos. Einstein, DJ et al., Clinical advances in hematology & oncology, vol. 16, número 6, 1 de junio de 2017, páginas 478-488, ha sugerido usar la expresión de PD-L1 por células inmunitarias infiltrantes de tumor como ayuda para seleccionar pacientes que lo más probablemente se beneficien del bloqueo de PD-L1 con o sin tratamiento dirigido por VEGF.

### Sumario de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento de identificación de un individuo que tiene un cáncer que se puede beneficiar del tratamiento con un tratamiento antineoplásico que comprende un antagonista del eje PD-L1 y un antagonista de TGF- $\beta$  o para seleccionar un tratamiento para un individuo que tiene un cáncer como se define en la reivindicación 1.

El procedimiento comprende determinar el nivel de expresión de los siguientes genes en una muestra del individuo: alfa-actina-2 (ACTA2), una proteína 19 que contiene los dominios de desintegrina y metaloproteinasa (ADAM19), proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP), factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF), factor de crecimiento y transformación beta 1 (TGFB1) y receptor del factor de crecimiento y transformación beta 2 (TGFB2), en el que un nivel de expresión de ACTA2, ADAM19, COMP, CTGF, TGFB1 y TGFB2 en la muestra que está en o por encima de un nivel de expresión de referencia de los genes identifica al individuo como alguien que se puede beneficiar del tratamiento con un tratamiento antineoplásico que comprende un antagonista del eje PD-L1 y un antagonista de TGF- $\beta$ , en el que el antagonista del eje PD-L1 es atezolizumab, y en el que el antagonista de TGF- $\beta$  es un anticuerpo de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecífico.

La presente invención proporciona además un tratamiento antineoplásico que comprende un antagonista del eje PD-L1 y un antagonista de TGF- $\beta$  para su uso en el tratamiento de un individuo que tiene un cáncer, en el que antes del tratamiento se ha determinado que el nivel de expresión de ACTA2, ADAM19, COMP, CTGF, TGFB1 y TGFB2 en la muestra está en o por encima de un nivel de expresión de referencia de los genes, en el que el antagonista del eje PD-L1 es atezolizumab, y en el que el antagonista de TGF- $\beta$  es un anticuerpo de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecífico.

En un aspecto, la presente invención proporciona el procedimiento o el tratamiento antineoplásico para su uso que comprende además: (i) determinar el nivel de expresión en la muestra de uno o más genes adicionales seleccionados del grupo que consiste en PD-L1, CD8A, CXCL10, CXCL9, GZMA, GZMB, IFNG, PRF1 y TBX21; opcionalmente en el que el uno o más genes adicionales es (i) PD-L1 o (ii) se selecciona del grupo que consiste en CD8A, CXCL10, CXCL9, GZMA, GZMB, IFNG, PRF1 y TBX21; opcionalmente que comprende además determinar el nivel de expresión de al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete o los ocho de CD8A, CXCL10, CXCL9, GZMA, GZMB, IFNG, PRF1 y TBX21; que opcionalmente comprende además determinar el nivel de expresión de CD8A, CXCL10, CXCL9, GZMA, GZMB, IFNG, PRF1 y TBX21; y/o (ii) determinar una puntuación de carga mutacional del tumor (CMT) en una muestra de tumor del individuo.

En un aspecto, la presente invención proporciona el procedimiento o el tratamiento antineoplásico para su uso, en el que: (i) el cáncer se selecciona del grupo que consiste en un cáncer de vejiga, un cáncer de riñón, un cáncer de pulmón, un cáncer de hígado, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas, un cáncer colorrectal o un cáncer de mama, opcionalmente en el que (i) el cáncer de vejiga es un carcinoma urotelial (CU), además opcionalmente en el que el CU es un CU metastásico o (ii) el cáncer de páncreas es adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP); (ii) un tumor del individuo tiene un fenotipo con exclusión inmunitaria caracterizado por la localización de linfocitos T CD8+ en el compartimento estromal peritumoral, opcionalmente en el que los linfocitos T CD8+ se localizan en o cerca de fibras de colágeno; (iii) el nivel de expresión de referencia se determina a partir de una población de individuos que tienen un cáncer, opcionalmente en el que el nivel de expresión de referencia es la mediana de un nivel de expresión o se determina por análisis de componentes principales de niveles de expresión transformados con puntuación Z; (iv) el nivel de expresión es un nivel de expresión de ácido nucleico, opcionalmente en el que el nivel de expresión de ácido nucleico es un nivel de expresión de ARNm, además opcionalmente en el que el nivel de expresión de ARNm se determina por RNA-seq, RT-qPCR, qPCR, qPCR múltiple o RT-qPCR, análisis de micromatrices, SAGE, técnica MassARRAY, ISH o una combinación de los mismos; (v) el nivel de expresión es un nivel de expresión de proteínas, opcionalmente en el que el nivel de expresión de proteínas se determina por inmunohistoquímica (IHQ), inmunoelectrotransferencia, ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), inmunoprecipitación, inmunofluorescencia, radioinmunoanálisis o espectrometría de masas; o (vi) la muestra es una muestra de tejido, una muestra de células, una muestra de sangre completa, una muestra de plasma, una muestra de suero o una combinación de las mismas, opcionalmente en el que la muestra de tejido es una muestra de tejido tumoral, además opcionalmente en el que la muestra de tejido tumoral comprende células tumorales, células inmunitarias infiltrantes de tumor, células estromales o una combinación de las mismas, además opcionalmente en el que la muestra de tejido tumoral es una muestra fijada con formol e incluida en parafina (FFIP), una muestra de archivo, una muestra recién preparada o una muestra congelada.

En un aspecto, la presente invención proporciona el procedimiento o el tratamiento antineoplásico para su uso, en el que el anticuerpo de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecífico es 1D11.

En un aspecto, la presente invención proporciona el procedimiento, en el que el tratamiento antineoplásico se formula para su administración en combinación con un agente terapéutico adicional.

En un aspecto, la presente invención proporciona el tratamiento antineoplásico para su uso, en el que el tratamiento antineoplásico se usa en combinación con un agente terapéutico adicional.

En un aspecto, la presente invención proporciona el procedimiento o el tratamiento antineoplásico para su uso, en el que el agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en un agente inmunoterápico, un agente citotóxico, un agente inhibidor del crecimiento, un agente de radioterapia, un agente antiangiogénico y combinaciones de los mismos.

En un aspecto, la presente invención proporciona el procedimiento o el tratamiento antineoplásico para su uso, en el que el individuo es un ser humano.

### Breve descripción de los dibujos

La **FIG. 1A** es un gráfico que muestra que la expresión de la proteína del ligando de muerte programada 1 (PD-L1) en células inmunitarias (CI) infiltrantes de tumor se asocia con la respuesta a atezolizumab (prueba exacta de Fisher;  $p = 0,0038$ ). Los tumores CI2+ tuvieron una tasa de respuesta completa (RC) significativamente mayor ( $p = 0,0006$ ), pero la proporción de pacientes que responden al tratamiento parcialmente (RP) fue similar en todos los niveles de CI ( $p = 0,53$ ).

La **FIG. 1B** es un gráfico que muestra genes asociados con la positividad de inmunohistoquímica (IHQ) de PD-L1 en CI. Se comparó la expresión génica transformada con  $\log_2$  normalizada con la expresión de la proteína de CI PD-L1 y se representan gráficamente los valores de  $p$  ajustados (transformados con  $\log_{10}$ , eje y) y el tamaño del efecto de la asociación (eje x). Los genes estimulados por interferón gamma ("inducibles por IFNg") y los conjuntos de genes de T efectoras CD8 y de moléculas del punto de control inmunitario previamente informados estaban entre los más drásticamente regulados por incremento.

Las **FIGS. 1C y 1D** son una serie de gráficos que muestran una asociación entre la puntuación de firma de T efectores CD8 y CI con PD-L1 o la respuesta. Se representa gráficamente la puntuación de firma de T efectores CD8+ (eje y) frente a la puntuación de CI con PD-L1 (**fig. 1C**) y la categoría de respuesta (**fig. 1D**). Hubo una relación positiva significativa entre la puntuación de firma y tanto la tinción de CI con PD-L1 ( $p = 4,2 \times 10^{-35}$ ) como la respuesta a atezolizumab ( $p = 0,0087$ ). La asociación entre la firma de T efectores CD8 y la respuesta se impulsó por el grupo de RC, que tenía una firma de T efectores CD8 significativamente mayor (prueba de la t;  $p = 0,002$ ); las diferencias entre los otros tres grupos de respuesta no fueron significativas (análisis de varianza (ANOVA)  $p = 0,08$ ).

Las **FIGS. 1E y 1F** son una serie de gráficos que muestran la relación entre el estado de respuesta y la carga mutacional del tumor (CMT) o la carga de neoantígenos tumorales (TNB). Se muestran mutaciones por megabase (eje y) como se determina por el panel FOUNDATIONONE® de Foundation Medicine (también denominado en el presente documento "FMOne") (**fig. 1E**) o filtrado del exoma completo para aquellas mutaciones que se predice que serán neoantígenos expresados (**fig. 1F**). Ambas métricas se asocian positivamente con la respuesta a atezolizumab ( $p$  de Wilcoxon para mutaciones basadas en FMOne =  $1,4 \times 10^{-7}$ , para neoantígenos previstos =  $5,3 \times 10^{-9}$ ).

La **FIG. 1G** es un gráfico que muestra las vías KEGG enriquecidas en genes con una expresión que se correlaciona con CMT. Se muestran los valores de  $p$  ajustados con  $-\log_{10}$  para el enriquecimiento de conjuntos de genes KEGG significativamente (FDR  $< 0,05$ ) enriquecidos en genes que se correlacionan con CMT. Los conjuntos que se deduce que reflejan procesos biológicos subyacentes clave están coloreados como sigue: proliferación (turquesa), respuesta al daño en ADN (DDR) (fucsia), señalización de TGF- $\beta$  (naranja). Solo se muestran los siete genes principales por conjunto (clasificados por valor de  $p$  de un único gen).

La **FIG. 1H** es un gráfico que muestra la relación entre diferentes firmas de expresión génica, así como los valores de expresión de un único gen para MKI67, un marcador de proliferación. En la esquina izquierda, se visualiza la correlación entre las puntuaciones de firma/expresión génica; en la esquina derecha se dan los coeficientes de correlación de Pearson. Los miembros del conjunto de genes se da en la **tabla 10**. Véase el ejemplo 1 para obtener información con respecto al cálculo de puntuaciones de firma. Pan-F-TBRS: firma de respuesta de TGF- $\beta$  panfibroblástica.

Las **FIGS. 1I y 1J** son una serie de gráficos que muestran la expresión génica de la enzima de edición de ARNm de apolipoproteína B, similar al polipéptido catalítico (APOBEC) 3A (**fig. 1I**) y APOBEC3B (**fig. 1J**) y su asociación con la respuesta y CMT. Se muestran los recuentos transformados con  $\log_2$  normalizados para la expresión génica en los ejes y; se muestran las categorías de respuesta y CMT en los ejes x. Tanto APOBEC3A ( $p = 0,015$ ) como APOBEC3B ( $p = 0,0025$ ) presentaron una mayor expresión media en los pacientes que responden al tratamiento. Para CMT, se dan los coeficientes de correlación de Pearson y los valores de  $p$ . Se representan gráficamente líneas de tendencia para la relación entre la expresión génica y CMT. Para la **fig. 1J**, los dos valores atípicos de expresión extremos se excluyeron cuando se calculó la correlación entre la expresión génica y CMT.

La **FIG. 1K** es un gráfico que muestra que las mutaciones en los genes de DDR se asocian con CMT. Los genes están en filas y los pacientes están en columnas, con una mutación marcada con un rectángulo negro. El gráfico de barras superior representa CMT, con los pacientes ordenados de CMT alta a baja. Las filas inferiores representan el estado de mutación de toda la vía, con o sin inclusión de TP53. El porcentaje de pacientes que portan una mutación en un gen o vía se da a la izquierda.

La **FIG. 1L** es un gráfico que muestra el estado de mutación por conjunto para los genes de DDR frente a la respuesta. Los pacientes se marcaron como mutantes con DDR si albergaban una mutación en uno o más genes de DDR, excluyendo TP53. Se representa gráficamente la fracción de pacientes que responden al tratamiento (RC/RP) y pacientes que no responden al tratamiento (enfermedad estable (EE)/enfermedad progresiva (EP)) para estos dos subgrupos de pacientes. Hubo una asociación significativa entre el estado de mutación de DDR y la respuesta ( $p = 0,0117$ ).

La **FIG. 1M** es un gráfico que muestra que las mutaciones en los genes reguladores del ciclo celular se asocian con CMT. Se representan gráficamente los genes en filas y los pacientes en columnas, marcando a los pacientes con una mutación con un rectángulo negro. El gráfico de barras superior representa la CMT en cada paciente, con los pacientes ordenados de CMT alta a CMT baja. Las últimas filas representan el estado de mutación de la vía en su conjunto, con o sin TP53. Los porcentajes a la izquierda del gráfico indican prevalencia. Los genes con asociaciones de gen único significativas con CMT se marcan con un asterisco.

La **FIG. 1N** es un gráfico que muestra el estado de mutación en la vía de regulación del ciclo celular (RCC) por respuesta. Para cada paciente, se determinó si albergaba alguna mutación en un gen perteneciente a la vía RCC, excepto TP53. Si los pacientes albergaban mutación/mutaciones en el/los gen(es) de la vía RCC, se denominaban mutantes para la vía. De otro modo, se los consideraba no mutantes. Se representa gráficamente la fracción de pacientes que responden al tratamiento (RC/RP) y pacientes que no responden al tratamiento (EE/EP) para estos dos subgrupos de pacientes. Excluyendo TP53, no hubo asociación entre el estado de mutación de la vía RCC y la



respuesta ( $p = 0,31104$ ; **tabla 6**).

La **FIG. 1O** muestra las vías KEGG que se asocian significativamente con la respuesta a atezolizumab. Se muestran los valores de  $p$  ajustados con  $-\log_{10}$  para las vías KEGG significativamente ( $p_{aj.} < 0,1$ ) enriquecidas en genes asociados con la respuesta. Los conjuntos que se deduce que reflejan procesos biológicos subyacentes clave están coloreados: proliferación (turquesa), DDR (fucsia), señalización de TGF- $\beta$  (naranja). Solo se muestran los siete genes principales por conjunto (clasificados por valor de  $p$  de un único gen). Las listas completas de genes expresados diferencialmente se dan en la **tabla 3**.

La **FIG. 1P** es un gráfico que muestra que la firma del gen TGF- $\beta$  2 (eje y) compuesto de TGFB1 y TGFB2 se asoció significativamente con la falta de respuesta a atezolizumab ( $p = 9,6 \times 10^{-6}$ ).

La **FIG. 1Q** es una representación esquemática de la relación entre tres ejes centrales, los ensayos que exploran esos ejes y la respuesta del paciente.

La **FIG. 1R** es un gráfico que muestra la varianza expuesta en la respuesta del paciente. Los modelos lineales generalizados se ajustaron usando la respuesta binaria (RC/RP frente a EE/EP) como variable dependiente y puntuaciones de un aporte único o combinaciones de aportes (eje x) como variables independientes. La varianza porcentual expuesta de la respuesta se representa gráficamente en el eje y. Las comparaciones entre diferentes modelos se realizaron por medio de la prueba del cociente de verosimilitud. Un modelo que incluye marcadores tanto de ADN (CMT) como de ARN (conjuntos de T efector (Tef) CD8+ y de gen TGF- $\beta$  2) expuso un 42 % de la varianza observada en la respuesta y mejoró significativamente en todos los modelos de singulón.

La **FIG. 1S** es un gráfico que muestra la variación expuesta en la respuesta del paciente. Los modelos lineales generalizados se ajustaron usando la respuesta binaria (RC/RP frente a EE/EP) como variable dependiente y puntuaciones de un aporte único o combinaciones de aportes (eje x) como variables independientes. La varianza porcentual expuesta de la respuesta se representa gráficamente en el eje y. Las comparaciones entre diferentes modelos se realizaron por medio de una prueba de cociente de verosimilitud; un valor  $p$  significativo quiere decir que la variable adicional aportó información independiente al modelo. El modelo triple que incluye CMT, así como firmas de Tef y del gen TGF- $\beta$  2, expone un 42 % de la varianza observada en la respuesta y mejora significativamente todos los modelos de singulón y doble biología. Esto muestra que las tres biologías tienen un valor explicativo no redundante.

La **FIG. 1T** es un gráfico que muestra la variación expuesta en la respuesta del paciente. Los modelos lineales generalizados se ajustaron usando la respuesta binaria (RC/RP frente a EE/EP) como variable dependiente y puntuaciones de un aporte único o combinaciones de aportes (eje x) como variables independientes. La varianza porcentual expuesta de la respuesta se representa gráficamente en el eje y. Las comparaciones entre diferentes modelos se realizaron por medio de la prueba del cociente de verosimilitud. La asociación entre la CMT con la respuesta fue significativamente más fuerte que la de sus mediciones indirectas (expresión de APOBEC3B, expresión de MKI67 o mutación en miembros del conjunto DDR). La mutación del conjunto de genes de APOBEC3B y DDR no proporcionó información explicativa adicional que fuera independiente de la medición directa de CMT. La combinación de CMT con la expresión de MKI67 mejoró marginalmente con la CMT sola, posiblemente a través de la asociación negativa de MKI67 con TGF- $\beta$  (véase la **figura 1H**).

La **FIG. 1U** es un gráfico que muestra que los cuartiles de puntuación de firma de Tef ("cuart.") se asociaron con la supervivencia global (SG) ( $p = 0,0092$ ).

La **FIG. 1V** es un gráfico que muestra que CMT se asoció con la supervivencia general (SG) (prueba del cociente de verosimilitud,  $p = 2 \times 10^{-5}$ ).

La **FIG. 1W** es un gráfico que muestra que TNB se asoció con la SG (prueba del cociente de verosimilitud,  $p = 0,00015$ ).

La **FIG. 1X** es un gráfico que muestra que la expresión de TGFB1 se asoció con una respuesta objetiva ( $p = 0,0001$ ) desfavorable.

La **FIG. 1Y** es un gráfico que muestra que los cuartiles de expresión de TGFB1 se asociaron con una SG reducida.

La **FIG. 1Z** es una serie de gráficos que muestran que la expresión de MKI67 (panel izquierdo) y la puntuación de replicación del ADN (panel derecho) se asocian con la respuesta a atezolizumab.

La **FIG. 2A** es una matriz cromática que representa a todos los pacientes evaluados, ordenados por subtipo molecular y a continuación por respuesta. A modo de comparación, se da el estado de PD-L1 de las células inmunitarias (CI) y de las células tumorales (CT). Además, se muestran CMT y el estado de mutación (gris: pacientes sin datos de mutación) para genes clave de interés. Las filas de la matriz cromática muestran la expresión (puntuaciones Z) de genes de interés, agrupados en las siguientes vías: A: firma del gen FGFR3, B: firma

de Tef, C: mecanismo de procesamiento de antígenos, D: firma de punto de control inmunitario, E: MKI67 y genes del ciclo celular, F: histonas dependientes de la replicación del ADN, G: genes de reparación del daño en ADN, H: conjunto de genes de organización de la matriz extracelular (MEC), I: firma del gen TGF- $\beta$  2, J: firma de angiogénesis, K: marcadores de transición epitelio-mesenquimatosa (TEM) y L: genes de fibroblastos paraneoplásicos.

La **FIG. 2B** es un gráfico que muestra CMT (eje y) representada gráficamente frente a los subtipos de Lund (panel izquierdo) y de TCGA (panel derecho) (eje x). Los subtipos genómicamente inestable (prueba de Wilcoxon;  $p = 0,0002$ ) y luminal II de TCGA ( $p = 5,94 \times 10^{-5}$ ) de Lund tuvieron una mayor mediana de CMT. UroA: de tipo urotelial A, GU: genómicamente inestable, Inf.: infiltrado, UroB: de tipo urotelial B, SCCL: de tipo SCC.

La **FIG. 2C** es un gráfico que muestra a los pacientes divididos en subgrupos de baja CMT (gris) y alta CMT (negro), en base a la mediana de CMT, y la fracción de pacientes en estos dos subgrupos se muestra para cada uno de los subtipos moleculares de Lund (panel izquierdo) y de TCGA (panel derecho), respectivamente.

La **FIG. 2D** es un gráfico que muestra la fracción de pacientes en cada una de las categorías de respuesta indicadas, dividida entre el subtipo molecular de Lund. El subtipo GU tuvo una tasa de respuesta significativamente mayor en comparación con todos los demás subtipos (prueba exacta de Fisher;  $p = 1,6 \times 10^{-5}$ ).

La **FIG. 2E** es un gráfico que muestra la fracción de pacientes en cada una de las categorías de respuesta indicadas, dividida entre el subtipo de TCGA. Aunque el subgrupo luminal II logró la tasa de respuesta más alta, consecuente con los resultados informados previamente solo para la cohorte resistente al platino, la diferencia entre luminal II frente a otros subtipos no fue significativa (prueba exacta de Fisher;  $p = 0,12$ ).

La **FIG. 2F** es un gráfico que muestra que TGF- $\beta$  es un probable impulsor de la respuesta diferencial en los subtipos GU de Lund y luminal II de TCGA. El diagrama de Venn representa los tres subgrupos analizados en detalle adicionalmente: (i) Lund subtipificado como GU pero no luminal II de TCGA (solo GU), (ii) ambos GU de Lund luminal II (GU y II) o (iii) luminal II, pero no GU (solo II). La matriz cromática muestra la evaluación de las firmas de Tef CD8 y del gen TGF- $\beta$  2, así como CMT en estos subgrupos (columnas). Las biología de interés (filas) se ajustaron a escala antes de calcular las medianas entre los grupos. Rojo quiere decir alto, azul quiere decir bajo. La respuesta difirió significativamente entre los tres subgrupos ( $p = 0,00062$ ), como se muestra en el gráfico de barras: mientras que "solo GU" y "GU y II" tienen una alta fracción de pacientes que responden al tratamiento parcialmente y/o completamente, "solo II" muestra una respuesta limitada. Tef – TGF- $\beta$  indica la puntuación de firma de Tef CD8 menos la puntuación de firma del gen TGF- $\beta$  2.

La **FIG. 2G** es una matriz cromática que muestra la evaluación de la expresión de MKI67 y las firmas de interés, así como CMT en relación con los subtipos moleculares. Las biología de interés se ajustaron a escala antes de calcular las medianas en todos los subtipos moleculares (columnas) de Lund (izquierda) y de TCGA (derecha). Rojo quiere decir alto, azul quiere decir bajo. Rep. de ADN: replicación del ADN.

La **FIG. 2H** es una matriz cromática que muestra una comparación entre los esquemas de subtipificación de Lund y TCGA. La matriz cromática representa a todos los pacientes evaluados, excepto los pacientes sin respuesta definida, dispuestos en columnas y ordenados en primer lugar por subtipo molecular, a continuación por respuesta a atezolizumab. Para el panel de la izquierda, los pacientes se ordenaron en base a un esquema de subtipificación basado en TCGA; para el panel de la derecha, los pacientes se ordenaron por un esquema de subtipificación basado en Lund (como la **fig. 2A**). Se dan los estados de PD-L1 en CI y CT. Además, se muestran CMT y el estado de mutación (mutado, negro o bien no mutado, blanco; el gris indica pacientes sin datos de mutación) para unos pocos genes de interés. Las filas de la matriz cromática muestran la expresión (puntuaciones z) de genes de interés, agrupados en las siguientes biología/vías: TCGA: genes de subtipo de TCGA, A: firma del gen FGFR3, B: firma de Tef, C: mecanismo de procesamiento de antígenos, D: firma de punto de control inmunitario, E: MKI67 y genes del ciclo celular, F: histonas dependientes de la replicación del ADN, G: genes de reparación del daño en ADN, H: conjunto de genes de MEC, I: firma del gen TGF $\beta$  dos, J: firma de angiogénesis, K: marcadores de TEM y L: genes de pan-F-TBRS (para obtener detalles sobre estas firmas, véase el ejemplo 1).

La **FIG. 3A** es una serie de imágenes que muestran la histología de los tres fenotipos inmunitarios de tumor: con "desierto" inmunitario, con "exclusión" inmunitaria y con "inflamación" inmunitaria. La clasificación de los tumores en una de las tres entidades inmunofenotípicas se realizó en cortes fijados con formol e incluidos en parafina (FFIP) teñidos inmunohistoquímicamente para detectar la presencia de linfocitos T CD8+. La clasificación se basó en la prevalencia de células CD8+, así como en el patrón de infiltración con respecto a las células epiteliales malignas. Los tumores se clasificaron como "desiertos" cuando la prevalencia de células CD8+ era baja ( $< 10$  células CD8+ en un área de tumor y estroma asociado al tumor con un aumento de 200x; en muestras más grandes, esto se calculó como el promedio de 10 campos visuales representativos). Los tumores se clasificaron como "excluidos" si se observaban exclusivamente las células CD8+ en el estroma de inmediato contiguo o dentro de la masa tumoral principal. Los tumores se clasificaron como "inflamados" si se observaban células CD8+ en contacto directo con células epiteliales malignas, en forma de desbordamiento de infiltrados estromales en agregados de células tumorales o bien de infiltración difusa de células CD8+ en agregados o láminas de células tumorales. Como estos

rasgos característicos se observaban con frecuencia de manera focal, cualquier observación de este tipo en una lesión tumoral dio lugar a una clasificación como "inflamada". HyE, tinción con hematoxilina y eosina.

La **FIG. 3B** es una imagen que muestra tinción IHQ-tricrómica de CD8 combinada realizada en cortes FFIP para visualizar la distribución espacial de los linfocitos T CD8+ y el estroma colagenoso. Los linfocitos T CD8+ delineados por tinción con 3,3'-diaminobencidina (DAB) (marrón) se localizan principalmente dentro del estroma colagenoso (azul) (flechas blancas). Entre las células tumorales (flechas verdes) se intercalan escasos linfocitos T CD8+.

Las **FIGS. 3C y 3D** son una serie de gráficos que muestran la relación entre las puntuaciones de firma del gen TGF- $\beta$  2 y de firma de respuesta de TGF- $\beta$  panfibroblástica (pan-F-TBRS) y el estado de respuesta dentro de cada grupo de fenotipo inmunitario de tumor. Las puntuaciones de firma del gen TGF- $\beta$  2 (**fig. 3C**) o de pan-F-TBRS (**fig. 3D**) (eje y) se representan gráficamente por fenotipo inmunitario y grupo de respuesta. La **fig. 3C** muestra que la firma del gen TGF- $\beta$  2 fue comparable en todos los fenotipos inmunitarios, pero se asoció significativamente con la respuesta solo en el fenotipo excluido (p aj. =  $5,7 \times 10^{-5}$ ; valores de p de la prueba de la t corregidos por Bonferroni para tres pruebas). Una prueba de cociente de verosimilitud para la interacción confirmó una relación específica de fenotipo entre la firma de TGF- $\beta$  y la respuesta (p = 0,02251). La **fig. 3D** muestra que la pan-F-TBRS se asoció significativamente con la respuesta solo en el fenotipo excluido (p aj. = 0,0066; valores de p de la prueba de la t corregidos por Bonferroni para tres pruebas).

La **FIG. 3E** es un gráfico que muestra CMT (eje y) representada gráficamente frente al fenotipo inmunitario de tumor. No hubo diferencias significativas en CMT entre los fenotipos inmunitarios frente al cáncer (p de Kruskal Wallis = 0,091).

La **FIG. 4A** es una serie de imágenes que muestran colágeno (verde) y linfocitos T (CD3, rojo) en tumores EMT6 teñidos por inmunofluorescencia.

La **FIG. 4B** es un gráfico que muestra la cuantificación del ARN de TGF- $\beta$  y PD-L1 en tumores EMT6 completos por secuenciación de ARN (RNAseq). Los tumores se inocularon ortotópicamente y se extrajeron cuando el volumen alcanzó los 300 mm<sup>3</sup> (N = 5; datos de un experimento).

La **FIG. 4C** es un gráfico que muestra la cuantificación de la proteína TGF- $\beta$  dentro de tumores EMT6 completos por un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA). Los tumores se extrajeron 14 días después de la inoculación, se ultracongelaron y se lisaron para la cuantificación de proteínas (N = 4; datos de un experimento).

Las **FIGS. 4D-4F** son una serie de gráficos que muestran los resultados de estudios en los que se inocularon ortotópicamente células tumorales de EMT6 en ratones BALB/c en el cuerpo adiposo mamario. Cuando los volúmenes del tumor alcanzaron  $\approx 160$  mm<sup>3</sup> (media  $\pm$  DE,  $161,8 \pm 20,2$  mm<sup>3</sup>) aproximadamente ocho días después de la inoculación, los ratones se trataron con control de isotipo, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-TGF- $\beta$  o una combinación de un anticuerpo anti-PD-L1 con un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ . Los tumores se midieron dos veces por semana durante aproximadamente ocho semanas con un calibrador. Cuando los volúmenes del tumor descendieron por debajo de 32 mm<sup>3</sup> (el límite más bajo de detección), se consideraron como RC (un 100 % de inhibición del crecimiento tumoral). La **fig. 4D** muestra el porcentaje de RC en 2-6 estudios independientes. \*\*\*\*p < 0,0001 por ANOVA unifactorial, prueba de comparaciones múltiples de Sidak. La **fig. 4E** muestra curvas de crecimiento tumoral para cada ratón individual. Los datos proceden de un experimento representativo de seis experimentos independientes con 10 ratones/grupo. La **fig. 4F** muestra el cambio en el volumen del tumor en comparación con el valor de referencia (inicio del tratamiento). Los datos proceden de un experimento representativo de 6 experimentos independientes con 10 ratones/grupo.

La **FIG. 4G** es una serie de imágenes que muestran la distribución de linfocitos infiltrantes de tumor (LIT) evaluados por IHQ y formación de imágenes digitales siete días después del inicio del tratamiento como se describe en las **figs. 4D-4F**. Marrón indica tinción de CD3 representativa. Barra de escala, 100 micrómetros.

Las **FIGS. 4H-4J** son una serie de gráficos que muestran la enumeración citofluorimétrica de LIT siete días después del inicio del tratamiento como se describe con respecto a las **figs. 4D-4F**. Se muestran la abundancia de linfocitos T totales (**fig. 4H**), linfocitos T CD8+ (**fig. 4I**) y la intensidad de fluorescencia media (IFM) de la granzima B en linfocitos T CD8+ (**fig. 4J**) (N = 15 para todos los grupos, excepto el anticuerpo anti-TGF- $\beta$  solo en el que N = 10; datos de tres experimentos combinados expresados como múltiplo de variación en relación con el promedio de células/mg de isotipo). \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*\*p < 0,0001 por ANOVA unifactorial, prueba de comparaciones múltiples de Sidak.

La **FIG. 4K** es un gráfico que muestra la cuantificación de la localización de LIT siete días después del inicio del tratamiento como se describe en las **figs. 4D-4F**. Los linfocitos T se tiñeron por IHQ (como en la **fig. 4G**) y se analizó digitalmente su localización. Las distancias medias normalizadas de los linfocitos T CD3 de la periferia del tumor se muestran como porcentajes (N = 19-20; datos de tres experimentos combinados). \*\*\*\*p < 0,0001 por la prueba de comparación múltiple HSD de Tukey.

La **FIG. 4L** es un gráfico que muestra el análisis de fosfoflujo de SMAD2/3 en tumores siete días después del inicio del tratamiento como se describe en las **figs. 4D-4F**. Se muestra la IFM de fosfo-SMAD2/3 entre las células totales, células CD45- y CD45+. Los datos se expresan como múltiplo de variación (FC) en relación con el promedio de IFM de isotipo. 10 ratones/grupo de dos experimentos combinados. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ , ANOVA unifactorial, prueba de comparaciones múltiples de Dunnett, en comparación con el isotipo.

La **FIG. 4M** es un gráfico que muestra la cuantificación de la proteína VEGF-A en el plasma por ELISA siete días después del inicio del tratamiento como se describe en las **figs. 4D-4F**. N=8 de un experimento.  $p = 0,0194$ , ANOVA unifactorial, prueba de comparaciones múltiples de Dunnett, en comparación con el isotipo.

La **FIG. 4N** es un gráfico que muestra el análisis citofluorimétrico de linfocitos T siete días después del inicio del tratamiento como se describe en las **figs. 4D-4F**. Se muestra el porcentaje de linfocitos T CD8 GzmB+. N=15 para todos los grupos excepto para anti-TGF- $\beta$  solo, en el que N=10. Estos datos provienen de tres experimentos combinados expresados como múltiplo de variación en relación con el promedio de células/mg de isotipo. \*\*,  $p < 0,01$  de ANOVA unifactorial, prueba de comparaciones múltiples de Sidak.

La **FIG. 4O** es un gráfico que muestra la distribución de LIT como se evalúa por inmunohistoquímica y formación de imágenes digitales siete días después del inicio del tratamiento como se describe en las **figs. 4D-4F**. Marrón indica tinción de CD3 representativa. Barra de escala, 500 micrómetros.

Las **FIGS. 4P-4S** son una serie de gráficos que muestran el análisis de RNAseq en tumores completos extraídos siete días después del inicio del tratamiento como se describe en las **figs. 4D-4F**. Se muestran las puntuaciones de Tef (**fig. 4P**), pan-F-TBRS (**fig. 4Q**), firmas de linfocitos T y macrófagos (**fig. 4R**) y la proporción de Tef con respecto a pan-F-TBRS (**fig. 4S**) en diferentes grupos de tratamiento. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

La **FIG. 4T** es una matriz cromática que muestra la expresión de genes de Tef y de remodelación de fibroblastos paraneoplásicos (FAC) después del inicio del tratamiento como se describe con respecto a las **figs. 4D-4F**. La administración terapéutica de anti-TGF- $\beta$  en combinación con anti-PD-L1 promovió la infiltración de linfocitos T y la remodelación de FAC, dando como resultado respuestas completas.

La **FIG. 4U** es una serie de gráficos que muestran la expresión de los genes indicados después del inicio del tratamiento como se describe con respecto a las **figs. 4D-4F**. La administración terapéutica de anti-TGF- $\beta$  en combinación con anti-PD-L1 dio como resultado una expresión incrementada de genes de Tef, incluyendo IFNG, GZMB y ZAP70 (parte superior) y una expresión disminuida de genes de FAC, incluyendo LOXL2, TNC y POSTN (parte inferior). RPKM, lecturas por kilobase por millón de lecturas cartografiadas.

La **FIG. 5** es un diagrama de Venn que muestra la superposición de las poblaciones de pacientes con eficacia evaluable con datos de transcriptoma completo (RNAseq), FMOne, fenotipado inmunitario frente al cáncer y secuenciación del exoma completo (SEC) ( $n = 326$  para uno o más de estos ensayos). Para los análisis de expresión génica con respecto a la respuesta, se usó el conjunto de datos de RNAseq completo ( $n = 298$ ). Para los análisis de expresión génica en el contexto de CMT o fenotipo inmunitario, se usó la intersección entre RNAseq y FMOne ( $n = 237$ ) o fenotipo inmunitario ( $n = 244$ ), respectivamente. Para el análisis de mutaciones alrededor de los fenotipos inmunitarios, se usó la intersección entre FMOne y el fenotipo inmunitario ( $n = 220$ ). Para las asociaciones entre la respuesta o el estado de mutación de los genes con CMT, se usó el conjunto de datos de FMOne completo ( $n = 251$ ).

Las **FIGS. 6A-6C** son una serie de gráficos que muestran que la alta expresión de la firma de 6 genes ("6TBRS") se asocia con un pronóstico desfavorable (**fig. 6A**) y sin beneficios de la monoterapia con atezolizumab (**figs. 6B y 6C**). La **fig. 6A** muestra datos del conjunto de datos de cáncer colorrectal del TCGA para la firma de 6 genes, TGFB1, TGFB2 y TGFB3. La **fig. 6B** muestra datos del conjunto de datos de CU de IMvigor210 para la firma de 6 genes, TGFB1, TGFB2 y TGFB3. La **fig. 6C** muestra datos del conjunto de datos de CPNM de POPLAR para TGFB1+TGFB2 y la firma de 6 genes.

La **FIG. 7A** es un gráfico que muestra que la expresión de la firma de 6 genes (también denominada en este documento "curTBRS") se asocia con la falta de respuesta a atezolizumab.

La **FIG. 7B** es un gráfico que muestra que la alta expresión de la firma de 6 genes está enriquecida en el subtipo molecular de CMS4, un subgrupo de pacientes con CaCR con una supervivencia desfavorable.

Las **FIGS. 8A-8C** son una serie de gráficos que muestran que una alta CMT y puntuaciones altas de CI con PD-L1 se asocian con un beneficio de SG mejorado con el tratamiento con atezolizumab. La **fig. 8A** muestra SG por estado de PD-L1; la **fig. 8B** muestra SG por estado de CMT; y la **fig. 8C** muestra SG por estado de CI con PD-L1 y CMT combinados.

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona procedimientos y usos diagnósticos, que incluyen, pero sin limitarse a, un cáncer de vejiga (por ejemplo, CU, por ejemplo, CUM), un cáncer de riñón (por ejemplo, CCR), un cáncer de pulmón (por ejemplo, CPNM), un cáncer de hígado, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas (por ejemplo, ACDP), un cáncer colorrectal o un cáncer de mama. La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que se puede usar el nivel de expresión de los genes TGFB1, TGFB2, ACTA2, ADAM19, COMP y CTGF, en una muestra obtenida de un individuo que tiene un cáncer (por ejemplo, cáncer de vejiga (por ejemplo, CU, por ejemplo, CUM), un cáncer de riñón (por ejemplo, CCR), un cáncer de pulmón (por ejemplo, CPNM), un cáncer de hígado, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas (por ejemplo, ACDP), un cáncer colorrectal o un cáncer de mama) como biomarcador (incluyendo, pero sin limitarse a, un biomarcador predictivo y/o un biomarcador farmacodinámico) en procedimientos de identificación de si el individuo se puede beneficiar o es probable que responda al tratamiento con un tratamiento antineoplásico que incluye atezolizumab y un anticuerpo de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecífico como antagonista de TGF- $\beta$ ;

seleccionar un tratamiento para tratar al individuo; optimizar la eficacia terapéutica de un tratamiento que incluye un tratamiento antineoplásico que incluye atezolizumab y un anticuerpo de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecífico como antagonista de TGF- $\beta$ ;

y/o realizar un seguimiento de la respuesta del individuo a un tratamiento que incluye un tratamiento antineoplásico que incluye atezolizumab y un anticuerpo de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecífico como antagonista de TGF- $\beta$ .

**I. Definiciones**

Se ha de entender que los aspectos y modos de realización de la invención descrita en el presente documento incluyen "que comprende(n)", "que consiste(n) en" y "que consiste(n) esencialmente en" aspectos y modos de realización. Como se usa en el presente documento, la forma en singular "un", "una" y "el/la" incluye referencias al plural a menos que se indique de otro modo.

El término "aproximadamente" como se usa en el presente documento se refiere al intervalo de error habitual para el respectivo valor fácilmente conocido para el experto en este campo técnico. La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) modos de realización que se refieren a ese valor o parámetro por se.

El término "biomarcador" como se usa en el presente documento se refiere a un indicador, por ejemplo, predictivo, diagnóstico y/o pronóstico, que se puede detectar en una muestra. El biomarcador puede servir como un indicador de un subtipo particular de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) caracterizado por determinados rasgos característicos moleculares, patológicos, histológicos y/o clínicos. En algunos modos de realización, un biomarcador es un gen. Los biomarcadores incluyen, pero no se limitan a, polinucleótidos (por ejemplo, ADN y/o ARN), alteraciones del número de copias de polinucleótidos (por ejemplo, números de copias de ADN), polipéptidos, modificaciones polipeptídicas y polinucleotídicas (por ejemplo, modificaciones postraduccionales), carbohidratos y/o marcadores moleculares a base de glucolípidos.

Dichos biomarcadores incluyen, pero no se limitan a, TGFB1, TGFB2, ACTA2, ACTG2, ADAM12, ADAM19, COMP, CNN1, COL4A1, CTGF, CTPS1, FAM101B, FSTL3, HSPB1, IGFBP3, PXDC1, SEMA7A, SH3PXD2A, TAGLN, TGFB1, TNS1 y TPM1. En algunos modos de realización, el biomarcador es uno o más biomarcadores seleccionado del grupo que consiste en ACTA2, ADAM19, COMP, CTGF, TGFB1 y TGFB2. En otros modos de realización, el biomarcador es uno o más biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en ACTA2, ACTG2, ADAM12, ADAM19, CNN1, COL4A1, CTGF, CTPS1, FAM101B, FSTL3, HSPB1, IGFBP3, PXDC1, SEMA7A, SH3PXD2A, TAGLN, TGFB1, TNS1 y TPM1. Se puede determinar que la expresión de un biomarcador de este tipo es mayor o menor en una muestra obtenida de un paciente sensible o que responde a un tratamiento (por ejemplo, tratamiento con un tratamiento antineoplásico que incluye una inmunoterapia (por ejemplo, un antagonista de unión al eje PD-L1, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab)) y un antagonista estromal supresor (por ejemplo, un antagonista de TGF- $\beta$ , por ejemplo, un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ )) que un nivel de referencia (incluyendo, por ejemplo, la mediana del nivel de expresión del biomarcador en una muestra de un grupo/población de pacientes, por ejemplo, pacientes que tienen cáncer, y que se están sometiendo a prueba para detectar su reactividad a un tratamiento; la mediana del nivel de expresión del biomarcador en una muestra de un grupo/población de pacientes, por ejemplo, pacientes que tienen cáncer e identificados como que no responden a un tratamiento; el nivel en una muestra obtenida previamente del individuo en un tiempo anterior; o el nivel en una muestra de un paciente que recibió tratamiento anterior (por ejemplo, tratamiento con un tratamiento antineoplásico que incluye una inmunoterapia (por ejemplo, un antagonista de unión al eje PD-L1, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab)) y un antagonista estromal supresor (por ejemplo, un antagonista de TGF- $\beta$ , por ejemplo, un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ )) en un entorno del tumor primario, y que ahora puede estar experimentando metástasis).

- Los términos "firma de biomarcador", "firma", "firma de expresión de biomarcador" o "firma de expresión" se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a uno o una combinación de biomarcadores con una expresión que es un indicador, por ejemplo, predictivo, diagnóstico y/o pronóstico. La firma de biomarcador puede servir como un indicador de un subtipo particular de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer)
- 5 caracterizado por determinados rasgos característicos moleculares, patológicos, histológicos y/o clínicos. En algunos modos de realización, la firma de biomarcador es una "firma génica". El término "firma génica" se usa de manera intercambiable con "firma de expresión génica" y se refiere a uno o una combinación de polinucleótidos con una expresión que es un indicador, por ejemplo, predictivo, diagnóstico y/o pronóstico. En algunos modos de
- 10 realización, la firma de biomarcador es una "firma de proteína". El término "firma de proteína" se usa de manera intercambiable con "firma de expresión de proteína" y se refiere a uno o una combinación de polipéptidos con una expresión que es un indicador, por ejemplo, predictivo, diagnóstico y/o pronóstico. La firma de biomarcador de la presente invención comprende ACTA2, ADAM19, COMP CTGF, TGFB1 y TGFB2, que también se denomina en el presente documento "firma de 6 genes".
- 15 El término "TGFB1", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier TGFB1 natural (factor de crecimiento y transformación beta 1) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba TGFB1 sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de TGFB1 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de TGFB1, por ejemplo,
- 20 variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de ácido nucleico de un TGFB1 humano ejemplar se muestra en la secuencia de referencia de NCBI: NM\_000660.6 o en SEQ ID NO: 1. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por TGFB1 humano se muestra en el n.º de acceso de UniProt P01137 o en la SEQ ID NO: 2.
- 25 El término "TGFB2", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier TGFB2 natural (receptor del factor de crecimiento y transformación beta 2; también conocido como TGFR-2 o TGFbeta-R11) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba TGFB2 sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de TGFB2 que resulte del procesamiento en la célula. El término también
- 30 engloba variantes naturales de TGFB2, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de ácido nucleico de un TGFB2 humano ejemplar se muestra en la secuencia de referencia de NCBI: NM\_001024847 o en SEQ ID NO: 3. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por TGFB2 humano se muestra en el n.º de acceso de UniProt P37173 o en la SEQ ID NO: 4.
- 35 El término "ACTA2", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier ACTA2 natural (alfa-actina-2, también conocida como actina del músculo liso o alfa actina del músculo liso) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba ACTA2 sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de ACTA2 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes
- 40 naturales de ACTA2, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de ácido nucleico de un ACTA2 humano ejemplar se muestra en la secuencia de referencia de NCBI: NM\_001141945 o en SEQ ID NO: 5. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por ACTA2 humano se muestra en el n.º de acceso de UniProt P62736 o en la SEQ ID NO: 6.
- 45 El término "ACTG2", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier ACTG2 natural (gamma actina de músculo liso intestinal, también conocida como gamma actina 2) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba ACTG2 sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de ACTG2 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de
- 50 ACTG2, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de ácido nucleico de un ACTG2 humano ejemplar se muestra en la secuencia de referencia de NCBI: NM\_001615 o en SEQ ID NO: 7. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por ACTG2 humano se muestra en el n.º de acceso de UniProt P63267 o en la SEQ ID NO: 8.
- 55 El término "ADAM12", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier ADAM12 natural (una proteína 12 que contiene los dominios de desintegrina y metaloproteinasas, también conocida como dominio de metalopeptidasa de ADAM 12, MCMP, CAR10 y MLTN) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba ADAM12 sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma
- 60 de ADAM12 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de ADAM12, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. Las variantes de empalme incluyen ADAM12-L, que tiene una región transmembranaria y ADAM12-S, una variante más corta, que es soluble y carece de los dominios transmembranario y citoplásmico. La secuencia de ácido nucleico de un ADAM12 humano ejemplar se muestra en la secuencia de referencia de NCBI: NM\_003474 o en SEQ ID NO: 9. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por ADAM12 humano se muestra en el n.º de acceso de UniProt O43184 o en la
- 65 SEQ ID NO: 10.

El término "ADAM19", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier ADAM19 natural (una proteína 19 que contiene los dominios de desintegrina y metaloproteínasa; también conocida como MADDAM o meltrina beta) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba ADAM19 sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de ADAM 19 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de ADAM19, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de ácido nucleico de un ADAM19 humano ejemplar se muestra en la secuencia de referencia de NCBI: NM\_033274 o en SEQ ID NO: 11. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por ADAM19 humano se muestra en el n.º de acceso de UniProt Q9H013 o en la SEQ ID NO: 12.

El término "COMP", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier COMP natural (proteína oligomérica de la matriz del cartílago; también conocida como trombospondina 5) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba COMP sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de COMP que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de COMP, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de ácido nucleico de un COMP humano ejemplar se muestra en la secuencia de referencia de NCBI: NM\_000095 o en SEQ ID NO: 81. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por COMP humano se muestra en el n.º de acceso de UniProt P49747 o en la SEQ ID NO: 82.

El término "CNN1", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier CNN1 natural (calponina 1) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba CNN1 sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de CNN1 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de CNN1, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de ácido nucleico de un CNN1 humano ejemplar se muestra en la secuencia de referencia de NCBI: NM\_001299 o en SEQ ID NO: 13. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por CNN1 humano se muestra en el n.º de acceso de UniProt P51911 o en la SEQ ID NO: 14.

El término "COL4A1", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier COL4A1 natural (colágeno de tipo IV alfa 1, también conocido como cadena de colágeno alfa-1(IV)) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba COL4A1 sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de COL4A1 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de COL4A1, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de ácido nucleico de un COL4A1 humano ejemplar se muestra en la secuencia de referencia de NCBI: NM\_001845 o en SEQ ID NO: 15. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por COL4A1 humano se muestra en el n.º de acceso de UniProt P02462 o en la SEQ ID NO: 16.

El término "CTGF", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier CTGF natural (factor de crecimiento del tejido conjuntivo, también conocido como CCN2 o IGFBP8) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba CTGF sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de CTGF que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de CTGF, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de ácido nucleico de un CTGF humano ejemplar se muestra en la secuencia de referencia de NCBI: NM\_001901 o en SEQ ID NO: 17. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por CTGF humano se muestra en el n.º de acceso de UniProt P29279 o en la SEQ ID NO: 18.

El término "CTPS1", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier CTPS1 natural (CTP sintasa 1) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba CTPS1 sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de CTPS1 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de CTPS1, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de ácido nucleico de un CTPS1 humano ejemplar se muestra en la secuencia de referencia de NCBI: NM\_001905 o en SEQ ID NO: 19. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por CTPS1 humano se muestra en el n.º de acceso de UniProt P17812 o en la SEQ ID NO: 20.

El término "FAM101B", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier FAM101B natural (miembro B de la familia con similitud de secuencia 101, también conocida como proteína de interacción de filamina FAM101B, refilina B o RFLNB) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba FAM101B sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de FAM101B que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de FAM101B, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de ácido nucleico de un FAM101B humano ejemplar se

muestra en la secuencia de referencia de NCBI: NM\_182705 o en SEQ ID NO: 21. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por FAM101B humano se muestra en el n.º de acceso de UniProt Q8N5W9 o en la SEQ ID NO: 22.

5 El término "FSTL3", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier FSTL3 natural (proteína 3 relacionada con folistatina) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba FSTL3 sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de FSTL3 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de FSTL3, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de ácido nucleico de un FSTL3 humano ejemplar se muestra en la  
10 secuencia de referencia de NCBI: NM\_005860 o en SEQ ID NO: 23. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por FSTL3 humano se muestra en el n.º de acceso de UniProt O95633 o en la SEQ ID NO: 24.

15 El término "HSPB1", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier HSPB1 natural (proteína de choque térmico beta-1, también conocida como proteína de choque térmico 27 o HSP27) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba HSPB1 sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de HSPB1 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de HSPB1, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de  
20 ácido nucleico de un HSPB1 humano ejemplar se muestra en la secuencia de referencia de NCBI: NM\_001540 o en SEQ ID NO: 25. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por HSPB1 humano se muestra en el n.º de acceso de UniProt P04792 o en la SEQ ID NO: 26.

25 El término "IGFBP3", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier IGFBP3 natural (proteína 3 de unión al factor de crecimiento insulínico, también conocida como BP-53 o IBP3) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba IGFBP3 sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de IGFBP3 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de IGFBP3, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de ácido nucleico de  
30 un IGFBP3 humano ejemplar se muestra en la secuencia de referencia de NCBI: NM\_001013398 o en SEQ ID NO: 27. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por IGFBP3 humano se muestra en el n.º de acceso de UniProt P17936 o en la SEQ ID NO: 28.

35 El término "PXDC1", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier PXDC1 natural (proteína 1 que contiene el dominio PX) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba PXDC1 sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de PXDC1 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de PXDC1, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de ácido nucleico de un PXDC1 humano ejemplar se muestra en la  
40 secuencia de referencia de NCBI: NM\_183373 o en SEQ ID NO: 29. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por PXDC1 humano se muestra en el n.º de acceso de UniProt Q5TGL8 o en la SEQ ID NO: 30.

45 El término "SEMA7A", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier SEMA7A natural (semaforina 7A, también conocida como CD108 o antígeno del grupo sanguíneo de John-Milton-Hagen) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba SEMA7A sin procesar "de longitud completa" así como cualquier forma de SEMA7A que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de SEMA7A, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de  
50 ácido nucleico de un SEMA7A humano ejemplar se muestra en la secuencia de referencia de NCBI: NM\_003612 o en SEQ ID NO: 31. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por SEMA7A humano se muestra en el n.º de acceso de UniProt O75326 o en la SEQ ID NO: 32.

55 El término "SH3PXD2A", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier SH3PXD2A natural (proteína 2A que contiene el dominio PX y SH3) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba SH3PXD2A sin procesar "de longitud completa" así como cualquier forma de SH3PXD2A que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de SH3PXD2A, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de ácido nucleico de un SH3PXD2A humano ejemplar se muestra en la secuencia de referencia de NCBI: NM\_014631 o en SEQ ID NO:  
60 33. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por SH3PXD2A humano se muestra en el n.º de acceso de UniProt Q5TCZ1 o en la SEQ ID NO: 34.

65 El término "TAGLN", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier TAGLN natural (transgelina) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba TAGLN sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de TAGLN que resulte del procesamiento en la célula. El



término también engloba variantes naturales de TAGLN, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de ácido nucleico de un TAGLN humano ejemplar se muestra en la secuencia de referencia de NCBI: NM\_001001522 o en SEQ ID NO: 35. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por TAGLN humano se muestra en el n.º de acceso de UniProt Q01995 o en la SEQ ID NO: 36.

El término "TGFB1", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier TGFB1 natural (factor de crecimiento y transformación, beta-inducido) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba TGFB1 sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de TGFB1 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de TGFB1, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de ácido nucleico de un TGFB1 humano ejemplar se muestra en la secuencia de referencia de NCBI: NM\_000358 o en SEQ ID NO: 37. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por TGFB1 humano se muestra en el n.º de acceso de UniProt Q15582 o en la SEQ ID NO: 38.

El término "TNS1", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier TNS1 natural (tensina 1) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba TNS1 sin procesar "de longitud completa" así como cualquier forma de TNS1 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de TNS1, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de ácido nucleico de un TNS1 humano ejemplar se muestra en la secuencia de referencia de NCBI: NM\_022648 o en SEQ ID NO: 39. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por TNS1 humano se muestra en el n.º de acceso de UniProt Q9HBL0 o en la SEQ ID NO: 40.

El término "TPM1", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier TPM1 natural (cadena alfa-1 de tropomiosina) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba TPM1 sin procesar "de longitud completa" así como cualquier forma de TPM1 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de TPM1, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. El gen TPM1 humano codifica al menos 10 variantes por medio de corte y empalme alternativo y/o el uso de dos promotores. La secuencia de ácido nucleico de un TPM1 humano ejemplar se muestra en la secuencia de referencia de NCBI: NM\_001018005.1 o en SEQ ID NO: 41. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por TPM1 humano se muestra en el n.º de acceso de UniProt P09493 o en la SEQ ID NO: 42. Las secuencias de isoformas de la proteína TPM1 humana se muestran en los n.ºs de acceso de UniProt P09493-1, P09493-2, P09493-3, P09493-4, P09493-5, P09493-6, P09493-7, P09493-8, P09493-9 y P09493-10. En algunos modos de realización, la proteína TPM1 humana tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en el n.º de acceso de UniProt P09493-1.

El término "CD8A", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier CD8A natural de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba CD8A sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de CD8A que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de CD8A, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de ácido nucleico de un CD8A humano ejemplar se muestra en el n.º de acceso de EMBL M12824 o en la SEQ ID NO: 43. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por CD8A humano se muestra en el n.º de acceso de UniProt P01732-1 o en la SEQ ID NO: 44.

El término "CXCL9", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier CXCL9 natural (ligando 9 de quimiocina (motivo C-X-C)) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba CXCL9 sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de CXCL9 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de CXCL9, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de ácido nucleico de un CXCL9 humano ejemplar se expone en la SEQ ID NO: 45. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por CXCL9 humano se muestra en la SEQ ID NO: 46.

El término "CXCL10", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier CXCL10 natural (ligando 10 de quimiocina (motivo C-X-C)) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba CXCL10 sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de CXCL10 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de CXCL10, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de ácido nucleico de un CXCL10 humano ejemplar se expone en la SEQ ID NO: 47. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por CXCL10 humano se muestra en la SEQ ID NO: 48.

El término "GZMA", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier GZMA natural (granzima A) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba GZMA sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de GZMA que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de GZMA, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de ácido nucleico de un GZMA humano ejemplar se expone en la SEQ ID NO: 49. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por GZMA humano se muestra en la SEQ ID NO: 50.

El término "GZMB", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier GZMB natural (granzima B) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba GZMB sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de GZMB que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de GZMB, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de ácido nucleico de un GZMB humano ejemplar se expone en la SEQ ID NO: 51. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por GZMB humano se muestra en la SEQ ID NO: 52.

El término "PRF1", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier PRF1 natural (perforina 1; también conocida como proteína formadora de poros) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba PRF1 sin procesar "de longitud completa" así como cualquier forma de PRF1 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de PRF1, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de ácido nucleico de un PRF1 humano ejemplar se expone en la SEQ ID NO: 53. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por PRF1 humano se muestra en la SEQ ID NO: 54.

El término "IFNG", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier IFNG natural (interferón, gamma; también denominado en el presente documento como IFN- $\gamma$ ) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba IFNG sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de IFNG que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de IFNG, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de ácido nucleico de un IFNG humano ejemplar se expone en la SEQ ID NO: 55. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por IFNG humano se muestra en la SEQ ID NO: 56.

El término "TBX21", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier TBX21 natural (factor de transcripción de T-box 21) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba TBX21 sin procesar "de longitud completa" así como cualquier forma de TBX21 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de TBX21, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de ácido nucleico de un TBX21 humano ejemplar se muestra en la secuencia de referencia de NCBI: NM\_013351.1 o en SEQ ID NO: 57. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por TBX21 humano se muestra en el n.º de acceso de UniProt Q9UL17 o en la SEQ ID NO: 58.

Los términos "ligando de muerte programada 1" y "PD-L1" se refieren en el presente documento a un polipéptido PD-L1 de secuencia natural, variantes del polipéptido y fragmentos de un polipéptido de secuencia natural y variantes del polipéptido (que se definen además en el presente documento). El polipéptido PD-L1 descrito en el presente documento puede ser el que se aísla de una variedad de fuentes, tales como de tipos de tejido humano o de otra fuente, o se prepara por procedimientos recombinantes o sintéticos.

Un "polipéptido PD-L1 de secuencia natural" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido PD-L1 correspondiente derivado de la naturaleza. El término engloba PD-L1 sin procesar "de longitud completa" así como cualquier forma de PD-L1 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de PD-L1, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. Por ejemplo, un polipéptido PD-L1 de secuencia natural puede ser la isoforma 1 de PD-L1 (también conocida como PD-L1I; véase, por ejemplo, el n.º de acceso de UniProt Q9NZQ7-1), la isoforma 2 de PD-L1 (también conocida como PD-L1II; véase, por ejemplo, el n.º de acceso de UniProt Q9NZQ7-2) o la isoforma 3 de PD-L1 (véase, por ejemplo, el n.º de acceso de UniProt Q9NZQ7-3). La secuencia de ácido nucleico de un PD-L1 humano ejemplar se muestra en la secuencia de referencia de NCBI: NM\_014143 o en SEQ ID NO: 59. La secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplar codificada por PD-L1 humano se muestra en el n.º de acceso de UniProt Q9NZQ7 o en la SEQ ID NO: 60.

Una "variante de polipéptido PD-L1", o variaciones del mismo, quiere decir un polipéptido PD-L1, en general, un polipéptido PD-L1 activo, como se define en el presente documento, que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con cualquiera de las secuencias polipeptídicas de PD-L1 de secuencia natural como se divulga en el presente documento. Dichas variantes de polipéptido PD-L1 incluyen, por ejemplo,

polipéptidos PD-L1 en los que uno o más residuos aminoacídicos se añaden o se delecionan en el extremo N o C de una secuencia de aminoácidos natural. Habitualmente, una variante de polipéptido PD-L1 tendrá al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, de forma alternativa, al menos aproximadamente un 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos, con una secuencia polipeptídica de PD-L1 de secuencia natural como se divulga en el presente documento. Habitualmente, los polipéptidos variantes de PD-L1 tienen al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, de forma alternativa, al menos aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288 o 289 aminoácidos de longitud, o más. Opcionalmente, los polipéptidos variantes de PD-L1 no tendrán más de una sustitución aminoacídica conservadora en comparación con una secuencia polipeptídica de PD-L1 natural, de forma alternativa, no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones aminoacídicas conservadoras en comparación con la secuencia polipeptídica de PD-L1 natural.

El término "detección" se usa en el presente documento en el sentido más amplio para incluir mediciones tanto cualitativas como cuantitativas de una molécula diana. La detección incluye identificar la mera presencia de la molécula diana en una muestra, así como determinar si la molécula diana está presente en la muestra a niveles detectables. La detección puede ser directa o indirecta.

En general, el término "nivel de expresión" se refiere, en general, a la cantidad de un biomarcador en una muestra biológica. "Expresión", se refiere, en general, al proceso por el que la información (por ejemplo, información codificada por genes y/o epigenética) se convierte en las estructuras presentes y que actúan en la célula. Por lo tanto, como se usa en el presente documento, "expresión" se puede referir a transcripción en un polinucleótido, traducción en un polipéptido o, incluso, modificaciones de polinucleótidos y/o polipéptidos (por ejemplo, modificación postraduccional de un polipéptido). Los fragmentos del polinucleótido transcrito, el polipéptido traducido, o las modificaciones de polinucleótidos y/o polipéptidos (por ejemplo, modificación postraduccional de un polipéptido) también se considerarán expresados si se originan a partir de un transcrito generado por corte y empalme alternativo o un transcrito degradado, o de un procesamiento postraduccional del polipéptido, por ejemplo, por proteólisis. Los "genes expresados" incluyen los que se transcriben en un polinucleótido como ARNm y, a continuación, se traducen en un polipéptido, y también los que se transcriben en ARN, pero no se traducen en un polipéptido (por ejemplo, ARN de transferencia y ribosómicos). Un nivel de expresión para más de un gen de interés se puede determinar por procedimientos de agregación conocidos por un experto en la técnica y también divulgados en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, calcular la mediana o la media de todos los niveles de expresión de los genes de interés. Antes de la agregación, el nivel de expresión de cada gen de interés se puede normalizar usando procedimientos estadísticos conocidos por un experto en la técnica y también divulgados en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, normalizados con respecto al nivel de expresión de uno o más genes constitutivos, o normalizados con respecto a un tamaño de colección total, o normalizados con respecto a la mediana o la media del valor de nivel de expresión en todos los genes medidos. En algunos casos, antes de la agregación en los múltiples genes de interés, el nivel de expresión normalizado de cada gen de interés se puede estandarizar usando procedimientos estadísticos conocidos por un experto en la técnica y también divulgados en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, calcular la puntuación Z del nivel de expresión normalizado de cada gen de interés.

El término "muestra", como se usa en el presente documento, se refiere a una composición que se obtiene o deriva de un paciente y/o individuo de interés que contiene una entidad celular y/u otra molecular que se va a caracterizar y/o identificar, por ejemplo, en base a características físicas, bioquímicas, químicas y/o fisiológicas. Las muestras incluyen, pero no se limitan a, muestras tisulares, líneas celulares o células primarias o cultivadas, sobrenadantes celulares, lisados celulares, plaquetas, suero, plasma, humor vítreo, líquido linfático, líquido sinovial, líquido folicular, semen, líquido amniótico, leche, sangre completa, células derivadas de sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, saliva, esputo, lágrimas, sudor, moco, lisados tumorales y medio de cultivo tisular, extractos tisulares tales como tejido homogeneizado, tejido tumoral, extractos celulares y combinaciones de los mismos.

Una muestra o célula que "expresa" una proteína de interés es una en la que se determina que el ARNm que codifica la proteína, o la proteína, incluyendo fragmentos de la misma, está presente en la muestra o célula.

Como se usa en el presente documento, los términos "nivel de expresión de referencia" y "nivel de referencia" se usan de manera intercambiable para referirse a un nivel de expresión frente al que se compara otro nivel de expresión, por ejemplo, el nivel de expresión de uno o más genes descritos en el presente documento (por ejemplo, cualquier gen expuesto en la tabla 1 o cualquier combinación de los mismos (por ejemplo, cualquier combinación expuesta en una cualquiera de las tablas 2-5) en una muestra de un individuo, por ejemplo, para realizar una determinación predictiva, diagnóstica, pronóstica y/o terapéutica. Por ejemplo, el nivel de expresión de referencia se puede derivar de los niveles de expresión en una población de referencia (por ejemplo, la mediana del nivel de expresión en una población de referencia, por ejemplo, una población de pacientes que tienen un cáncer), una muestra de referencia y/o un valor preasignado (por ejemplo, un valor de corte que se determinó previamente para separar de forma significativa (por ejemplo, de forma estadísticamente significativa) un primer subconjunto de individuos que se han tratado con un tratamiento antineoplásico (por ejemplo, un tratamiento antineoplásico que

incluye una inmunoterapia (por ejemplo, un antagonista de unión al eje PD-L1, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab)) y un antagonista estromal supresor (por ejemplo, un antagonista de TGF- $\beta$ , por ejemplo, un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ ) en una población de referencia y un segundo subconjunto de individuos que se han tratado con un tratamiento antineoplásico diferente (o que no se han tratado con el tratamiento antineoplásico) en la misma población de referencia en base a una diferencia significativa entre la reactividad de un individuo al tratamiento con el tratamiento antineoplásico y la reactividad de un individuo al tratamiento con el tratamiento antineoplásico diferente por encima del valor de corte y/o por debajo del valor de corte). En algunos modos de realización, el valor de corte puede ser la mediana o la media del nivel de expresión en la población de referencia. En otros modos de realización, el nivel de referencia puede ser el 40 % superior, el 30 % superior, el 20 % superior, el 10 % superior, el 5 % superior o el 1 % superior del nivel de expresión en la población de referencia. En modos de realización particulares, el valor de corte puede ser la mediana del nivel de expresión en la población de referencia. Se apreciará por un experto en la técnica que el valor numérico para el nivel de expresión de referencia puede variar dependiendo de la indicación o trastorno (por ejemplo, un cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga, un cáncer de riñón, un cáncer de pulmón, un cáncer de hígado, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas, un cáncer colorrectal o un cáncer de mama)), la metodología usada para detectar los niveles de expresión (por ejemplo, RNAseq o RT-qPCR) y/o las combinaciones específicas de genes analizados (por ejemplo, cualquier combinación de los genes expuestos en la tabla 1; o una cualquiera de las combinaciones de genes enumerados en las tablas 2-6).

La expresión "por encima de" un nivel (por ejemplo, por encima de un nivel de referencia), "expresión incrementada", "nivel de expresión incrementado", "niveles incrementados", "expresión elevada", "niveles de expresión elevados" o "niveles elevados" se refiere a una expresión incrementada o a niveles incrementados de un biomarcador en un individuo en relación con el nivel de expresión del biomarcador en un control (por ejemplo, un individuo o individuos que no padecen la enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer), un control interno (por ejemplo, un biomarcador constitutivo) o el nivel de un biomarcador en una muestra obtenida antes de la administración de un tratamiento (por ejemplo, un tratamiento antineoplásico que incluye una inmunoterapia (por ejemplo, un antagonista de unión al eje PD-L1, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab)) y un antagonista estromal supresor (por ejemplo, un antagonista de TGF- $\beta$ , por ejemplo, un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ )), o en relación con un nivel de referencia (por ejemplo, la mediana del nivel de expresión del biomarcador en muestras de un grupo/población de pacientes, por ejemplo, pacientes que tienen cáncer que se están sometiendo a prueba para detectar su reactividad a un tratamiento antineoplásico que incluye una inmunoterapia (por ejemplo, un antagonista de unión al eje PD-L1, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab)) y/o un antagonista estromal supresor (por ejemplo, un antagonista de TGF- $\beta$ , por ejemplo, un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ ); la mediana del nivel de expresión del biomarcador en muestras de un grupo/población de pacientes, por ejemplo, pacientes que tienen cáncer en los que se ha identificado que no responden a un tratamiento antineoplásico que incluye una inmunoterapia (por ejemplo, un antagonista de unión al eje PD-L1, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab)) y/o un antagonista estromal supresor (por ejemplo, un antagonista de TGF- $\beta$ , por ejemplo, un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ ); o el nivel en una muestra obtenida previamente del individuo en un tiempo anterior).

La expresión "por debajo de" un nivel (por ejemplo, por debajo de un nivel de referencia), "expresión disminuida", "nivel de expresión disminuido", "niveles disminuidos", "expresión reducida", "niveles de expresión reducidos" o "niveles reducidos" se refiere a una expresión disminuida o a niveles disminuidos de un biomarcador en un individuo en relación con el nivel de expresión del biomarcador en un control (por ejemplo, un individuo o individuos que no padecen la enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer), un control interno (por ejemplo, un biomarcador constitutivo) o el nivel de un biomarcador en una muestra obtenida antes de la administración de un tratamiento (por ejemplo, un tratamiento antineoplásico que incluye una inmunoterapia (por ejemplo, un antagonista de unión al eje PD-L1, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab)) y/o un antagonista estromal supresor (por ejemplo, un antagonista de TGF- $\beta$ , por ejemplo, un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ )), o en relación con un nivel de referencia (por ejemplo, la mediana del nivel de expresión del biomarcador en muestras de un grupo/población de pacientes, por ejemplo, pacientes que tienen cáncer que se están sometiendo a prueba para detectar su reactividad a un tratamiento antineoplásico que incluye una inmunoterapia (por ejemplo, un antagonista de unión al eje PD-L1, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab)) y/o un antagonista estromal supresor (por ejemplo, un antagonista de TGF- $\beta$ , por ejemplo, un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ ); la mediana del nivel de expresión del biomarcador en muestras de un grupo/población de pacientes, por ejemplo, pacientes que tienen cáncer en los que se ha identificado que no responden a un tratamiento antineoplásico que incluye una inmunoterapia (por ejemplo, un antagonista de unión al eje PD-L1, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab)) y/o un antagonista estromal supresor (por ejemplo, un antagonista de TGF- $\beta$ , por ejemplo, un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ ); o el nivel en una muestra obtenida previamente del individuo en un tiempo anterior). En algunos modos de realización, la expresión reducida es poca o ninguna expresión.

Una "muestra de referencia", "célula de referencia", "tejido de referencia", "muestra de control", "célula de control" o "tejido de control", como se usa en el presente documento, se refiere a una muestra, célula, tejido o estándar que se usa con propósitos de comparación. En un modo de realización, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control se obtiene de una parte sana y/o no enferma del cuerpo (por ejemplo, tejido o células) del mismo paciente o individuo. Por ejemplo, una muestra de

referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control puede ser células sanas y/o no enfermas o tejido contiguo a las células o tejido enfermo (por ejemplo, células o tejido contiguo a un tumor). En otro modo de realización, una muestra de referencia se obtiene de un tejido y/o célula no tratados del cuerpo del mismo paciente o individuo. Aún en otro modo de realización, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control se obtiene de una parte sana y/o no enferma del cuerpo (por ejemplo, tejidos o células) de un individuo que no es el paciente o individuo. Incluso en otro modo de realización, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control se obtiene de un tejido y/o célula no tratados del cuerpo de un individuo que no es el paciente o individuo. En otro modo de realización, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control se obtiene de un paciente antes de la administración de un tratamiento (por ejemplo, un tratamiento antineoplásico que incluye una inmunoterapia (por ejemplo, un antagonista de unión al eje PD-L1, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab)) y/o un antagonista estromal supresor (por ejemplo, un antagonista de TGF- $\beta$ , por ejemplo, un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ )).

La frase "en base a", cuando se usa en el presente documento, quiere decir que la información sobre uno o más biomarcadores se usa para informar de una decisión de tratamiento, información proporcionada en un prospecto del envase u orientación de comercialización/promoción, y similares.

El término "biomarcador constitutivo" se refiere a un biomarcador o grupo de biomarcadores (por ejemplo, polinucleótidos y/o polipéptidos) que típicamente están presentes de forma similar en todos los tipos de células. En algunos modos de realización, el biomarcador constitutivo es un "gen constitutivo". Un "gen constitutivo" se refiere en el presente documento a un gen o grupo de genes que codifican proteínas con actividades que son esenciales para el mantenimiento de la función celular y que típicamente están presentes de forma similar en todos los tipos de células.

Por "correlacionar" o "correlación" se quiere decir comparar, de cualquier forma, el rendimiento y/o los resultados de un primer análisis o protocolo con el rendimiento y/o los resultados de un segundo análisis o protocolo. Por ejemplo, se pueden usar los resultados de un primer análisis o protocolo para llevar a cabo un segundo protocolo y/o se pueden usar los resultados de un primer análisis o protocolo para determinar si se debe realizar un segundo análisis o protocolo. Con respecto al modo de realización del protocolo o análisis polipeptídico, se pueden usar los resultados del protocolo o análisis de expresión polipeptídica para determinar si se debe realizar una pauta terapéutica específica. Con respecto al modo de realización del protocolo o análisis polinucleotídico, se pueden usar los resultados del protocolo o análisis de expresión polinucleotídica para determinar si se debe realizar una pauta terapéutica específica.

"Amplificación", como se usa en el presente documento, se refiere, en general, al proceso de producir múltiples copias de una secuencia deseada. "Múltiples copias" quiere decir al menos dos copias. Una "copia" no quiere decir necesariamente una complementariedad o identidad de secuencia perfecta con respecto a la secuencia molde. Por ejemplo, las copias pueden incluir análogos nucleotídicos, tales como desoxiinosina, alteraciones de secuencia intencionadas (tales como alteraciones de secuencia introducidas a través de un cebador que comprende una secuencia que es hibridable, pero no complementaria, al molde) y/o errores de secuencia que se producen durante la amplificación.

El término "PCR múltiple" se refiere a una única reacción de PCR llevada a cabo en un ácido nucleico obtenido de una única fuente (por ejemplo, un individuo) usando más de un conjunto de cebadores con el propósito de amplificar dos o más secuencias de ADN en una única reacción.

La técnica de "reacción en cadena de la polimerasa" o "PCR", como se usa en el presente documento, se refiere, en general, a un procedimiento en el que se amplifican cantidades mínimas de una porción específica de ácido nucleico, ARN y/o ADN, como se describe, por ejemplo, en la pat. de EE. UU. n.º 4.683.195. En general, es necesario que la información de secuencia de los extremos de la región de interés o más allá esté disponible, de modo que se puedan diseñar cebadores oligonucleotídicos; estos cebadores serán idénticos o similares en secuencia a hebras opuestas del molde que se va a amplificar. Los nucleótidos 5' terminales de los dos cebadores pueden coincidir con los extremos del material amplificado. La PCR se puede usar para amplificar secuencias de ARN específicas, secuencias de ADN específicas de ADN genómico total y ADNc transcrito a partir de secuencias de ARN celular total, bacteriófago o plásmido, etc. Véase, en general, Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263 (1987) y Erlich, ed., PCR Technology (Stockton Press, NY, 1989). Como se usa en el presente documento, se considera que la PCR es uno, pero no el único, ejemplo de un procedimiento de reacción de la ácido nucleico polimerasa para amplificar una muestra de prueba de ácido nucleico, que comprende el uso de un ácido nucleico conocido (ADN o ARN) como cebador y utiliza una ácido nucleico polimerasa para amplificar o generar una porción específica de ácido nucleico o para amplificar o generar una porción específica de ácido nucleico que es complementaria a un ácido nucleico particular.

"Reacción en cadena de la polimerasa ultrarrápida cuantitativa" o "qRT-PCR" se refiere a una forma de PCR en la que la cantidad de producto de PCR se mide en cada etapa en una reacción de PCR. Esta técnica se ha descrito en

diversas publicaciones, incluyendo, por ejemplo, Cronin et al., Am. J. Pathol. 164(1):35-42 (2004) y Ma et al., Cancer Cell 5:607-616 (2004).

El término "micromatriz" se refiere a una disposición ordenada de elementos de matriz hibridables, preferentemente sondas de polinucleótidos, en un sustrato.

El término "RNAseq", también denominado "RNA-seq" y "secuenciación indiscriminada del transcriptoma completo (WTSS)", se refiere al uso de tecnologías de secuenciación de alto rendimiento para secuenciar y/o cuantificar el ADNc para obtener información sobre el contenido de ARN de una muestra. Las publicaciones que describen RNAseq incluyen: Wang et al. Nature Reviews Genetics 10(1):57-63, 2009; Ryan et al. BioTechniques 45(1):81-94, 2008; y Maher et al. Nature 458(7234):97-101, 2009.

El término "diagnóstico" se usa en el presente documento para referirse a la identificación o clasificación de un estado, enfermedad o afección patológica o molecular (por ejemplo, cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga (por ejemplo, CU, por ejemplo, CUM), un cáncer de riñón, un cáncer de pulmón, un cáncer de hígado, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas, un cáncer colorrectal o un cáncer de mama)). En algunos modos de realización, el cáncer es un cáncer de vejiga (por ejemplo, CU, por ejemplo, CUM). Por ejemplo, "diagnóstico" se puede referir a la identificación de un tipo de cáncer particular. "Diagnóstico" también se puede referir a la clasificación de un subtipo de cáncer particular, por ejemplo, por criterios histopatológicos o por rasgos característicos moleculares (por ejemplo, un subtipo caracterizado por la expresión de uno o una combinación de biomarcadores (por ejemplo, genes particulares o proteínas codificadas por dichos genes)).

Una "célula inmunitaria infiltrante de tumor", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier célula inmunitaria presente en un tumor o una muestra del mismo. Las células inmunitarias infiltrantes de tumor incluyen, pero no se limitan a, células inmunitarias intratumorales, células inmunitarias peritumorales, otras células de estroma tumorales (por ejemplo, fibroblastos) o cualquier combinación de las mismas. Dichas células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden ser, por ejemplo, linfocitos T (tales como linfocitos T CD8<sup>+</sup> y/o linfocitos T CD4<sup>+</sup>), linfocitos B u otras células de linaje de médula ósea, incluyendo granulocitos (por ejemplo, neutrófilos, eosinófilos y basófilos), monocitos, macrófagos (por ejemplo, macrófagos CD68<sup>+</sup>/CD163<sup>+</sup>), células dendríticas (por ejemplo, células dendríticas interdigitantes), histiocitos y linfocitos citolíticos naturales (NK).

Una "célula tumoral", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier célula tumoral presente en un tumor o una muestra del mismo. Las células tumorales se pueden distinguir de otras células que pueden estar presentes en una muestra de tumor, por ejemplo, células estromales y células inmunitarias infiltrantes de tumor, usando procedimientos conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, los términos "individuo", "paciente" o "sujeto" se usan de manera intercambiable y se refieren a cualquier animal individual, más preferentemente un mamífero (incluyendo animales no humanos como, por ejemplo, gatos, perros, caballos, conejos, animales de zoológico, vacas, cerdos, ovejas y primates no humanos) para los que se desea el tratamiento. En modos de realización particulares, el paciente en el presente documento es un ser humano. El paciente puede ser un "paciente con cáncer", es decir, alguien que padece cáncer (por ejemplo, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal o cáncer de mama), o que está en riesgo de padecer cáncer, o que padece uno o más síntomas de cáncer.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección fisiológica en los mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o neoplasias malignas linfáticas. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga (por ejemplo, carcinoma urotelial (CU), incluyendo CU metastásico (CUM); cáncer de vejiga con invasión muscular (CVIM) y cáncer de vejiga sin invasión muscular (CVSIM)); cáncer de riñón o renal (por ejemplo, carcinoma de células renales (CCR)), cáncer de pulmón, incluyendo carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma epidermoide de pulmón; cáncer de las vías urinarias; cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama HER2<sup>+</sup> y cáncer de mama triple negativo (CMTN), que no tienen receptores estrogénicos (ER<sup>-</sup>), receptores de progesterona (PR<sup>-</sup>) ni sobreexpresión del receptor HER2 (HER2<sup>+</sup>)); cáncer de próstata, tal como cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC); cáncer del peritoneo; cáncer hepatocelular; cáncer gástrico o de estómago, incluyendo cáncer gastrointestinal y cáncer del estroma gastrointestinal; cáncer de páncreas (por ejemplo, adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP)); glioblastoma; cáncer de cuello uterino; cáncer de ovario; cáncer de hígado (por ejemplo, carcinoma hepatocelular (CHC)); hepatoma; cáncer de colon; cáncer rectal; cáncer colorrectal; carcinoma endometrial o uterino; carcinoma de glándulas salivales; cáncer de próstata; cáncer de vulva; cáncer tiroideo; carcinoma hepático; carcinoma anal; carcinoma de pene; melanoma, incluyendo melanoma de diseminación superficial; melanoma sobre lentigo maligno; melanomas lentiginosos acros y melanomas nodulares; mieloma múltiple y linfoma de linfocitos B (incluyendo linfoma no hodgkiniano (LNH) de escasa malignidad/folicular; LNH linfocítico pequeño (LP); LNH de malignidad intermedia/folicular; LNH difuso de malignidad intermedia; LNH inmunoblástico de gran malignidad; LNH linfoblástico de gran malignidad; LNH de células no hendidas pequeñas de gran malignidad; LNH con gran masa tumoral; linfoma de células del manto;

linfoma relacionado con el SIDA; y macroglobulinemia de Waldenström); leucemia linfocítica crónica (LLC); leucemia linfocítica aguda (LLA); leucemia mielógena aguda (LMA); tricoleucemia; leucemia mielógena crónica (LMC); trastorno linfoproliferativo postrasplante (TLPT); y síndromes mielodisplásicos (SMD), así como proliferación vascular anómala asociada con facomatosis, edema (tal como el asociado con tumores cerebrales), síndrome de Meigs, cáncer cerebral, cáncer de cabeza y cuello y metástasis asociadas. En algunos modos de realización, el cáncer es cáncer de vejiga (por ejemplo, CU, por ejemplo, CUm).

Por "cáncer en fase inicial" o "tumor en fase inicial" se quiere decir un cáncer que no es invasivo ni metastásico o se clasifica como un cáncer en estadio 0, I o II.

Un cáncer "avanzado" es aquel que se ha diseminado fuera del sitio u órgano de origen, por invasión local o bien por metástasis.

Un cáncer "resistente al tratamiento" es aquel que progresa aunque se esté administrando un agente antitumoral, tal como un agente quimioterápico, al paciente con cáncer. Un ejemplo de un cáncer resistente al tratamiento es aquel que es resistente al tratamiento con platino.

Un cáncer "recidivante" es aquel que ha vuelto a crecer, en el sitio inicial o bien en un sitio distante, después de una respuesta al tratamiento inicial.

Los términos "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que se asocian con algún grado de proliferación celular anómala. En un modo de realización, el trastorno proliferativo celular es cáncer.

El término "tumor", como se usa en el presente documento, se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sea maligno o benigno, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

Los términos "cáncer", "canceroso", "trastorno proliferativo celular", "trastorno proliferativo" y "tumor" no son mutuamente excluyentes como se hace referencia en el presente documento.

El término "tumor con inflamación inmunitaria", como se usa en el presente documento, se refiere a un tumor (por ejemplo, un tumor sólido) caracterizado por infiltración de linfocitos T CD8+ y expresión de PD-L1. Véase, por ejemplo, Herbst et al. Nature 515:563-567, 2014 y Hegde et al. Clin. Canc. Res. 22: 1865-1874, 2016. En algunos modos de realización, un tumor se clasifica como un tumor con inflamación inmunitaria si se observan células CD8+ en contacto directo con células epiteliales malignas, en forma de desbordamiento de infiltrados estromales en agregados de células tumorales o bien de infiltración difusa de células CD8+ en agregados o láminas de células tumorales.

El término "tumor con exclusión inmunitaria", como se usa en el presente documento, se refiere a un tumor (por ejemplo, un tumor sólido) caracterizado por la acumulación de linfocitos T en el estroma rico en matriz extracelular. Véase, por ejemplo, Herbst et al. Nature 515:563-567, 2014 y Hegde et al. Clin. Canc. Res. 22: 1865-1874, 2016. En los tumores con exclusión inmunitaria, la mayoría de los linfocitos T migran a lo largo de fibras de colágeno y fibronectina alineadas que recorren circunferencialmente alrededor del tumor. Véase, por ejemplo, Salmon et al. J. Clin. Invest. 122:899-910, 2012. En algunos modos de realización, un tumor se clasifica como un tumor con exclusión inmunitaria si se observan células CD8+ sustancial o exclusivamente en el estroma de inmediato contiguo a o dentro de una masa tumoral principal.

El término "tumor con desierto inmunitario", como se usa en el presente documento, se refiere a un tumor (por ejemplo, un tumor sólido) con escasez de linfocitos infiltrantes dentro del tumor o del estroma circundante. Véase, por ejemplo, Herbst et al. Nature 515:563-567, 2014 y Hegde et al. Clin. Canc. Res. 22: 1865-1874, 2016. En algunos modos de realización, un tumor se clasifica como un tumor con desierto inmunitario si la prevalencia de células CD8+ es baja (por ejemplo, menos de aproximadamente 10 células CD8+ (por ejemplo, aproximadamente 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 células CD8+) en un área de tumor y estroma asociado al tumor con un aumento de aproximadamente 200x, por ejemplo, calculado como el promedio de 10 campos visuales representativos).

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento, incluyendo, pero sin limitarse a, trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluyendo aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo, tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural del individuo que se está tratando, y que se puede realizar para la profilaxis o bien durante el trascurso de los análisis clínicos. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, evitar la aparición o recidiva de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, evitar la metástasis, disminuir la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o atenuación del grado de actividad de la enfermedad y remisión o pronóstico mejorado. En algunos modos de realización, el tratamiento es con un tratamiento antineoplásico que incluye una inmunoterapia (por ejemplo, un antagonista de unión al eje PD-L1, por

ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab)) y/o un antagonista estromal supresor (por ejemplo, un antagonista de TGF- $\beta$ , por ejemplo, un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ ). En algunos modos de realización, se usan anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti-PD-L1, anticuerpos anti-PD-1 y/o anticuerpos anti-TGF- $\beta$ ) para retrasar la aparición de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, un

Como se usa en el presente documento, "administrar" quiere decir un procedimiento de dar una dosificación de un compuesto (por ejemplo, una inmunoterapia (por ejemplo, un antagonista de unión al eje PD-L1, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab)) y/o un antagonista estromal supresor (por ejemplo, un antagonista de TGF- $\beta$ , por ejemplo, un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ )) o una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica, por ejemplo, una composición farmacéutica que incluye una inmunoterapia (por ejemplo, un antagonista de unión al eje PD-L1, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab)) y/o un antagonista estromal supresor (por ejemplo, un antagonista de TGF- $\beta$ , por ejemplo, un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ )) a un paciente. Las composiciones utilizadas en los procedimientos descritos en el presente documento se pueden administrar, por ejemplo, por vía intramuscular, intravenosa, intradérmica, percutánea, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intratecal, intranasal, intravaginal, intrarrectal, tópica, intratumoral, peritoneal, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, mucosal, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, intraorbital, intravítrea (por ejemplo, por inyección intravítrea), por gotas oculares, por vía oral, tópica, transdérmica, parenteral, por inhalación, por inyección, por implantación, por infusión, por infusión continua, por perfusión localizada con baño de células diana directo, por catéter, por lavado, en cremas o en composiciones lipídicas. Las composiciones utilizadas en los procedimientos descritos en el presente documento también se pueden administrar por vía sistémica o local. El procedimiento de administración puede variar dependiendo de diversos factores (por ejemplo, el compuesto o composición que se administra y la gravedad de la afección, enfermedad o trastorno que se está tratando).

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un agente terapéutico para tratar o evitar una enfermedad o trastorno (por ejemplo, un cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga (por ejemplo, CU, por ejemplo, CUM), un cáncer de riñón, un cáncer de pulmón, un cáncer de hígado, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas, un cáncer colorrectal o un cáncer de mama)) en un mamífero. En el caso de los cánceres, la cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor primario; inhibir (es decir, ralentizar en cierto grado y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en cierto grado y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, en cierto grado, el crecimiento tumoral; y/o aliviar en cierto grado uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. En la medida en que el fármaco pueda evitar el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para el tratamiento del cáncer, la eficacia in vivo se puede medir, por ejemplo, evaluando la duración de la supervivencia (por ejemplo, supervivencia global o supervivencia sin progresión), tiempo transcurrido hasta la progresión de la enfermedad (TTP), tasas de respuesta (por ejemplo, respuesta completa (RC) o respuesta parcial (RP)), duración de la respuesta y/o calidad de vida.

La expresión "de forma simultánea" se usa en el presente documento para referirse a la administración de dos o más agentes terapéuticos, donde al menos parte de la administración se superpone en el tiempo. En consecuencia, la administración simultánea incluye una pauta posológica cuando la administración de uno o más agentes continúa después de suspender la administración de uno o más de otros agentes. Por ejemplo, en algunos modos de realización, un antagonista de VEGF y un antagonista de unión al eje PD-L1 se pueden administrar de forma simultánea.

Por "reducir o inhibir" se quiere decir la capacidad de provocar una disminución global de un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o mayor. Reducir o inhibir se puede referir, por ejemplo, a los síntomas del trastorno que se está tratando, la presencia o tamaño de las metástasis o el tamaño del tumor primario.

Una dosis de "carga" en el presente documento comprende en general una dosis inicial de un agente terapéutico administrado a un paciente, y va seguida de una o más dosis de mantenimiento del mismo. En general, se administra una única dosis de carga, pero en el presente documento se contemplan múltiples dosis de carga. Normalmente, la cantidad de la(s) dosis de carga administrada(s) excede la cantidad de la(s) dosis de mantenimiento administrada(s) y/o la(s) dosis de carga se administra(n) con más frecuencia que la(s) dosis de mantenimiento para lograr la concentración en equilibrio deseada del agente terapéutico antes de lo que se puede lograr con la(s) dosis de mantenimiento.

Una dosis de "mantenimiento" o dosis "prolongada" en el presente documento se refiere a una o más dosis de un agente terapéutico administrado al paciente durante un período de tratamiento. Normalmente, las dosis de mantenimiento se administran a intervalos de tratamiento espaciados, tal como aproximadamente cada semana, aproximadamente cada 2 semanas, aproximadamente cada 3 semanas o aproximadamente cada 4 semanas.



La "respuesta a un tratamiento", "reactividad al tratamiento" o "beneficio de un tratamiento" se puede evaluar usando cualquier criterio de valoración que indique un beneficio para el individuo, incluyendo, sin limitación, (1) la inhibición, en cierto grado, de la progresión de la enfermedad (por ejemplo, progresión del cáncer), incluyendo la ralentización y la detención completa; (2) una reducción en el tamaño del tumor; (3) inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención completa) de la infiltración de células cancerosas en órganos y/o tejidos periféricos contiguos; (4) inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención completa) de la metástasis; (5) alivio, en cierto grado, de uno o más síntomas asociados con la enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer); (6) incremento o prolongación de la duración de la supervivencia, incluyendo la supervivencia global (CRI de SG < 1) y la supervivencia sin progresión (CRI de SSP < 1); y/o (9) mortalidad disminuida en un punto temporal dado tras el tratamiento (por ejemplo, tratamiento con un tratamiento antineoplásico que incluye una inmunoterapia (por ejemplo, un antagonista de unión al eje PD-L1, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab)) y/o un antagonista estromal supresor (por ejemplo, un antagonista de TGF- $\beta$ , por ejemplo, un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ )).

Una "respuesta objetiva" se refiere a una respuesta medible, incluyendo la respuesta completa (RC) o la respuesta parcial (RP). En algunos modos de realización, la "tasa de respuesta objetiva" (TRO) se refiere a la suma de la tasa de respuesta completa (RC) y la tasa de respuesta parcial (RP).

Por "respuesta completa" o "RC" se entiende la desaparición de todos los signos de cáncer (por ejemplo, desaparición de todas las lesiones diana) en respuesta al tratamiento. Esto no siempre quiere decir que el cáncer se ha curado.

Como se usa en el presente documento, "respuesta parcial" o "RP" se refiere a una disminución en el tamaño de uno o más tumores o lesiones, o en la extensión del cáncer en el cuerpo, en respuesta al tratamiento. Por ejemplo, en algunos modos de realización, RP se refiere a al menos una disminución de un 30 % en la suma de los diámetros más largos (SDML) de las lesiones diana, tomando como referencia la SDML al inicio del estudio.

"Respuesta mantenida" se refiere al efecto mantenido en la reducción del crecimiento tumoral después de la interrupción de un tratamiento. Por ejemplo, el tamaño del tumor puede permanecer igual o más pequeño en comparación con el tamaño al comienzo de la fase de administración. En algunos modos de realización, la respuesta mantenida tiene una duración al menos igual que la duración del tratamiento, al menos 1,5x, 2,0x, 2,5x o 3,0x la duración del tratamiento o mayor.

Como se usa en el presente documento, "enfermedad estable" o "EE" se refiere tanto a una reducción insuficiente de las lesiones diana para considerar que hay RP como a un incremento insuficiente para considerar que hay EP, tomando como referencia la SDML más pequeña desde que se inició el tratamiento.

Como se usa en el presente documento, "enfermedad progresiva" o "EP" se refiere a al menos un incremento de un 20 % en la SDML de las lesiones diana, tomando como referencia la SDML más pequeña registrada desde que se inició el tratamiento o la presencia de una o más lesiones nuevas.

El término "supervivencia" se refiere a que el paciente permanezca con vida e incluye la supervivencia global, así como la supervivencia sin progresión.

Como se usa en el presente documento, "supervivencia sin progresión" o "SSP" se refiere al período de tiempo durante y después del tratamiento durante el que la enfermedad que se está tratando (por ejemplo, cáncer, (por ejemplo, un cáncer de vejiga (por ejemplo, CU, por ejemplo, CUm), un cáncer de riñón, un cáncer de pulmón, un cáncer de hígado, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas, un cáncer colorrectal o un cáncer de mama)) no progresa o empeora. La supervivencia sin progresión puede incluir la cantidad de tiempo en el que los individuos han experimentado una respuesta completa o una respuesta parcial, así como la cantidad de tiempo en el que los individuos han experimentado una enfermedad estable.

Como se usa en el presente documento, "supervivencia global" o "SG" se refiere al porcentaje de sujetos de un grupo que es probable que sigan vivos después de un período de tiempo particular (por ejemplo, 6 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años, 10 años, 15 años, 20 años o más de 20 años desde el momento del diagnóstico o tratamiento).

Por "prolongación de la supervivencia" se quiere decir el incremento de la supervivencia global o sin progresión en un paciente tratado en relación con un paciente no tratado (es decir, en relación con un paciente no tratado con el medicamento), o en relación con un paciente que no expresa un biomarcador en el nivel designado y/o en relación con un paciente tratado con un agente antitumoral aprobado (por ejemplo, una inmunoterapia (por ejemplo, un antagonista de unión al eje PD-L1, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab)) y/o un antagonista estromal supresor (por ejemplo, un antagonista de TGF- $\beta$ , por ejemplo, un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ )).

Como se usa en el presente documento, el "cociente de riesgos instantáneos" o "CRI" es una definición estadística de las tasas de acontecimientos. Para el propósito de la invención, el cociente de riesgos instantáneos se define como la representación de la probabilidad de un acontecimiento (por ejemplo, SSP o SG) en el grupo/rama (por

ejemplo, de tratamiento) experimental dividida entre la probabilidad de un acontecimiento en el grupo/rama de control en cualquier punto temporal específico. Un CRI con un valor de 1 indica que el riesgo relativo de un criterio de valoración (por ejemplo, muerte) es igual en ambos grupos de "tratamiento" y "control"; un valor mayor que 1 indica que el riesgo es mayor en el grupo de tratamiento en relación con el grupo de control; y un valor menor que 1 indica que el riesgo es mayor en el grupo de control en relación con el grupo de tratamiento. El "cociente de riesgos instantáneos" en el análisis de supervivencia sin progresión (es decir, CRI de SSP) es un resumen de la diferencia entre dos curvas de supervivencia sin progresión, que representa la reducción del riesgo de muerte con el tratamiento en comparación con el control, durante un período de seguimiento. El "cociente de riesgos instantáneos" en el análisis de supervivencia global (es decir, CRI de SG) es un resumen de la diferencia entre dos curvas de supervivencia global, que representa la reducción del riesgo de muerte en el tratamiento en comparación con el control, durante un período de seguimiento.

El término "tratamiento antineoplásico" se refiere a un tratamiento útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes terapéuticos antineoplásicos incluyen, pero se limitan a, agentes citotóxicos, agentes quimioterápicos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes usados en radioterapia, agentes antiangiogénicos, agentes apoptóticos, agentes antitubulínicos y otros agentes para tratar el cáncer, por ejemplo, anticuerpos anti-CD20, inhibidores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (por ejemplo, GLEEVEC™ (mesilato de imatinib)), un inhibidor de la COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferones, citocinas, antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que se unen a una o más de las siguientes dianas: PDGFR- $\beta$ , BlyS, APRIL, receptor(es) de BCMA, TRAIL/Apo2 y otros agentes químicos bioactivos y orgánicos, y similares. Las combinaciones de los mismos también se incluyen en la invención.

"Activo" o "actividad" para los propósitos en el presente documento se refiere a la(s) forma(s) de un polipéptido que conserva(n) una actividad biológica y/o inmunológica de un polipéptido natural, en el que actividad "biológica" se refiere a una función biológica (inhibidora o bien estimuladora) provocada por un polipéptido natural distinta de la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo frente a un epítipo antigénico que se posee por un polipéptido natural, y una actividad "inmunológica" se refiere a la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo frente a un epítipo antigénico que se posee por un polipéptido natural.

El término "antagonista" se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o totalmente una actividad biológica de un polipéptido natural. De forma similar, el término "agonista" se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imita una actividad biológica de un polipéptido natural. Las moléculas agonistas o antagonistas adecuadas incluyen específicamente anticuerpos o fragmentos de anticuerpo agonistas o antagonistas, fragmentos o variantes de secuencia de aminoácidos de polipéptidos naturales y similares. Los procedimientos para identificar agonistas o antagonistas de un polipéptido pueden comprender poner en contacto un polipéptido con una molécula agonista o antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con el polipéptido.

El término "inmunoterapia" se refiere al uso de un agente terapéutico que modula una respuesta inmunitaria. Una inmunoterapia puede ser una inmunoterapia activadora o una inmunoterapia supresora. El término "inmunoterapia activadora" se refiere al uso de un agente terapéutico que induce, potencia o promueve una respuesta inmunitaria, incluyendo, por ejemplo, una respuesta de linfocitos T. El término "inmunoterapia supresora" se refiere al uso de un agente terapéutico que interfiere en, suprime o inhibe una respuesta inmunitaria, incluyendo, por ejemplo, una respuesta de linfocitos T.

La expresión "antagonista de unión al eje PD-L1" se refiere a una molécula que inhibe la interacción de un compañero de unión al eje PD-L1 con uno o más de sus compañeros de unión, para retirar la disfunción de linfocitos T resultante de la señalización en el eje de señalización de PD-1, con la restauración o potenciación de la función de linfocitos T como resultado. Como se usa en el presente documento, un antagonista de unión al eje PD-L1 incluye un antagonista de unión a PD-L1 y un antagonista de unión a PD-1, así como moléculas que interfieren en la interacción entre PD-L1 y PD-1 (por ejemplo, fusión PD-L2-Fc).

El término "antagonista de unión a PD-L1" se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L1 con uno o bien más de uno de sus compañeros de unión, tales como PD-1 o B7-1.

Como se usa en el presente documento, un "antagonista de unión a PD-1" es una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-1 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-L1 y/o PD-L2.

Las expresiones "anticuerpo anti-PD-L1" y "un anticuerpo que se une a PD-L1" se refieren a un anticuerpo que se puede unir a PD-L1 con una afinidad suficiente, de modo que el anticuerpo sea útil como agente diagnóstico y/o terapéutico al dirigirse a PD-L1.

Las expresiones "anticuerpo anti-PD-1" y "un anticuerpo que se une a PD-1" se refieren a un anticuerpo que se puede unir a PD-1 con una afinidad suficiente, de modo que el anticuerpo sea útil como agente diagnóstico y/o

terapéutico al dirigirse a PD-1.

Un "antagonista estromal supresor" como se define en el presente documento es cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o totalmente una actividad y/o función biológica de un gen o producto génico asociado con el estroma (por ejemplo, estroma asociado al tumor). Son conocidas en la técnica dianas para antagonistas de genes estromales; por ejemplo, véase Turley et al., *Nature Reviews Immunology* 15:669-682, 2015 y Rosenbloom et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1832:1088-1103, 2013.

Un "antagonista de TGF- $\beta$ " como se define en el presente documento es cualquier molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señales resultante de la interacción de TGF- $\beta$  con uno o más de sus compañeros de interacción, tales como un receptor celular de TGF- $\beta$ .

Los términos "anticuerpo anti-TGF- $\beta$ " y "un anticuerpo que se une a TGF- $\beta$ " se refieren a un anticuerpo que se puede unir a TGF- $\beta$  con una afinidad suficiente, de modo que el anticuerpo sea útil como agente diagnóstico y/o terapéutico al dirigirse a TGF- $\beta$ . El anticuerpo anti-TGF- $\beta$  es un anticuerpo anti-TGF- $\beta$  panespecífico. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-TGF- $\beta$  puede ser cualquier anticuerpo anti-TGF- $\beta$  divulgado, por ejemplo, en la pat. de EE. UU. n.º 5.571.714 o en las solicitudes de patente internacionales n.ºs WO 92/00330, WO 92/08480, WO 95/26203, WO 97/13844, WO 00/066631, WO 05/097832, WO 06/086469, WO 05/010049, WO 06/116002, WO 07/076391, WO 12/167143, WO 13/134365, WO 14/164709 o WO 16/201282. En modos de realización particulares, el anticuerpo anti-TGF- $\beta$  es 1D11 o un derivado del mismo.

Un "inhibidor de la angiogénesis" o "agente antiangiogénico" se refiere a una sustancia de bajo peso molecular, un polinucleótido, un polipéptido, una proteína aislada, una proteína recombinante, un anticuerpo, o conjugados o proteínas de fusión de los mismos, que inhibe la angiogénesis, vasculogénesis o permeabilidad vascular indeseable, directa o bien indirectamente. Se debe entender que el agente antiangiogénico incluye los agentes que se unen y bloquean la actividad angiogénica del factor angiogénico o su receptor. Por ejemplo, un agente antiangiogénico es un anticuerpo u otro antagonista para un agente angiogénico como se define anteriormente, por ejemplo, anticuerpos para VEGF-A o el receptor de VEGF-A (por ejemplo, receptor de KDR o receptor de Flt-1), inhibidores anti-PDGFR tales como GLEEVEC™ (mesilato de imatinib). Los agentes antiangiogénicos también incluyen inhibidores naturales de la angiogénesis, por ejemplo, angiostatina, endostatina, etc. Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991); Streit y Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003) (por ejemplo, la tabla 3 que enumera el tratamiento antiangiogénico en el melanoma maligno); Ferrara y Allitalo, *Nature Medicine* 5(12):1359-1364 (1999); Tonini et al., *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) y Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003).

El término "agente citotóxico" como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de las células y/o provoca la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> y los isótopos radioactivos de Lu); agentes quimioterápicos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de las mismas (por ejemplo, enzimas nucleolíticas), antibióticos y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas, y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos divulgados a continuación. Un agente tumoricida provoca la destrucción de células tumorales.

Un "agente quimioterápico" incluye compuestos químicos útiles en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), disulfiram, galato de epigallocatequina, salinosporamida A, carfilzomib, 17-AAG (geldanamicina), radicicol, lactato deshidrogenasa A (LDH-A), fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), sunitib (SUTENT®, Pfizer/Sugen), letrozol (FEMARA®, Novartis), mesilato de imatinib (GLEEVEC®, Novartis), finasunato (VATALANIB®, Novartis), oxaliplatino (ELOXATIN®, Sanofi), 5-FU (5-fluorouracilo), leucovorina, rapamicina (Sirolimus, RAPAMUNE®, Pfizer), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), lonafarnib (SCH 66336), sorafenib (NEXAVAR®, Bayer Labs), gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), AG1478, agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclofosfamida CYTOXAN®; alquisulfonatos, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aciridinas, tales como benzodopa, carbocuna, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo topotecán e irinotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (en particular criptoficina 1 y criptoficina 8); adrenocorticosteroides (incluyendo prednisona y prednisolona); acetato de ciproterona; 5 $\alpha$ -reductasas incluyendo finasteride y dutasteride; vorinostat, romidepsina, panobinostat, ácido valproico, mocetinostat dolastatina; aldesleucina, talco duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiastatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafacina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, uramustina; nitrosureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina  $\gamma$ 11 y calicheamicina  $\omega$ 11).

(Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:183-186, 1994); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como el cromóforo neocarzinostatina y los cromóforos antibióticos de enediina de cromoproteína relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN® (doxorubicina), morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfirofamicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, cinostatina, zorubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de 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; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antipararrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedores de ácido fólico, tales como ácido frolinico; aceglatona; glucósido de aldofosfina; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diacicuona; elfomitina; acetato de eliptinio; una epitolona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiaurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidracida; procarbina; complejo polisacarídico PSK® (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxano; rizoxina; sizofurano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triacicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbicina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, TAXOL (paclitaxel; Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE® (sin cremofor), formulaciones de nanopartículas de paclitaxel genomanipuladas con albúmina (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.) y TAXOTERE® (docetaxel, doxetaxel; Sanofi-Aventis); cloranbucilo; GEMZAR® (gemcitabina); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE® (vinorelbina); novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; capecitabina (XELODA®); ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico; y sales, ácidos y derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Los agentes quimioterápicos también incluyen agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de las hormonas sobre tumores, tales como antiestrógenos y moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (MSRE), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX®; citrato de tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, yodoxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y FARESTON® (citrato de toremifina); inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® (acetato de megestrol), AROMASIN® (exemestano; Pfizer), formestano, fadrozol, RIVISOR® (vorozol), FEMARA® (letrozol; Novartis) y ARIMIDEX® (anastrozol; AstraZeneca); antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprorrelina y goserelina; buserelina, tripterelina, acetato de medroxiprogesterona, dietilestilbestrol, premarina, fluoximesterona, ácido retinoico, fenretinida, así como troxacitabina (un análogo de 1,3-dioxolano nucleósido citosina); inhibidores de proteína cinasa; inhibidores de lípido cinasa; oligonucleótidos antisentido, en particular, aquellos que inhiben la expresión de genes en vías de señalización implicadas en la proliferación de células anómalas, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Ralf y H-Ras; ribocimas, tales como inhibidores de la expresión de VEGF (por ejemplo, ANGIOZYME®) e inhibidores de la expresión de HER2; vacunas, tales como vacunas para el tratamiento génico, por ejemplo, ALLOVECTIN®, LEUVECTIN® y VAXID®; PROLEUKIN®, rIL-2; un inhibidor de topoisomerasa 1, tal como LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; y sales, ácidos y derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Los agentes quimioterápicos también incluyen anticuerpos, tales como alemtuzumab (Campath), bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); cetuximab (ERBITUX®, Imclone); panitumumab (VECTIBIX®, Amgen), rituximab (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec), pertuzumab (OMNITARG®, 2C4, Genentech), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), tositumomab (Bexxar, Corixa) y el conjugado anticuerpo-fármaco, gemtuzumab ozogamicina (MYLOTARG®, Wyeth). Los anticuerpos monoclonales humanizados adicionales con potencial terapéutico como agentes en combinación con los compuestos de la invención incluyen: apolizumab, aselizumab, atlizumab, bapineuzumab, bivatuzumab mertansina, cantuzumab mertansina, cedelizumab, certolizumab pegol, cidfusituzumab, cidtuzumab, daclizumab, eculizumab, efalizumab, epratuzumab, erlizumab, felvizumab, fontolizumab, gemtuzumab ozogamicina, inotuzumab ozogamicina, ipilimumab, labetuzumab, lintuzumab, matuzumab, mepolizumab, motavizumab, motovizumab, natalizumab, nimotuzumab, nolovizumab, numavizumab, ocrelizumab, omalizumab, palivizumab, pascolizumab, pecfusituzumab, pectuzumab, pexelizumab, ralvizumab, ranibizumab, reslizumab, resyvizumab, rovelizumab, ruplizumab, sibrotuzumab, sipilizumab, sontuzumab, tacatuzumab tetraxetano, tadocizumab, talizumab, tefibazumab, tocilizumab, toralizumab, tucotuzumab celmoleucina, tucosituzumab, umavizumab, urtoxazumab, ustekinumab, visilizumab y anti-interleucina 12 (ABT-874/J695, Wyeth Research and Abbott Laboratories), que es un anticuerpo IgG1  $\lambda$  de longitud completa de secuencia exclusivamente humana recombinante genéticamente modificado para reconocer la proteína p40 de interleucina 12.

Los agentes quimioterápicos también incluyen "inhibidores de EGFR", que se refiere a compuestos que se unen a o interactúan de otro modo directamente con EGFR y evitan o reducen su actividad de señalización y, de forma alternativa, se denominan "antagonistas de EGFR". Los ejemplos de dichos agentes incluyen anticuerpos y moléculas pequeñas que se unen a EGFR. Los ejemplos de anticuerpos que se unen a EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase la patente de EE. UU. n.º 4.943.533, Mendelsohn et al.) y variantes de los mismos, tales como 225 quimerizado (C225 o cetuximab; ERBUTIX®) y 225 humano (H225) remodelado (véase el documento WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, un anticuerpo dirigido a EGFR totalmente humano (Imclone); anticuerpos que se unen a EGFR mutante de tipo II (patente de EE. UU. n.º 5.212.290); anticuerpos humanizados y quiméricos que se unen a EGFR como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.891.996; y anticuerpos humanos que se unen a EGFR, tales como ABX-EGF o panitumumab (véase el documento WO98/50433, Abgenix/Amgen); EMD 55900 (Stragliotto et al. Eur. J. Cancer 32A:636-640 (1996)); EMD7200 (matuzumab), un anticuerpo frente a EGFR humanizado dirigido contra EGFR que compete tanto con EGF como con TGF-alfa por la unión a EGFR (EMD/Merck); anticuerpo frente a EGFR humano, HuMax-EGFR (GenMab); anticuerpos totalmente humanos conocidos como E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6.3 y E7.6.3 y descritos en el documento US 6.235.883; MDX-447 (Medarex Inc); y mAb 806 o mAb 806 humanizado (Johns et al., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)). El anticuerpo anti-EGFR se puede conjugar con un agente citotóxico, generando, por tanto, un inmunoconjugado (véase, por ejemplo, el documento EP659.439A2, Merck Patent GmbH). Los antagonistas de EGFR incluyen moléculas pequeñas, tales como los compuestos descritos en las patentes de EE. UU. n.ºs 5.616.582, 5.457.105, 5.475.001, 5.654.307, 5.679.683, 6.084.095, 6.265.410, 6.455.534, 6.521.620, 6.596.726, 6.713.484, 5.770.599, 6.140.332, 5.866.572, 6.399.602, 6.344.459, 6.602.863, 6.391.874, 6.344.455, 5.760.041, 6.002.008 y 5.747.498, así como las siguientes publicaciones PCT: WO98/14451, WO98/50038, WO99/09016 y WO99/24037. Los antagonistas de EGFR de molécula pequeña particulares incluyen OSI-774 (CP-358774, erlotinib, TARCEVA® Genentech/OSI Pharmaceuticals); PD 183805 (CI 1033, 2-propenamida, N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[3-(4-morfolinil)propoxi]-6-quinazolinil]-diclorhidrato, Pfizer Inc.); ZD1839, gefitinib (IRESSA®) (4-(3'-cloro-4'-fluoroanilino)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)quinazolina, AstraZeneca); ZM 105180 ((6-amino-4-(3-metilfenil-amino)-quinazolina, Zeneca); BIBX-1382 (N8-(3-cloro-4-fluoro-fenil)-N2-(1-metil-piperidin-4-il)-pirimido[5,4-d]pirimidin-2,8-diamina, Boehringer Ingelheim); PKI-166 ((R)-4-[4-[(1-feniletíl)amino]-1H-pirrol-2,3-d]pirimidin-6-il]-fenol); CL-387785 (R)-6-(4-hidroxifenil)-4-[(1-feniletíl)amino]-7H-pirrol-2,3-d]pirimidina); EKB-569 (N-[4-[(3-bromofenil)amino]-6-quinazolinil]-2-butenamida); AG1478 (N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolinil]-4-(dimetilamino)-2-butenamida) (Wyeth); AG1571 (Pfizer); AG1571 (SU 5271; Pfizer); inhibidores dobles de tirosina cinasas EGFR/HER2, tales como lapatinib (TYKERB®, GSK572016) o N-[3-cloro-4-[(3-fluorofenil)metoxi]fenil]-6[[[(2-metilsulfonil)etil]amino]metil]-2-furanil]-4-quinazolinamina).

Los agentes quimioterápicos también incluyen "inhibidores de tirosina cinasas", incluyendo los fármacos dirigidos a EGFR indicados en el párrafo precedente; inhibidor de tirosina cinasa para HER2 de molécula pequeña, tal como TAK165, disponible de Takeda; CP-724.714, un inhibidor selectivo oral de la tirosina cinasa receptora ErbB2 (Pfizer y OSI); inhibidores dobles de HER, tales como EKB-569 (disponible de Wyeth), que se une preferentemente a EGFR, pero inhibe las células que sobreexpresan tanto HER2 como EGFR; lapatinib (GSK572016; disponible de Glaxo-SmithKline), un inhibidor de tirosina cinasa oral para HER2 y EGFR; PKI-166 (disponible de Novartis); inhibidores de pan-HER, tales como canertinib (CI-1033; Pharmacia); inhibidores de Raf-1, tales como el agente antisentido ISIS-5132, disponible de ISIS Pharmaceuticals, que inhiben la señalización de Raf-1; inhibidores de TK no dirigidos a HER, tales como mesilato de imatinib (GLEEVEC®, disponible de Glaxo SmithKline); inhibidores de tirosina cinasas con múltiples dianas, tales como sunitinib (SUTENT®, disponible de Pfizer); inhibidores de tirosina cinasas receptoras de VEGF, tales como vatalanib (PTK787/ZK222584, disponible de Novartis/Schering AG); inhibidor de cinasas I reguladas extracelularmente para MAPK CI-1040 (disponible de Pharmacia); quinazolininas, tales como PD 153035, 4-(3-cloroanilino)quinazolina; piridopirimidinas; pirrolopirimidinas, tales como CGP 59326, CGP 60261 y CGP 62706; pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrol-2,3-d]pirimidinas; curcumina (diferuloilmetano, 4,5-bis(4-fluoroanilino)ftalimida); tirfostinas que contienen restos nitrotiofeno; PD-0183805 (Warner-Lambers); moléculas antisentido (por ejemplo, las que se unen a ácido nucleico que codifica HER); quinoxalinas (patente de EE. UU. n.º 5.804.396); tirfostinas (patente de EE. UU. n.º 5.804.396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); inhibidores de pan-HER, tales como CI-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); mesilato de imatinib (GLEEVEC®); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); semaxinib (Pfizer); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone), rapamicina (sirólimus, RAPAMUNE®); o como se describe en cualquiera de las siguientes publicaciones de patente: pat. de EE. UU. n.º 5.804.396, documentos WO 1999/09016, WO 1998/43960, WO 1997/38983, WO 1999/06378, WO 1999/06396, WO 1996/30347, WO 1996/33978, WO 1996/3397 y WO 1996/33980.

Los agentes quimioterápicos también incluyen dexametasona, interferones, colquicina, metoprina, ciclosporina, anfotericina, metronidazol, alemtuzumab, alitretinoína, alopurinol, amifostina, trióxido de arsénico, asparaginasa, BCG viva, bevacuzimab, bexaroteno, cladribina, clofarabina, darbepoetina alfa, denileucina, dextrazoxano, epotetin alfa, elotinib, filgrastim, acetato de histrelin, ibritumomab, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, lenalidomida, levamisol, mesna, metoxaleno, nandrolona, nelarabina, nofetumomab, oprelvecina, palifermina,

pamidronato, pegademasa, pegaspargasa, pegfilgrastim, pemetrexed disódico, plicamicina, porfímero sódico, mepacrina, rasburicasa, sargramostim, temozolomida, VM-26, 6-TG, toremifeno, tretinoína, ácido retinoico (ATRA), valrubicina, zoledronato y ácido zoledrónico y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

5 El término "profármaco", como se usa en el presente documento, se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para células tumorales en comparación con el fármaco original y se puede activar o convertir enzimáticamente en la forma original más activa. Véanse, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) y Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery" Directed Drug  
10 Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados con aminoácidos D, profármacos glucosilados, profármacos que contienen  $\beta$ -lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida,  
15 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que se pueden convertir en el fármaco libre citotóxico más activo. Los ejemplos de fármacos citotóxicos que se pueden derivatizar en una forma de profármaco para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los agentes quimioterápicos descritos anteriormente.

Un "agente inhibidor del crecimiento", cuando se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento y/o proliferación de una célula (por ejemplo, una célula con un crecimiento que depende de la expresión de PD-L1) in vitro o bien in vivo. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser aquel que reduce significativamente el porcentaje de células en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Los bloqueadores clásicos de la fase M  
25 incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de la topoisomerasa II, tales como el antibiótico de antraciclina doxorubicina ((8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi- $\alpha$ -L-lixo-hexapiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenodiona), epirubicina, daunorrubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen la G1 también afectan la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno,  
30 prednisona, dacarbacina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluoruracilo y Ara-C. Se puede encontrar información adicional 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: Filadelfia, 1995), en especial p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos antineoplásicos derivados ambos del árbol del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos evitando la despolimerización, lo que da como resultado la inhibición de mitosis en células.

Por "radioterapia" se quiere decir el uso de rayos gamma o rayos beta dirigidos para inducir suficiente daño en una célula para limitar su capacidad de funcionar normalmente o para destruir la célula por completo. Se apreciará que existen muchas formas conocidas en la técnica para determinar la dosificación y duración del tratamiento. Los tratamientos típicos se dan como una administración en una sola dosis y las dosificaciones típicas varían de 10 a 200 unidades (grays) por día.

45 El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en una forma tal que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma sea eficaz, y que no contiene ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un paciente al que se le administraría la formulación.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un paciente. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

El término "prospecto del envase" se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, politerapia, contraindicaciones y/o advertencias en relación con el uso de dichos productos terapéuticos.

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

60 Un "artículo de fabricación" es cualquier fabricación (por ejemplo, un envase o recipiente) o kit que comprende al menos un reactivo, por ejemplo, un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer), o una sonda para detectar específicamente un biomarcador descrito en el presente documento.

El término "molécula pequeña" se refiere a cualquier molécula con un peso molecular de aproximadamente 2000 dáltones o menos, preferentemente, de aproximadamente 500 dáltones o menos.

La palabra "marcador", cuando se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o composición que se conjuga o fusiona directa o indirectamente con un reactivo, tal como una sonda polinucleotídica o un anticuerpo y facilita la detección del reactivo con el que se conjuga o fusiona. El marcador por sí mismo puede ser detectable (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que sea detectable. El término pretende englobar el marcado directo de una sonda o anticuerpo acoplado (es decir, enlazando físicamente) una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como el marcado indirecto de la sonda o anticuerpo por reactividad con otro reactivo que se marca directamente. Los ejemplos de marcado indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado de forma fluorescente y el marcado de extremo de una sonda de ADN con biotina de modo que se pueda detectar con estreptavidina marcada de forma fluorescente.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, semianticuerpos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos bispecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten la actividad biológica deseada. El término "inmunoglobulina" (Ig) se usa de manera intercambiable con anticuerpo en el presente documento.

Los "anticuerpos naturales" son normalmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dáltones, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se enlaza a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de isotipos de inmunoglobulina diferentes. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados de forma regular. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (VL) en un extremo y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos aminoacídicos particulares forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada.

Un anticuerpo "aislado" es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían en usos de investigación, diagnóstico y/o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de células recombinantes, puesto que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Habitualmente, sin embargo, un anticuerpo aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

Un anticuerpo "de bloqueo" o un anticuerpo "antagonista" es aquel que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Por ejemplo, un anticuerpo antagonista específico de PD-L1 se une a PD-L1 y disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-1 con PD-L1 y/o PD-L2. Los anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas preferentes inhiben completamente la actividad biológica del antígeno.

A menos que se indique de otro modo, la expresión "anticuerpo multivalente" se usa por toda esta memoria descriptiva para indicar un anticuerpo que comprende tres o más sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente preferentemente se genomanipula para que tenga los tres o más sitios de unión a antígeno y, en general, no es un anticuerpo IgM o IgA de secuencia natural.

Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de mamífero se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa ("κ") y lambda ("λ"), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

El término "dominio constante" se refiere a la porción de una molécula de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos más conservada en relación con la otra porción de la inmunoglobulina, el dominio variable, que contiene el sitio de unión a antígeno. El dominio constante contiene los dominios CH1, CH2 y CH3 (conjuntamente, CH) de la cadena pesada y el dominio CHL (o CL) de la cadena ligera.

La "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios aminoterminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada se puede denominar "VH". El dominio variable de la cadena ligera se puede denominar "VL". Estos dominios son, en general, las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión a antígeno.

El término "variable" se refiere al hecho de que determinados segmentos de los dominios variables difieren extensamente en secuencia entre los anticuerpos. El dominio variable o "V" media en la unión a antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente en todo el espacio de los dominios variables. En cambio, las regiones V consisten en tramos relativamente invariables denominados regiones estructurales (FR) de 15-30 aminoácidos separados por regiones

más cortas de variabilidad extrema denominadas "regiones hipervariables" que tienen cada una 9-12 aminoácidos de longitud. El término "región hipervariable" o "HVR" cuando se usa en el presente documento se refiere a los residuos aminoacídicos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende, en general, los residuos aminoacídicos, por ejemplo, de alrededor de aproximadamente los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el VL, y alrededor de aproximadamente los residuos 26-35 (H1), 49-65 (H2) y 95-102 (H3) en el VH (en un modo de realización, H1 es de alrededor de aproximadamente los residuos 31-35); Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.<sup>a</sup> ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los residuos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el VL y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el VH); Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras naturales comprenden cada uno cuatro FR, adoptando en gran medida una configuración de lámina beta, conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan y, en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.<sup>a</sup> ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). En consecuencia, las secuencias de HVR y FR aparecen, en general, en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1 (L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4. Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

Una "región estructural humana aceptora" para los propósitos en el presente documento es una región estructural que comprende la secuencia de aminoácidos de una región estructural del dominio variable de la cadena ligera (VL) o una región estructural del dominio variable de la cadena pesada (VH) derivada de una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana, como se define a continuación. Una región estructural humana aceptora "derivada de" una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunos modos de realización, el número de cambios de aminoácidos es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. En algunos modos de realización, la región estructural humana aceptora de VL es idéntica en secuencia a la secuencia de la región estructural de inmunoglobulina humana de VL o la secuencia de la región estructural consenso humana.

El término "región hipervariable", "HVR" o "HV", como se usa en el presente documento, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son de secuencia hipervariable y/o forman bucles estructuralmente definidos. En general, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). En anticuerpos naturales, H3 y L3 presentan la mayor diversidad de las seis HVR, y se cree que H3 en particular desempeña un papel único al conferir una especificidad precisa a los anticuerpos. Véanse, por ejemplo, Xu et al., *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson y Wu, en *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J., 2003). De hecho, los anticuerpos de camélido naturales que consisten en una cadena pesada solo son funcionales y estables en ausencia de la cadena ligera. Véanse, por ejemplo, Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff et al., *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

Una serie de delimitaciones de HVR están en uso y se engloban en el presente documento. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las usadas más comúnmente (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.<sup>a</sup> ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Chothia se refiere, en cambio, a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Las HVR de AbM representan un término medio entre las HVR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se usan por 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 residuos 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	H26-H35b	H26-H32	H30-H35b (numeración de Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (numeración de Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las HVR pueden comprender "HVR extendidas" como sigue: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 o 89-96 (L3) en el VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102, o 95-102 (H3) en el VH. Los residuos del dominio variable se numeran de acuerdo con Kabat et al., supra, para cada una de estas definiciones.



Los residuos de la "región estructural" o "FR" son los residuos del dominio variable distintos de los residuos de HVR, como se define en el presente documento.

Una "región estructural consenso humana" es una región estructural que representa los residuos aminoacídicos que se producen más comúnmente en una selección de secuencias de región estructural de VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, publicación del NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. En un modo de realización, para el VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat et al., supra. En un modo de realización, para el VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat et al., supra.

El término "numeración de residuos de dominio variable como en Kabat" o "numeración de posiciones aminoacídicas como en Kabat", y variaciones del mismo, se refiere al sistema de numeración usado para dominios variables de la cadena pesada o dominios variables de la cadena ligera de la recopilación de anticuerpos en Kabat et al., supra. Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de la cadena pesada puede incluir una única inserción aminoacídica (residuo 52a de acuerdo con Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc., de acuerdo con Kabat) después del residuo 82 de FR de la cadena pesada. La numeración de Kabat de los residuos se puede determinar para un anticuerpo dado por alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada según Kabat "estándar".

El sistema de numeración de Kabat se usa, en general, cuando se hace referencia a un residuo en el dominio variable (aproximadamente los residuos 1-107 de la cadena ligera y los residuos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*, 5.<sup>a</sup> ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). El "sistema de numeración EU" o "índice EU" se usa, en general, cuando se hace referencia a un residuo en una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU que se informa en Kabat et al., supra). El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo IGG1 humano EU. A menos que se establezca de otro modo en el presente documento, las referencias a números de residuo en el dominio variable de los anticuerpos quieren decir la numeración de residuos por el sistema de numeración de Kabat. A menos que se establezca de otro modo en el presente documento, las referencias a números de residuo en el dominio constante de los anticuerpos quieren decir la numeración de residuos por el sistema de numeración EU (por ejemplo, véase la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 60/640.323, figuras para la numeración EU).

A menos que se indique de otro modo, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo, residuos de FR) se numeran en el presente documento de acuerdo con Kabat et al., supra.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no a fragmentos de anticuerpo como se define a continuación. Los términos se refieren, en particular, a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen una región Fc.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que comprende preferentemente la región de unión a antígeno del mismo. En algunos modos de realización, el fragmento de anticuerpo descrito en el presente documento es un fragmento de unión a antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena simple; 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", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, en el que su nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina proporciona un fragmento F(ab')<sub>2</sub> que tiene dos sitios de combinación con antígeno y todavía puede reticular el antígeno.

El término "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. En un modo de realización, una región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende de Cys226, o de Pro230, al extremo carboxílico de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C terminal (Lys447) de la región Fc puede o no estar presente. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de los residuos aminoacídicos en la región Fc o la región constante es de acuerdo con el sistema de numeración EU, también denominado índice EU, como se describe en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.<sup>a</sup> ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

Las "funciones efectoras" se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor de Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión a antígeno completo. En un modo de realización, una especie de Fv bicatenario consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y uno de la ligera en asociación estrecha no covalente. En una especie de Fv monocatenario (scFv), un dominio variable de la cadena pesada y uno de la ligera se pueden enlazar de forma covalente por un conector peptídico flexible de modo que las cadenas ligeras y pesadas se puedan asociar en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie de Fv bicatenario. Es en esta configuración en la que las tres HVR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Conjuntamente, las seis HVR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo 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.

El fragmento Fab contiene los dominios variables de la cadena pesada y ligera y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxílico del dominio CH1 de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para un Fab' en el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes porta(n) un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También son conocidos otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenarios" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. En general, el polipéptido scFv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL, lo que posibilita que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de los scFv, véase, por ejemplo, Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. (Springer-Verlag, Nueva York, 1994), pp. 269-315.

El término "anticuerpo multiespecífico" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) y un dominio variable de la cadena ligera (VL), donde la unidad VH-VL tiene especificidad poliepitópica (es decir, se puede unir a dos epítomos diferentes en una molécula biológica o a cada epítomo en una molécula biológica diferente). Dichos anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de longitud completa, anticuerpos que tienen dos o más dominios VL y VH, fragmentos de anticuerpo tales como Fab, Fv, dsFv, scFv, diacuerpos, triacuerpos y biespecíficos, fragmentos de anticuerpo que se han enlazado de forma covalente o de forma no covalente. "Especificidad poliepitópica" se refiere a la capacidad para unirse específicamente a dos o más epítomos diferentes en la(s) misma(s) o diana(s) diferente(s). "Doble especificidad" o "biespecificidad" se refiere a la capacidad para unirse específicamente a dos epítomos diferentes en la(s) misma(s) o diana(s) diferente(s). Sin embargo, al contrario que los anticuerpos biespecíficos, los anticuerpos de doble especificidad tienen dos brazos de unión a antígeno que son idénticos en su secuencia de aminoácidos y cada brazo Fab puede reconocer a dos antígenos. La doble especificidad permite a los anticuerpos interactuar con alta afinidad con dos antígenos diferentes como una única molécula de Fab o IgG. De acuerdo con un modo de realización, el anticuerpo multiespecífico en una forma IgG1 se une a cada epítomo con una afinidad de 5  $\mu$ M a 0,001 pM, de 3  $\mu$ M a 0,001 pM, de 1  $\mu$ M a 0,001 pM, de 0,5  $\mu$ M a 0,001 pM o de 0,1  $\mu$ M a 0,001 pM. "Monoespecífico" se refiere a la capacidad de unirse solo a un epítomo.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo los fragmentos un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Al usar un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza el emparejamiento de los dominios con los dominios complementarios de otra cadena y se crean dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 1993/01161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993). También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante poseído por su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , respectivamente.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, por ejemplo, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones naturales, que pueden estar presentes en cantidades menores. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos distintos. En determinados modos de realización, un anticuerpo monoclonal de este tipo incluye típicamente un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en el que la secuencia polipeptídica de unión a diana se obtuvo por un procedimiento que incluye la selección de una única secuencia polipeptídica de unión a diana a partir de una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el procedimiento de selección puede ser la selección de un clon único de una pluralidad de clones, tal como un agrupamiento de clones de hibridoma, clones de fago o clones de ADN recombinante. Se debe entender que se puede alterar además una secuencia de unión a diana seleccionada, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a diana, para mejorar su producción en cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad in vivo, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a diana alterada también es un anticuerpo monoclonal de la presente invención. Al contrario que con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas en cuanto a que típicamente no están contaminadas por otras inmunoglobulinas.

El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se ha de interpretar como que requiere la producción del anticuerpo por ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la invención se pueden preparar por una variedad de técnicas, incluyendo, por ejemplo, el procedimiento de hibridoma (por ejemplo, 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, 2.<sup>a</sup> ed. 1988); Hammerling et al., en: *Monoclonal Antibodies and T cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la pat. de EE. UU. n.º 4.816.567), tecnologías de presentación en fagos (véase, por ejemplo, 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 humanizados en animales que tienen partes o la totalidad de los locus de inmunoglobulina humana o genes que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, 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 pat. de EE. UU. n.ºs 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 et al., *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, 1995.

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico a u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (véase, por ejemplo, la pat. de EE. UU. n.º 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos PRIMATIZED® en los que la región de unión a antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido, por ejemplo, por la inmunización de macacos con el antígeno de interés.

Un "anticuerpo humano" es aquel que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedor) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad de anticuerpo deseadas. En algunos casos, se reemplazan residuos de FR de la inmunoglobulina humana por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar además el funcionamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá

sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase 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.

Una secuencia "natural (WT)" o "de referencia" o la secuencia de una proteína/polipéptido "natural" o "de referencia", tal como una HVR o un dominio variable de un anticuerpo de referencia, puede ser la secuencia de referencia de la que se derivan polipéptidos variantes a través de la introducción de mutaciones. En general, la secuencia "natural" para una proteína dada es la secuencia que es la más común en la naturaleza. De forma similar, una secuencia génica "natural" es la secuencia para ese gen que se encuentra lo más comúnmente en la naturaleza. Se pueden introducir mutaciones en un gen "natural" (y, por tanto, en la proteína que lo codifica) a través de procesos naturales o bien a través de medios inducidos por el hombre. Los productos de dichos procesos son formas "variantes" o "mutantes" de la proteína o gen "natural" original.

Una "variante" o "mutante" de un polipéptido de partida o de referencia (por ejemplo, un anticuerpo de referencia o su(s) dominio(s) variable(s)/HVR) es un polipéptido que (1) tiene una secuencia de aminoácidos diferente de la del polipéptido de partida o de referencia y (2) se derivó del polipéptido de partida o de referencia a través de mutagénesis natural o bien artificial (realizada por el hombre). Dichas variantes incluyen, por ejemplo, delecciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de interés, denominadas en el presente documento "alteraciones de residuos aminoacídicos". Por tanto, una HVR variante se refiere a una HVR que comprende una secuencia variante con respecto a una secuencia polipeptídica de partida o de referencia (tal como la de un anticuerpo fuente o fragmento de unión a antígeno). Una alteración de residuo aminoacídico, en este contexto, se refiere a un aminoácido diferente del aminoácido en la posición correspondiente en una secuencia polipeptídica de partida o de referencia (tal como la de un anticuerpo de referencia o fragmento del mismo). Se puede realizar cualquier combinación de delección, inserción y sustitución para llegar a la construcción mutante o variante final, siempre que la construcción final posea las características funcionales deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos postraduccionales del polipéptido, tales como cambiar el número o la posición de sitios de glucosilación.

"Afinidad" se refiere a la intensidad de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique de otro modo, como se usa 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 (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y se puede representar en general por la constante de disociación (Kd). La afinidad se puede medir por procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los modos de realización ilustrativos y ejemplares específicos para medir la afinidad de unión se describen en el presente documento.

Con respecto a la unión de un anticuerpo a una molécula diana, el término "unión específica" o "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítipo en una diana polipeptídica particular quiere decir que la unión es diferente de forma medible de una interacción no específica. La unión específica se puede medir, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control. Por ejemplo, se puede determinar la unión específica por competencia con una molécula de control que sea similar a la diana, por ejemplo, un exceso de diana no marcada. En este caso, se indica la unión específica si la unión de la diana marcada a una sonda se inhibe de forma competitiva por la diana no marcada en exceso. El término "unión específica" o "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítipo en una diana polipeptídica particular como se usa en el presente documento se puede presentar, por ejemplo, por una molécula que tenga una Kd para la diana de  $10^{-4}$  M o menor, de forma alternativa de  $10^{-5}$  M o menor, de forma alternativa de  $10^{-6}$  M o menor, de forma alternativa de  $10^{-7}$  M o menor, de forma alternativa de  $10^{-8}$  M o menor, de forma alternativa de  $10^{-9}$  M o menor, de forma alternativa de  $10^{-10}$  M o menor, de forma alternativa de  $10^{-11}$  M o menor, de forma alternativa de  $10^{-12}$  M o menor o una Kd en el intervalo de  $10^{-4}$  M a  $10^{-6}$  M o de  $10^{-6}$  M a  $10^{-10}$  M o de  $10^{-7}$  M a  $10^{-9}$  M. Como se apreciará por el experto en la técnica, los valores de afinidad y de Kd están inversamente relacionados. Una alta afinidad por un antígeno se mide por un bajo valor de Kd. En un modo de realización, el término "unión específica" se refiere a la unión donde una molécula se une a un polipéptido particular o epítipo en un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítipo de polipéptido.

Un anticuerpo "madurado en afinidad" se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVR), en comparación con un anticuerpo original que no posee dichas alteraciones, dando como resultado dichas alteraciones una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

Un "anticuerpo que se une al mismo epítipo" que un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competencia en un 50 % o más y, a la inversa, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competencia en

un 50 % o más.

Un "inmunconjugado" es un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterógenas, incluyendo, pero sin limitarse a un agente citotóxico.

Una "proteína de fusión" y un "polipéptido de fusión" se refieren a un polipéptido que tiene dos porciones unidas de forma covalente, donde cada una de las porciones es un polipéptido que tiene una propiedad diferente. La propiedad puede ser una propiedad biológica, tal como actividad *in vitro* o *in vivo*. La propiedad también puede ser una simple propiedad química o física, tal como unión a una molécula diana, catálisis de una reacción y similares. Las dos porciones se pueden enlazar directamente por un único enlace peptídico o a través de un conector peptídico, pero están en marco de lectura entre sí.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunoadhesina" designa moléculas similares a anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta del sitio de reconocimiento y unión a antígeno de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina es típicamente una secuencia de aminoácidos contiguos que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina se puede obtener a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG1, IgG2 (incluyendo IgG2A e IgG2B), IgG3 o IgG4, IgA (incluyendo IgA1 e IgA2), 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 lugar de al menos una región variable dentro de una molécula de Ig. En un modo de realización preferente en particular, la fusión de inmunoglobulina incluye las regiones bisagra, CH2 y CH3, o las bisagra, CH1, CH2 y CH3, de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulina, véase también la patente de EE. UU. n.º 5.428.130. Por ejemplo, en el presente documento, las inmunoadhesinas útiles como medicamentos útiles para tratamiento incluyen polipéptidos que comprenden el dominio extracelular (DEC) o las porciones de unión a PD-1 de PD-L1 o PD-L2 o las porciones de unión a PD-L1 o PD-L2 o extracelulares de PD-1, fusionados a un dominio constante de una secuencia de inmunoglobulina, tal como un DEC-Fc de PD-L1, un DEC-Fc de PD-L2 y un DEC-Fc de PD-1, respectivamente. Las combinaciones de inmunoadhesinas de Fc y DEC de Ig de receptores de superficie celular a veces se denominan receptores solubles.

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias polipeptídicas identificadas en el presente documento se define como el porcentaje de residuos aminoacídicos de una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoacídicos del polipéptido con el que se comparan, después de alinear las secuencias e introducir huecos, según sea necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Se puede lograr la alineación para los propósitos de determinación del porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de diversas formas que están dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, usando un programa informático disponible públicamente, tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los propósitos en el presente documento, se generan valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 se creó por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE. UU., Washington D.C., 20559, donde está registrado con el n.º de registro de derechos de autor de EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California. El programa ALIGN-2 se debe compilar para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones donde se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que se puede parafrasear de forma alternativa como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula como sigue:

100 veces la fracción  $X/Y$

donde X es el número de residuos aminoacídicos puntuados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos aminoacídicos en B. Se apreciará que si 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 con respecto a B no igualará el % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se establezca específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo de inmediato precedente usando el programa

informático ALIGN-2.

"Polinucleótido" o "ácido nucleico", como se usa de manera intercambiable en el presente documento, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se puede incorporar en un polímero por ADN o ARN polimerasa, o por una reacción sintética. Por tanto, por ejemplo, los polinucleótidos como se define en el presente documento incluyen, sin limitación, ADN mono y bicatenario, ADN que incluye regiones mono y bicatenarias, ARN mono y bicatenario y ARN que incluye regiones mono y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarias o, más típicamente, bicatenarias o que incluyen regiones mono y bicatenarias. Además, el término "polinucleótido", como se usa en el presente documento, se refiere a regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Las hebras en dichas regiones pueden ser de la misma molécula o de moléculas diferentes. Las regiones pueden incluir todas de una o más de las moléculas, pero más típicamente implican solo una región de algunas de las moléculas. Una de las moléculas de una región triple helicoidal a menudo es un oligonucleótido. El término "polinucleótido" incluye específicamente ADNc.

Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si están presentes, se puede conferir una modificación en la estructura nucleotídica antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos se puede interrumpir por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido se puede modificar además después de la síntesis, tal como por conjugación con un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "caperuzas", sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales por un análogo, modificaciones internucleotídicas, tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos y similares) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos y similares), aquellas que contienen restos laterales, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina y similares), aquellas con intercalantes (por ejemplo, acridina, psoraleno y similares), aquellas que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidativos y similares), aquellas que contienen alquilantes, aquellas con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anómicos), así como formas no modificadas del/de los polinucleótido(s). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo presentes habitualmente en los glúcidos se puede reemplazar, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, proteger por grupos protectores estándar o activar para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales, o se puede conjugar a soportes sólidos o semisólidos. El OH terminal en 5' y 3' se puede fosforilar o sustituir con aminas o restos del grupo caperuza orgánicos de desde 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también se pueden derivatizar a grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de los glúcidos ribosa o desoxirribosa que en general son conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-ácido-ribosa, análogos de glúcidos carbocíclicos, glúcidos  $\alpha$ -anómicos, glúcidos epiméricos, tales como arabinosa, xilosas o lixosas, glúcidos de piranosa, glúcidos de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos nucleosídicos abásicos, tales como metil-ribósido. Se pueden reemplazar uno o más enlaces fosfodiéster por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero no se limitan a, modos de realización en los que el fosfato se reemplaza por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR<sub>2</sub> ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH<sub>2</sub> ("formacetal"), en los que cada R o R' es independientemente H o alquilo (1-20 C) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No se necesita que todos los enlaces en un polinucleótido sean idénticos. La descripción precedente se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en el presente documento, incluyendo ARN y ADN.

"Oligonucleótido", como se usa en el presente documento, en general se refiere a polinucleótidos monocatenarios cortos que tienen, pero no necesariamente, menos de aproximadamente 250 nucleótidos de longitud. Los oligonucleótidos pueden ser sintéticos. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no son mutuamente excluyentes. La descripción anterior para polinucleótidos es igual y totalmente aplicable a oligonucleótidos.

El término "cebador" se refiere a un polinucleótido monocatenario que se puede hibridar a un ácido nucleico y permitir la polimerización de un ácido nucleico complementario, en general proporcionando un grupo 3'-OH libre.

Los términos "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas" que incluyen la célula transformada primaria y la descendencia derivada de la misma independientemente del número de pasajes. La descendencia puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula original, sino que puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento.

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al que se enlaza. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. Determinados vectores pueden dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que se enlazan de forma funcional.

Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

Una molécula de ácido nucleico "aislado" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que se asocia habitualmente en la fuente natural del ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico aislado es distinta en la forma o entorno en el que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aislado se distinguen de la molécula de ácido nucleico como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que habitualmente expresan el anticuerpo donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

Como se usan en el presente documento, los términos "carga mutacional", "carga de mutaciones", "puntuación de carga mutacional del tumor", "puntuación CMT", "puntuación de carga mutacional del tumor tisular" y "puntuación CMTt", de los que cada uno se puede usar de manera intercambiable, se refieren al nivel (por ejemplo, número) de una alteración (por ejemplo, una o más alteraciones, por ejemplo, una o más alteraciones somáticas) por una unidad preseleccionada (por ejemplo, por megabase) en un conjunto de genes predeterminado (por ejemplo, en las regiones codificantes del conjunto de genes predeterminado) detectados en una muestra de tejido tumoral (por ejemplo, una muestra de tumor FFIP, una muestra de tumor de archivo, una muestra de tumor recién preparada o una muestra de tumor congelada). La puntuación CMT se puede medir, por ejemplo, sobre la base de un genoma o exoma completo, o sobre la base de un subconjunto del genoma o exoma. En determinados modos de realización, la puntuación CMT medida sobre la base de un subconjunto del genoma o exoma se puede extrapolar para determinar una carga de mutaciones del genoma o exoma completo. En algunos modos de realización, una puntuación CMT se refiere al nivel de mutaciones somáticas acumuladas dentro de un individuo (por ejemplo, un animal (por ejemplo, un ser humano)). La puntuación CMT se puede referir a mutaciones somáticas acumuladas en un paciente con cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga (por ejemplo, CU, por ejemplo, CUm), un cáncer de riñón (por ejemplo, CCR), un cáncer de pulmón (por ejemplo, CPNM), un cáncer de hígado cáncer, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas (por ejemplo, ACDP), un cáncer colorrectal o un cáncer de mama). En algunos modos de realización, una puntuación CMT se refiere a las mutaciones acumuladas en el genoma completo de un individuo. En algunos modos de realización, una puntuación CMT se refiere a las mutaciones acumuladas dentro de una muestra de tejido particular (por ejemplo, biopsia de muestra de tejido tumoral, por ejemplo, una muestra de tumor de cáncer de vejiga, por ejemplo, una muestra de tumor de CU) obtenida de un individuo.

El término "mutación somática" o "alteración somática" se refiere a una alteración genética que se produce en los tejidos somáticos (por ejemplo, células fuera de la estirpe germinal). Los ejemplos de alteraciones genéticas incluyen, pero no se limitan a, mutaciones puntuales (por ejemplo, el intercambio de un único nucleótido por otro (por ejemplo, mutaciones sinónimas, mutaciones de aminoácidos y mutaciones interruptoras)), inserciones y deleciones (por ejemplo, la adición y/o retirada de uno o más nucleótidos (por ejemplo, índices)), amplificaciones, duplicaciones de genes, alteraciones en el número de copias (ANC), reordenamientos y variantes de empalme. La presencia de mutaciones particulares se puede asociar con enfermedades (por ejemplo, cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga (por ejemplo, CU, por ejemplo, CUm), un cáncer de riñón (por ejemplo, CCR), un cáncer de pulmón (por ejemplo, CPNM), un cáncer de hígado, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas (por ejemplo, ACDP), un cáncer colorrectal o un cáncer de mama)).

En determinados modos de realización, la alteración somática es una mutación sinónima (por ejemplo, una alteración sinónima). En otros modos de realización, la alteración somática es una variante de nucleótido único (VNU) no sinónima. En otros modos de realización, la alteración somática es una mutación secundaria (por ejemplo, una alteración que no tiene ningún efecto detectable sobre la capacidad de un clon). En determinados modos de realización, la alteración somática es una variante de significado desconocido (VSD), por ejemplo, una alteración con una patogenia que no se puede ni confirmar ni descartar. En determinados modos de realización, no se ha identificado la alteración somática como que está asociada con un fenotipo de cáncer.

En determinados modos de realización, la alteración somática no se asocia con, o no es conocido que se asocie con, un efecto sobre la división, el crecimiento o la supervivencia celular. En otros modos de realización, la alteración somática se asocia con un efecto sobre la división, el crecimiento o la supervivencia celular.

En determinados modos de realización, el número de alteraciones somáticas excluye una alteración funcional en un intervalo subgenómico.

En algunos modos de realización, la alteración funcional es una alteración que, en comparación con una secuencia de referencia (por ejemplo, una secuencia natural o no mutada) tiene un efecto sobre la división, el crecimiento o la supervivencia celular (por ejemplo, promueve la división, el crecimiento o la supervivencia celular). En determinados modos de realización, la alteración funcional se identifica como tal por la inclusión en una base de datos de alteraciones funcionales, por ejemplo, la base de datos COSMIC (véase Forbes et al. Nucl. Acids Res. 43 (D1): D805-D811, 2015). En otros modos de realización, la alteración funcional es una alteración con un estado funcional conocido (por ejemplo, que se produce como una alteración somática conocida en la base de datos COSMIC). En determinados modos de realización, la alteración funcional es una alteración con un estado funcional probable (por ejemplo, un truncamiento en un gen supresor de tumores). En determinados modos de realización, la

alteración funcional es una mutación oncogénica (por ejemplo, una alteración que da una ventaja selectiva a un clon en su microambiente, por ejemplo, incrementando la supervivencia o reproducción celular). En otros modos de realización, la alteración funcional es una alteración que puede provocar expansiones clonales. En determinados modos de realización, la alteración funcional es una alteración que puede provocar uno, dos, tres, cuatro, cinco o los seis de los siguientes: (a) autosuficiencia en una señal de crecimiento; (b) por ejemplo, insensibilidad disminuida a una señal anticrecimiento; (c) apoptosis disminuida; (d) potencial replicativo incrementado; (e) angiogénesis mantenida; o (f) invasión de tejido o metástasis.

En determinados modos de realización, la alteración funcional no es una mutación secundaria (por ejemplo, no es una alteración que no tiene ningún efecto detectable sobre la capacidad de un clon de células). En determinados modos de realización, la alteración funcional no es una variante de significado desconocido (VSD) (por ejemplo, no es una alteración con una patogenia que no se puede confirmar ni descartar).

En determinados modos de realización, se excluye una pluralidad (por ejemplo, aproximadamente un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más) de alteraciones funcionales en un gen tumoral preseleccionado en el conjunto de genes predeterminado. En determinados modos de realización, se excluyen todas las alteraciones funcionales en un gen preseleccionado (por ejemplo, gen tumoral) en el conjunto de genes predeterminado. En determinados modos de realización, se excluye una pluralidad de alteraciones funcionales en una pluralidad de genes preseleccionados (por ejemplo, genes tumorales) en el conjunto de genes predeterminado. En determinados modos de realización, se excluyen todas las alteraciones funcionales en todos los genes (por ejemplo, genes tumorales) en el conjunto de genes predeterminado.

En determinados modos de realización, el número de alteraciones somáticas excluye una mutación hereditaria en un intervalo subgenómico.

En determinados modos de realización, la alteración de estirpe germinal es un SNP, una sustitución de bases, una inserción, una delección, una indel o una mutación sinónima (por ejemplo, mutación imperceptible).

En determinados modos de realización, la alteración de estirpe germinal se excluye por el uso de un procedimiento que no usa una comparación con una secuencia normal emparejada. En otros modos de realización, la alteración de estirpe germinal se excluye por un procedimiento que comprende el uso de un algoritmo. En determinados modos de realización, la alteración de estirpe germinal se identifica como tal por la inclusión en una base de datos de alteraciones de estirpe germinal, por ejemplo, la base de datos dbSNP (véase Sherry et al. Nucleic Acids Res. 29(1): 308-311, 2001). En otros modos de realización, la alteración de estirpe germinal se identifica como tal por la inclusión en dos o más recuentos de la base de datos ExAC (véase Exome Aggregation Consortium et al., preimpresión de bioRxiv, 30 de octubre de 2015). En algunos modos de realización, la alteración de estirpe germinal se identifica como tal por su inclusión en la base de datos del Proyecto 1000 genomas (McVean et al. Nature 491, 56-65, 2012). En algunos modos de realización, la alteración de estirpe germinal se identifica como tal por su inclusión en la base de datos ESP (Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA).

Como se usa en el presente documento, el término "puntuación CMT de referencia" se refiere a una puntuación CMT con la que se compara otra puntuación CMT, por ejemplo, para realizar una determinación diagnóstica, predictiva, pronóstica y/o terapéutica. Por ejemplo, la puntuación CMT de referencia puede ser una puntuación CMT en una muestra de referencia, una población de referencia y/o un valor predeterminado. En algunos casos, la puntuación CMT de referencia es un valor de corte que separa significativamente a un primer subconjunto de individuos (por ejemplo, pacientes) que se han tratado con una inmunoterapia, por ejemplo, un tratamiento con antagonista de unión al eje PD-L1, en una población de referencia y un segundo subconjunto de individuos (por ejemplo, pacientes) que se han tratado con un tratamiento con antagonista de no unión al eje PD-L1 que no comprende una inmunoterapia, por ejemplo, un antagonista de unión al eje PD-L1, en la misma población de referencia en base a una diferencia significativa entre la reactividad de un individuo al tratamiento con la inmunoterapia, por ejemplo, un tratamiento con antagonista de unión al eje PD-L1, y la reactividad de un individuo al tratamiento con el tratamiento con antagonista de no unión al eje PD-L1 en o por encima del valor de corte y/o por debajo del valor de corte. En algunos casos, la reactividad del individuo al tratamiento con la inmunoterapia, por ejemplo, un tratamiento con antagonista de unión al eje PD-L1, mejora significativamente en relación con la reactividad del individuo al tratamiento con el tratamiento con antagonista de no unión al eje PD-L1 en o por encima del valor de corte. En algunos casos, la reactividad del individuo al tratamiento con el tratamiento con antagonista de no unión al eje PD-L1 mejora significativamente en relación con la reactividad del individuo al tratamiento con la inmunoterapia, por ejemplo, un tratamiento con antagonista de unión al eje PD-L1, por debajo del valor de corte.

Se apreciará por un experto en la técnica que el valor numérico para la puntuación CMT de referencia puede variar dependiendo del tipo de metodología usada para medir una puntuación CMT y/o de los procedimientos estadísticos usados para generar una puntuación CMT.

El término "valor de CMT equivalente" se refiere a un valor numérico que corresponde a una puntuación CMT que se puede calcular dividiendo el recuento de variantes somáticas (por ejemplo, mutaciones somáticas) entre el



número de bases secuenciadas (por ejemplo, aproximadamente 1,1 Mb (por ejemplo, aproximadamente 1,125 Mb), por ejemplo, como se evalúa por el panel de FOUNDATIONONE®). Se ha de entender que, en general, la puntuación CMT se relaciona linealmente con el tamaño de la región genómica secuenciada. Dichos valores de CMT equivalentes indican un grado equivalente de carga mutacional del tumor en comparación con una puntuación CMT y se pueden usar de manera intercambiable en los procedimientos descritos en el presente documento, por ejemplo, para predecir la respuesta de un paciente con cáncer a una inmunoterapia (por ejemplo, un antagonista de unión al eje PD-L1, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab)) y/o un antagonista estromal supresor (por ejemplo, un antagonista de TGF- $\beta$ , por ejemplo, un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ ). Como ejemplo, en algunos modos de realización, un valor de CMT equivalente es un valor de CMT normalizado que se puede calcular dividiendo el recuento de variantes somáticas (por ejemplo, mutaciones somáticas) entre el número de bases secuenciadas. Por ejemplo, un valor de CMT equivalente se puede representar como el número de mutaciones somáticas contadas sobre un número definido de bases secuenciadas (por ejemplo, aproximadamente 1,1 Mb (por ejemplo, aproximadamente 1,125 Mb), por ejemplo, como se evalúa por el panel de FOUNDATIONONE®). Por ejemplo, una puntuación CMT de aproximadamente 25 (determinada como el número de mutaciones somáticas contadas sobre aproximadamente 1,1 Mb) corresponde a un valor de CMT equivalente de aproximadamente 23 mutaciones/Mb. Se ha de entender que las puntuaciones CMT como se describe en el presente documento (por ejemplo, puntuaciones CMT representadas como el número de mutaciones somáticas contadas sobre un número definido de bases secuenciadas (por ejemplo, aproximadamente 1,1 Mb (por ejemplo, aproximadamente 1,125 Mb), por ejemplo, como se evalúa por el panel de FOUNDATIONONE®)) engloban valores de CMT equivalentes obtenidos usando diferentes metodologías (por ejemplo, secuenciación del exoma completo o secuenciación del genoma completo). Como ejemplo, para un panel de exoma completo, la región diana puede ser de aproximadamente 50 Mb, y una muestra con aproximadamente 500 mutaciones somáticas detectadas es un valor de CMT equivalente con respecto a una puntuación CMT de aproximadamente 10 mutaciones/Mb. En algunos modos de realización, una puntuación CMT determinada como el número de mutaciones somáticas contadas sobre un número definido de bases secuenciadas (por ejemplo, aproximadamente 1,1 Mb (por ejemplo, aproximadamente 1,125 Mb), por ejemplo, como se evalúa por el panel de FOUNDATIONONE®) en un subconjunto del genoma o exoma (por ejemplo, un conjunto de genes predeterminado) se desvía en menos de aproximadamente un 30 % (por ejemplo, menos de aproximadamente un 30%, aproximadamente un 25 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 15 %, aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 4 %, aproximadamente un 3 %, aproximadamente un 2 %, aproximadamente un 1 % o menos) de una puntuación CMT determinada por secuenciación del exoma completo. Véase, por ejemplo, Chalmers et al. Genome Medicine 9:34, 2017.

## II. PROCEDIMIENTOS Y ENSAYOS DIAGNÓSTICOS

En el presente documento se proporcionan procedimientos y usos para identificar a un individuo que tiene un cáncer (incluyendo, pero sin limitarse a, un cáncer de vejiga (por ejemplo, CU, por ejemplo, CUM), un cáncer de riñón (por ejemplo, CCR), un cáncer de pulmón (por ejemplo, CPNM), un cáncer de hígado, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas (por ejemplo, ACDP), un cáncer colorrectal o un cáncer de mama) que se puede beneficiar de un tratamiento con un tratamiento antineoplásico que incluye atezolizumab y un anticuerpo de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecífico.

Los procedimientos y usos descritos en el presente documento se basan, en parte, en el descubrimiento de que el nivel de expresión de los genes TGFB1, TGFB2, ACTA2, ADAM19, COMP y CTGF en una muestra del individuo se puede usar para predecir la eficacia terapéutica de un tratamiento antineoplásico que incluye atezolizumab y un anticuerpo de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecífico.

Además se proporcionan en el presente documento procedimientos y ensayos para seleccionar un tratamiento para un individuo que tiene un cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga (por ejemplo, CU, por ejemplo, CUM), un cáncer de riñón (por ejemplo, CCR), un cáncer de pulmón (por ejemplo, CPNM), un cáncer de hígado, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas (por ejemplo, ACDP), un cáncer colorrectal o un cáncer de mama); procedimientos para determinar si es probable que un individuo que tiene un cáncer responda al tratamiento con un tratamiento antineoplásico que incluye atezolizumab y un anticuerpo de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecífico; procedimientos para predecir la reactividad de un individuo que tiene un cáncer al tratamiento con un tratamiento antineoplásico que incluye atezolizumab y un anticuerpo de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecífico; y procedimientos para realizar un seguimiento de la respuesta de un individuo que tiene un cáncer al tratamiento con un tratamiento antineoplásico que incluye atezolizumab y un anticuerpo de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecífico.

### B. Firma de 6 genes ejemplar

Los procedimientos y usos en el presente documento implican determinar el nivel de expresión de genes a partir de una firma de 6 genes que incluye ACTA2, ADAM19, COMP, CTGF, TGFB1 y TGFB2.

Por ejemplo, en el presente documento se proporciona un procedimiento de identificación de un individuo que tiene un cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga (por ejemplo, CU, por ejemplo, CUM), un cáncer de riñón (por ejemplo, CCR), un cáncer de pulmón (por ejemplo, CPNM), un cáncer de hígado, un cáncer de ovario, un cáncer de

páncreas (por ejemplo, ACDP), un cáncer colorrectal o un cáncer de mama) que se puede beneficiar del tratamiento con un tratamiento antineoplásico que comprende atezolizumab y un anticuerpo de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecífico, comprendiendo el procedimiento determinar el nivel de expresión de 6 de los siguientes genes en una muestra del individuo: ACTA2, ADAM19, COMP, CTGF, TGFB1 y TGFB2, en el que el nivel de expresión de

Se describe además un procedimiento para seleccionar un tratamiento para un individuo que tiene un cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga (por ejemplo, CU, por ejemplo, CUM), un cáncer de riñón (por ejemplo, CCR), un cáncer de pulmón (por ejemplo, CPNM), un cáncer de hígado, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas (por ejemplo, ACDP), un cáncer colorrectal o un cáncer de mama), comprendiendo el procedimiento determinar el nivel de expresión de los siguientes genes en una muestra del individuo: ACTA2, ADAM19, COMP, CTGF, TGFB1 o TGFB2, en el que un nivel de expresión de uno o más de ACTA2, ADAM19, COMP, CTGF, TGFB1 o TGFB2 en la muestra que está en o por encima de un nivel de expresión de referencia de los genes identifica el individuo como alguien que se puede beneficiar del tratamiento con un tratamiento antineoplásico que comprende atezolizumab y un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ .

Aún en otro modo de realización, se proporciona en el presente documento un procedimiento de determinación de si un individuo que tiene un cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga (por ejemplo, CU, por ejemplo, CUM), un cáncer de riñón (por ejemplo, CCR), un cáncer de pulmón (por ejemplo, CPNM), un cáncer de hígado, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas (por ejemplo, ACDP), un cáncer colorrectal o un cáncer de mama) es probable que responda al tratamiento con atezolizumab y un anticuerpo de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecífico, comprendiendo el procedimiento determinar el nivel de expresión de los siguientes genes en una muestra del individuo: ACTA2, ADAM19, COMP, CTGF, TGFB1 y TGFB2, en el que un nivel de expresión de ACTA2, ADAM19, COMP, CTGF, TGFB1 y TGFB2 en la muestra que está en o por encima de un nivel de expresión de referencia de los genes identifica al individuo como alguien que es probable que responda al tratamiento con atezolizumab y un anticuerpo de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecífico.

En determinados modos de realización, un nivel de expresión de referencia es la mediana del nivel de expresión de los genes en una población de referencia, por ejemplo, una población de individuos que tienen un cáncer. En otros modos de realización, el nivel de expresión de referencia puede ser el 40 % superior, el 30 % superior, el 20 % superior, el 10 % superior, el 5 % superior o el 1 % superior del nivel de expresión en la población de referencia. En algunos modos de realización, el nivel de expresión de referencia se determina por el análisis de componentes principales de los niveles de expresión transformados con puntuación Z. En determinados modos de realización, el nivel de expresión de referencia es un nivel de expresión preasignado para los genes. En algunos modos de realización, el nivel de expresión de referencia es el nivel de expresión de los genes en una muestra biológica obtenida del paciente en un punto temporal previo, en el que el punto temporal previo es tras la administración del tratamiento antineoplásico. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos precedentes, un nivel de expresión de referencia es el nivel de expresión de los genes (por ejemplo, ACTA2, ADAM19, COMP, CTGF, TGFB1 y TGFB2) en una muestra biológica del paciente obtenida antes de (por ejemplo, minutos, horas, días, semanas (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 semanas), meses o años antes de) la administración del tratamiento antineoplásico. En otros modos de realización, el nivel de expresión de referencia es el nivel de expresión de los genes en una muestra biológica obtenida del paciente en un punto temporal posterior (por ejemplo, minutos, horas, días, semanas, meses o años después de la administración de un tratamiento antineoplásico).

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos precedentes que implican la firma de 6 genes, un nivel de expresión por encima de un nivel de expresión de referencia, o una expresión o número elevado o incrementado, se refiere a un incremento global de aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor en el nivel o número de un biomarcador (por ejemplo, proteína, ácido nucleico (por ejemplo, gen o ARNm) o célula), detectado por procedimientos tales como los descritos en el presente documento y/o conocidos en la técnica, en comparación con un nivel de expresión de referencia, muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control. En la divulgación, la expresión o número elevado se refiere al incremento en el nivel de expresión/cantidad de un biomarcador (por ejemplo, uno o más de ACTA2, ADAM19, COMP, CTGF, TGFB1 y/o TGFB2) en la muestra en la que el incremento es al menos aproximadamente cualquiera de 1,1x, 1,2x, 1,3x, 1,4x, 1,5x, 1,6x, 1,7x, 1,8x, 1,9x, 2x, 2,1x, 2,2x, 2,3x, 2,4x, 2,5x, 2,6x, 2,7x, 2,8x, 2,9x, 3x, 3,5x, 4x, 4,5x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 15x, 20x, 30x, 40x, 50x, 100x, 500x o 1000x el nivel de expresión/cantidad del biomarcador respectivo en un nivel de expresión de referencia, muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control. En la divulgación, la expresión o número elevado se refiere a un incremento global en el nivel de expresión/cantidad de un biomarcador (por ejemplo, ACTA2, ADAM19, COMP, CTGF, TGFB1 y/o TGFB2) de más de aproximadamente 1,1 veces, aproximadamente 1,2 veces, aproximadamente 1,3 veces, aproximadamente 1,4 veces, aproximadamente 1,5 veces, aproximadamente 1,6 veces, aproximadamente 1,7 veces, aproximadamente 1,8 veces, aproximadamente 1,9 veces, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 2,1 veces, aproximadamente 2,2 veces, aproximadamente 2,3 veces, aproximadamente 2,4 veces, aproximadamente 2,5 veces, aproximadamente 2,6 veces, aproximadamente 2,7

- veces, aproximadamente 2,8 veces, aproximadamente 2,9 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 3,5 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 4,5 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 6 veces, aproximadamente 7 veces, aproximadamente 8 veces, aproximadamente 9 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 15 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 30 veces, aproximadamente 40 veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 100 veces, aproximadamente 500 veces, aproximadamente 1000 veces o más en comparación con un nivel de expresión de referencia, muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control, tejido de control o control interno (por ejemplo, gen constitutivo).
- 10 En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos precedentes que implican la firma de 6 genes, un tumor del individuo tiene un fenotipo con exclusión inmunitaria caracterizado por la localización de linfocitos T CD8+ en el compartimento estromal peritumoral. En algunos modos de realización, los linfocitos T CD8+ se localizan en o cerca de las fibras de colágeno.
- 15 D. Biomarcadores adicionales ejemplares (por ejemplo, firma de T efectores CD8+)
- Cualquiera de los procedimientos precedentes (por ejemplo, como se describe en la sección II, subsecciones A-C anteriores, en relación con las firmas de 6 genes) puede incluir además determinar el nivel de expresión en la muestra de uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9) genes adicionales seleccionados del grupo que consiste en PD-L1, CD8A, CXCL10, CXCL9, GZMA, GZMB, IFNG, PRF1 y TBX21. En algunos modos de realización, el uno o más genes adicionales es PD-L1. En otros modos de realización, el uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) genes adicionales se seleccionan del grupo que consiste en CD8A, CXCL10, CXCL9, GZMA, GZMB, IFNG, PRF1 y TBX21, que también se denomina en el presente documento firma de T efectores (Tef) CD8+. En algunos modos de realización, el procedimiento incluye además determinar el nivel de expresión de al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete o los ocho de CD8A, CXCL10, CXCL9, GZMA, GZMB, IFNG, PRF1 y TBX21. En algunos modos de realización, el uno o más genes adicionales son CD8A, CXCL10, CXCL9, GZMA, GZMB, IFNG, PRF1 y TBX21.
- 25 E. Carga mutacional del tumor (CMT)
- 30 Cualquiera de los modos de realización precedentes (por ejemplo, como se describe anteriormente, en relación con las firmas de 6 genes, o en la sección II, subsección D) puede incluir además determinar una CMT en una muestra de tumor del individuo. La CMT se puede determinar usando cualquier enfoque adecuado, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 1 a continuación o en la solicitud de patente internacional n.º: PCT/US2017/055669. En algunos modos de realización, el individuo puede tener una CMT en una muestra de tumor que está en o por encima de una CMT de referencia. En otros modos de realización, el individuo puede tener una CMT que está por debajo de una CMT de referencia.
- 35 Cualquiera de los procedimientos precedentes que implican CMT puede incluir además determinar el nivel de expresión de uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) de los siguientes genes de Tef en una muestra del individuo: CD8A, CXCL10, CXCL9, GZMA, GZMB, IFNG, PRF1 o TBX21.
- 40 F. Enfoques ejemplares para la determinación de niveles de expresión de biomarcadores
- 45 La presencia y/o el nivel de expresión de cualquiera de los biomarcadores descritos anteriormente (por ejemplo, como se describe en la sección II, subsecciones A-C anteriormente, en relación con las firmas de 6 genes o en la sección II, subsecciones D y E) se puede evaluar cualitativa y/o cuantitativamente en base a cualquier criterio adecuado conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, ADN, ARNm, ADNc, proteínas, fragmentos de proteína y/o o número de copias del gen. Las metodologías para medir dichos biomarcadores son conocidas en la técnica y se entienden por el experto en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, inmunohistoquímica ("IHC"), análisis de inmunoelectrotransferencia, inmunoprecipitación, ensayos de unión molecular, ELISA, ELIFA, separación celular activada por fluorescencia ("FACS"), MassARRAY, proteómica, ensayos cuantitativos basados en sangre (por ejemplo, ELISA en suero), ensayos bioquímicos de actividad enzimática, hibridación in situ (ISH), hibridación in situ con fluorescencia (FISH), análisis Southern, análisis Northern, secuenciación del genoma completo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) incluyendo PCR ultrarrápida cuantitativa (qRT-PCR) y otros procedimientos de detección de tipo de amplificación, tales como, por ejemplo, ADN ramificado, SISBA, TMA y similares, RNASeq, análisis de micromatrices, identificación de perfiles de expresión génica, secuenciación del genoma completo (SGC) y/o análisis en serie de expresión génica ("SAGE"), así como uno cualquiera de la amplia variedad de ensayos que se pueden realizar por análisis de matrices de proteínas, genes y/o tejidos. Los protocolos típicos para evaluar el estado de genes y productos génicos se encuentran, por ejemplo, en Ausubel et al., eds. (Current Protocols In Molecular Biology, 1995), unidades 2 (transferencia de Northern), 4 (transferencia de Southern), 15 (inmunotransferencia) y 18 (análisis de PCR). También se pueden usar inmunoensayos multiplexados tales como los disponibles de Rules Based Medicine o Meso Scale Discovery ("MSD").
- 60 En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos precedentes, el nivel de expresión de un biomarcador puede ser un nivel de expresión de ácido nucleico (por ejemplo, un nivel de expresión de ADN o un
- 65

nivel de expresión de ARN (por ejemplo, un nivel de expresión de ARNm)). Se puede usar cualquier procedimiento adecuado de determinación de un nivel de expresión de ácido nucleico. En algunos modos de realización, el nivel de expresión de ácido nucleico se determina usando RNAseq, RT-qPCR, qPCR, qPCR múltiple o RT-qPCR, análisis de micromatrices, SAGE, técnica MassARRAY, ISH o una combinación de los mismos.

Los procedimientos para la evaluación de ARNm en células son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, análisis en serie de expresión génica (SAGE), secuenciación del genoma completo (SGC), ensayos de hibridación usando sondas de ADN complementario (tales como hibridación in situ usando ribosondas marcadas específicas para el uno o más genes, transferencia Northern y técnicas relacionadas) y diversos ensayos de amplificación de ácido nucleico (tales como RT-PCR (por ejemplo, qRT-PCR) usando cebadores complementarios específicos para uno o más de los genes y otros procedimientos de detección de tipo de amplificación, tales como, por ejemplo, ADN ramificado, SISBA, TMA y similares). Además, dichos procedimientos pueden incluir una o más etapas que permiten determinar los niveles de ARNm diana en una muestra biológica (por ejemplo, examinando simultáneamente los niveles de una secuencia de ARNm de control comparativo de un gen "constitutivo", tal como un miembro de la familia de la actina). Opcionalmente, se puede determinar la secuencia del ADNc diana amplificado. Los procedimientos opcionales incluyen protocolos que examinan o detectan ARNm, tales como ARNm diana, en una muestra de tejido o de células por tecnologías de micromatrices. Usando micromatrices de ácido nucleico, las muestras de ARNm de prueba y control de las muestras de tejido de prueba y control se retrotranscriben y se marcan para generar sondas de ADNc. A continuación, las sondas se hibridan a una matriz de ácidos nucleicos inmovilizados en un soporte sólido. La matriz se configura de modo que la secuencia y la posición de cada miembro de la matriz son conocidas. Por ejemplo, una selección de genes con una expresión que se correlaciona con un beneficio clínico incrementado o reducido del tratamiento que comprende una inmunoterapia y un antagonista estromal supresor se puede disponer en un soporte sólido. La hibridación de una sonda marcada con un miembro de matriz particular indica que la muestra de la que se derivó la sonda expresa ese gen.

En otros modos de realización de cualquiera de los procedimientos precedentes, el nivel de expresión de un biomarcador puede ser un nivel de expresión de proteína. En determinados modos de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la muestra con anticuerpos que se unen específicamente a un biomarcador descrito en el presente documento en condiciones propicias para la unión del biomarcador, y detectar si se forma un complejo entre los anticuerpos y el biomarcador. Dicho procedimiento puede ser un procedimiento in vitro o in vivo. En algunos casos, se usa un anticuerpo para seleccionar pacientes elegibles para el tratamiento con un tratamiento antineoplásico que incluye una inmunoterapia (por ejemplo, un antagonista de unión al eje PD-L1, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab)) y/o un antagonista estromal supresor (por ejemplo, un antagonista de TGF- $\beta$ , por ejemplo, un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ ), por ejemplo, un biomarcador para la selección de individuos.

Se puede usar cualquier procedimiento de medición de los niveles de expresión de proteínas conocidos en la técnica o proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, en algunos modos de realización, se determina un nivel de expresión de proteínas de un biomarcador usando un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en procedimientos de citometría de flujo (por ejemplo, separación celular activada por fluorescencia (FACS<sup>TM</sup>)), inmunoelectrotransferencia, ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), inmunoprecipitación, inmunohistoquímica (IHQ), inmunofluorescencia, radioinmunoanálisis, inmunotransferencia por puntos, inmunodetección, HPLC, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía óptica, espectrometría de masas y HPLC. En algunos modos de realización, el nivel de expresión de proteínas del biomarcador se determina en células inmunitarias infiltrantes de tumor. En algunos modos de realización, el nivel de expresión de proteínas del biomarcador se determina en células tumorales. En algunos modos de realización, el nivel de expresión de proteínas del biomarcador se determina en células inmunitarias infiltrantes de tumor y/o en células tumorales. En algunos modos de realización, el nivel de expresión de proteínas del biomarcador se determina en leucocitos mononucleares en sangre periférica (PBMC).

En determinados modos de realización, la presencia y/o nivel de expresión/cantidad de una proteína biomarcadora en una muestra se examina usando IHQ y protocolos de tinción. Se ha demostrado que la tinción IHQ de cortes histológicos es un procedimiento fiable de determinación o detección de la presencia de proteínas en una muestra. En un modo de realización, el nivel de expresión del biomarcador se determina usando un procedimiento que comprende: (a) realizar un análisis IHQ de una muestra (tal como una muestra de tumor obtenida de un paciente) con un anticuerpo; y (b) determinar el nivel de expresión de un biomarcador en la muestra. En algunos modos de realización, la intensidad de tinción IHQ se determina en relación con una referencia. En algunos modos de realización, la referencia es un valor de referencia. En algunos modos de realización, la referencia es una muestra de referencia (por ejemplo, una muestra de tinción de línea celular de control, una muestra de tejido de un paciente sin cáncer o una muestra de tumor que se determina que es negativa para el biomarcador de interés).

La IHQ se puede realizar en combinación con técnicas adicionales, tales como tinción morfológica y/o hibridación in situ (por ejemplo, ISH). Están disponibles dos procedimientos generales de IHQ; ensayos directos e indirectos. De acuerdo con el primer ensayo, la unión del anticuerpo al antígeno diana se determina directamente. Este ensayo directo usa un reactivo marcado, tal como una marca fluorescente o un anticuerpo primario marcado con enzima, que se puede visualizar sin interacción de anticuerpo adicional. En un ensayo indirecto típico, el anticuerpo primario

no conjugado se une al antígeno y, a continuación, un anticuerpo secundario marcado se une al anticuerpo primario. Cuando el anticuerpo secundario se conjuga con un marcador enzimático, se añade un sustrato cromógeno o fluorógeno para proporcionar la visualización del antígeno. La amplificación de señal se produce porque varios anticuerpos secundarios pueden reaccionar con diferentes epítomos en el anticuerpo primario.

El anticuerpo primario y/o secundario usado para IHQ típicamente se marcará con un resto detectable. Están disponibles numerosos marcadores que se pueden agrupar en general en las siguientes categorías: (a) radioisótopos, tales como  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  y  $^{131}\text{I}$ ; (b) partículas de oro coloidales; (c) marcadores fluorescentes incluyendo, pero sin limitarse a, quelatos de tierras raras (quelatos de europio), Texas Red, rodamina, fluoresceína, dansilo, lisamina, umbeliferona, ficoeritrina, ficocianina o fluoróforos disponibles comercialmente, tales como SPECTRUM ORANGE7 y SPECTRUM GREEN7 y/o derivados de uno cualquiera o más de los anteriores; (d) están disponibles diversos marcadores de enzima-sustrato y la patente de EE. UU. n.º 4.275.149 proporciona una revisión de algunos de ellos. Los ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalacindionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa, tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares.

Los ejemplos de combinaciones enzima-sustrato incluyen, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (HRPO) con peroxidasa de hidrógeno como sustrato; fosfatasa alcalina (AP) con para-nitrofenilfosfato como sustrato cromógeno; y  $\beta$ -D-galactosidasa ( $\beta$ -D-Gal) con un sustrato cromógeno (por ejemplo, p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosidasa) o sustrato fluorógeno (por ejemplo, 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactosidasa). Para una revisión general de estos, véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 4.275.149 y 4.318.980.

Las muestras se pueden preparar, por ejemplo, manualmente, o usando un instrumento de tinción automatizado (por ejemplo, un instrumento BenchMark XT o Benchmark ULTRA de Ventana). Las muestras así preparadas se pueden montar y cubrir con cubreobjetos. A continuación, se determina la evaluación del portaobjetos, por ejemplo, usando un microscopio, y se pueden emplear criterios de intensidad de tinción, usados de forma rutinaria en la técnica. En un modo de realización, se ha de entender que, cuando se examinan células y/o tejido de un tumor usando IHQ, la tinción en general se determina o evalúa en la(s) célula(s) y/o tejido tumoral(es) (a diferencia del tejido estromal o circundante que puede estar presente en la muestra). En algunos modos de realización, se entiende que, cuando se examinan células y/o tejido de un tumor usando IHQ, la tinción incluye determinar o evaluar células inmunitarias infiltrantes de tumor, incluyendo células inmunitarias intratumorales o peritumorales. En algunos modos de realización, se detecta la presencia de un biomarcador por IHQ en  $>0\%$  de la muestra, en al menos un  $1\%$  de la muestra, en al menos un  $5\%$  de la muestra, en al menos un  $10\%$  de la muestra, en al menos un  $15\%$  de la muestra, en al menos un  $20\%$  de la muestra, en al menos un  $25\%$  de la muestra, en al menos un  $30\%$  de la muestra, en al menos un  $35\%$  de la muestra, en al menos un  $40\%$  de la muestra, en al menos un  $45\%$  de la muestra, en al menos un  $50\%$  de la muestra, en al menos un  $55\%$  de la muestra, en al menos un  $60\%$  de la muestra, en al menos un  $65\%$  de la muestra, en al menos un  $70\%$  de la muestra, en al menos un  $75\%$  de la muestra, en al menos un  $80\%$  de la muestra, en al menos un  $85\%$  de la muestra, en al menos un  $90\%$  de la muestra, en al menos un  $95\%$  de la muestra o más. Las muestras se pueden puntuar usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, por un anatomopatólogo o un análisis de imágenes automatizado.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos, el biomarcador se detecta por inmunohistoquímica usando un anticuerpo de diagnóstico (es decir, anticuerpo primario). En algunos modos de realización, el anticuerpo de diagnóstico se une específicamente a un antígeno humano. En algunos modos de realización, el anticuerpo de diagnóstico es un anticuerpo no humano. En algunos modos de realización, el anticuerpo de diagnóstico es un anticuerpo de rata, ratón o conejo. En algunos modos de realización, el anticuerpo de diagnóstico es un anticuerpo monoclonal. En algunos modos de realización, el anticuerpo de diagnóstico se marca directamente. En otros modos de realización, el anticuerpo de diagnóstico se marca indirectamente (por ejemplo, por un anticuerpo secundario).

En algunos modos de realización de cualquiera de los modos de realización precedentes, la muestra se obtiene del individuo antes de (por ejemplo, minutos, horas, días, semanas (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 semanas), meses o años antes de) la administración del tratamiento antineoplásico. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos precedentes, la muestra del individuo se obtiene de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 semanas (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 semanas) tras la administración del tratamiento antineoplásico. En algunos modos de realización, la muestra del individuo se obtiene de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 semanas tras la administración del tratamiento antineoplásico.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos precedentes, el nivel de expresión o número de un biomarcador se detecta en una muestra de tejido, una línea celular o células primarias o cultivadas, un sobrenadante celular, un lisado celular, plaquetas, suero, plasma, humor vítreo, líquido linfático, líquido sinovial,

líquido folicular, semen, líquido amniótico, leche, sangre completa, células derivadas de sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, saliva, esputo, lágrimas, sudor, moco, lisados tumorales y medio de cultivo tisular, extractos tisulares, tales como tejido homogeneizado, tejido tumoral, extractos celulares o cualquier combinación de los mismos. En algunos modos de realización, la muestra es una muestra de tejido (por ejemplo, una muestra de tejido tumoral), una muestra de células, una muestra de sangre completa, una muestra de plasma, una muestra de suero o una combinación de las mismas. En algunos modos de realización, la muestra de tejido tumoral en los que la muestra de tejido tumoral incluye células tumorales, células inmunitarias infiltrantes de tumor, células estromales o una combinación de las mismas. En algunos modos de realización, la muestra de tejido tumoral es una muestra fijada con formol e incluida en parafina (FFIP), una muestra de archivo, una muestra recién preparada o una muestra congelada.

Por ejemplo, en algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos precedentes, el nivel de expresión de un biomarcador se detecta en células inmunitarias infiltrantes de tumor, células tumorales, PBMC o combinaciones de las mismas usando técnicas conocidas (por ejemplo, citometría de flujo o IHQ). Las células inmunitarias infiltrantes de tumor incluyen, pero no se limitan a, células inmunitarias intratumorales, células inmunitarias peritumorales o cualquier combinación de las mismas y otras células de estroma tumorales (por ejemplo, fibroblastos). Dichas células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden ser linfocitos T (tales como linfocitos T CD8<sup>+</sup> (por ejemplo, linfocitos T efectorales (Tef) CD8<sup>+</sup>) y/o linfocitos T CD4<sup>+</sup> (por ejemplo, linfocitos Tef CD4<sup>+</sup>), linfocitos B u otras células de linaje de médula ósea, incluyendo granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos), monocitos, macrófagos, células dendríticas (por ejemplo, células dendríticas interdigitantes), histiocitos y linfocitos citolíticos naturales (NK). En algunos modos de realización, la tinción para un biomarcador se detecta como tinción de membrana, tinción citoplásmica o combinaciones de las mismas. En otros modos de realización, la ausencia de un biomarcador se detecta como ausente o sin tinción en la muestra, en relación con una muestra de referencia.

En modos de realización particulares de cualquiera de los procedimientos precedentes, el nivel de expresión de un biomarcador se evalúa en una muestra que contiene o se sospecha que contiene células cancerosas. La muestra puede ser, por ejemplo, una biopsia de tejido o una lesión metastásica obtenida de un paciente que padece, se sospecha que padece o se le ha diagnosticado cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga (por ejemplo, CU, por ejemplo, CUM), un cáncer de riñón (por ejemplo, CCR), un cáncer de pulmón (por ejemplo, CPNM), un cáncer de hígado, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas (por ejemplo, ACDP), un cáncer colorrectal o un cáncer de mama). En algunos modos de realización, la muestra es una muestra de tejido vesical, una biopsia de un tumor de vejiga, una lesión o corte de cáncer de vejiga metastásico conocido o sospechoso, o una muestra de sangre, por ejemplo, una muestra de sangre periférica, conocida o que se sospecha que comprende células cancerosas circulantes, por ejemplo, células cancerosas de vejiga. La muestra puede comprender tanto células cancerosas, es decir, células tumorales, como células no cancerosas (por ejemplo, linfocitos, tales como linfocitos T o linfocitos NK) y, en determinados modos de realización, comprende tanto células cancerosas como no cancerosas. Los procedimientos de obtención de muestras biológicas que incluyen resecciones de tejido, biopsias y líquidos corporales, por ejemplo, muestras de sangre que comprenden células cancerosas/tumorales, son bien conocidos en la técnica.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos precedentes, el paciente tiene carcinoma, linfoma, blastoma (incluyendo meduloblastoma y retinoblastoma), sarcoma (incluyendo liposarcoma y sarcoma de células sinoviales), tumores neuroendocrinos (incluyendo tumores carcinoides, gastrinoma e insulinooma), mesotelioma, schwannoma (incluyendo neurinoma del acústico), meningioma, adenocarcinoma, melanoma y leucemia o neoplasias malignas linfáticas. En algunos modos de realización, el cáncer es cáncer de vejiga (por ejemplo, CU, por ejemplo, CUM), cáncer de riñón (por ejemplo, carcinoma de células renales (CCR), por ejemplo, CCR avanzado o CCR metastásico (CCRM)), cáncer epidermoide (por ejemplo, cáncer epidermoide epitelial), cáncer de pulmón (incluyendo carcinoma de pulmón microcítico (CPM), carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM), adenocarcinoma de pulmón y carcinoma epidermoide de pulmón), cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas (por ejemplo, ACDP), glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado (por ejemplo, CHC), hepatoma, cáncer de mama (incluyendo cáncer de mama metastásico), cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer tiroideo, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, cáncer de células de Merkel, micosis fungoide, cáncer testicular, cáncer esofágico, tumores de vías biliares, cáncer de cabeza y cuello, linfoma de linfocitos B (incluyendo linfoma no hodgkiniano (LNH) de escasa malignidad/folicular; LNH linfocítico pequeño (LP); LNH de grado intermedio/folicular; LNH difuso de malignidad intermedia; LNH inmunoblástico de gran malignidad; LNH linfoblástico de gran malignidad; LNH de células no hendidas pequeñas de gran malignidad; LNH con gran masa tumoral; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con el SIDA; y macroglobulinemia de Waldenström); leucemia linfocítica crónica (LLC); leucemia linfocítica aguda (LLA); tricoleucemia; leucemia mielógena crónica; y trastorno linfoproliferativo postrasplante (TLPT), proliferación vascular anómala asociada con facomatosis, edema (tal como el asociado con tumores cerebrales) o síndrome de Meigs. En algunos modos de realización, el cáncer es un cáncer de vejiga (por ejemplo, CU, por ejemplo, CUM), un cáncer de riñón (por ejemplo, CCR), un cáncer de pulmón (por ejemplo, CPNM), un cáncer de hígado (por ejemplo, CHC), un cáncer de ovario o un cáncer de mama (por ejemplo, CMTN). En modos de realización preferentes, el paciente tiene un cáncer de vejiga (por ejemplo, CU, por ejemplo, CUM). Opcionalmente, el paciente puede tener una forma de cáncer

avanzada, resistente al tratamiento, recidivante, resistente a la quimioterapia y/o resistente al platino.

En determinados modos de realización, la presencia y/o niveles de expresión/cantidad de un biomarcador en una primera muestra se incrementan o se elevan en comparación con la presencia/ausencia y/o niveles de expresión/cantidad en una segunda muestra. En determinados modos de realización, la presencia/ausencia y/o niveles de expresión/cantidad de un biomarcador en una primera muestra disminuyen o se reducen en comparación con la presencia y/o niveles de expresión/cantidad en una segunda muestra. En determinados modos de realización, la segunda muestra es una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control.

En determinados modos de realización, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control es una única muestra o múltiples muestras combinadas del mismo paciente o individuo que se obtienen en uno o más puntos temporales diferentes a cuando se obtiene la muestra de prueba. Por ejemplo, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control se obtiene en un punto temporal anterior del mismo paciente o individuo a cuando se obtiene la muestra de prueba. Dicha muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control puede ser útil si la muestra de referencia se obtiene durante el diagnóstico inicial de cáncer y la muestra de prueba se obtiene más tarde cuando el cáncer se vuelve metastásico.

En determinados modos de realización, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control es una combinación de múltiples muestras de uno o más individuos sanos que no son el paciente. En determinados modos de realización, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control es una combinación de múltiples muestras de uno o más individuos con una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) que no son el paciente o individuo. En determinados modos de realización, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control son muestras de ARN agrupadas de tejidos normales o muestras de plasma o suero agrupadas de uno o más individuos que no son el paciente. En determinados modos de realización, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control son muestras de ARN agrupadas de tejidos tumorales o muestras de plasma o suero agrupadas de uno o más individuos con una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) que no son el paciente.

### III. Procedimientos y usos terapéuticos

En el presente documento se proporcionan procedimientos y usos para tratar a un individuo que tiene un cáncer (incluyendo, pero sin limitarse a, un cáncer de vejiga (por ejemplo, CU, por ejemplo, CUM), un cáncer de riñón (por ejemplo, CCR), un cáncer de pulmón (por ejemplo, CPNM), un cáncer de hígado, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas (por ejemplo, ACDP), un cáncer colorrectal o un cáncer de mama). En modos de realización particulares, el cáncer es un cáncer de vejiga, tal como CU, por ejemplo, CU metastásico. Cualquiera de las inmunoterapias (por ejemplo, antagonistas de unión al eje PD-L1 (por ejemplo, anticuerpos anti-PD-L1)), antagonistas estromales supresores (por ejemplo, antagonistas de TGF- $\beta$  (por ejemplo, anticuerpos anti-TGF- $\beta$ )) u otros agentes antineoplásicos descritos en el presente documento (por ejemplo, como se describe a continuación en la sección IV y/o los ejemplos) o conocidos en la técnica se pueden usar en los procedimientos y usos. El nivel de expresión o número de cualquiera de los biomarcadores descritos en el presente documento se puede determinar usando cualquier procedimiento conocido en la técnica y/o descrito en el presente documento, por ejemplo, en la sección II anterior y/o en los ejemplos de trabajo.

En algunos modos de realización, el tratamiento con una inmunoterapia (por ejemplo, un antagonista de unión al eje PD-L1, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab)) en combinación con un antagonista estromal supresor (por ejemplo, un antagonista de TGF- $\beta$ , por ejemplo, un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ ) preferentemente prolonga y/o mejora la supervivencia, incluyendo SSP y/o SG. En un modo de realización, el tratamiento con una inmunoterapia (por ejemplo, un antagonista de unión al eje PD-L1, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab)) en combinación con un antagonista estromal supresor (por ejemplo, un antagonista de TGF- $\beta$ , por ejemplo, un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ ) prolonga la supervivencia en al menos aproximadamente un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 % o más, en relación con la supervivencia lograda administrando un agente antitumoral aprobado, o el tratamiento de referencia, para el cáncer que se está tratando. En otro modo de realización, el tratamiento con una inmunoterapia (por ejemplo, un antagonista de unión al eje PD-L1, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab)) en combinación con un antagonista estromal supresor (por ejemplo, un antagonista de TGF- $\beta$ , por ejemplo, un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ ) mejora una tasa de respuesta (por ejemplo, una TRO, una tasa de RC o una tasa de RP) en al menos aproximadamente un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 % o más, en relación con la tasa de respuesta lograda administrando un agente antitumoral aprobado, o el tratamiento de referencia, para el cáncer que se está tratando.



## B. Firma de 6 genes ejemplar

De acuerdo con la invención, los procedimientos y usos en el presente documento implican determinar el nivel de expresión de 6 genes a partir de una firma de 6 genes que incluye ACTA2, ADAM19, COMP, CTGF, TGFB1 y TGFB2.

En cualquiera de los procedimientos precedentes que implican la firma de 6 genes, se ha determinado que el nivel de expresión de ACTA2, ADAM19, COMP, CTGF, TGFB1 y TGFB2 está en o por encima de un nivel de referencia de los genes. De acuerdo con la invención, se ha determinado que el nivel de expresión de los seis ACTA2, ADAM19, COMP, CTGF, TGFB1 y TGFB2 está en o por encima de un nivel de referencia.

En otro aspecto, en el presente documento se divulga un procedimiento para realizar un seguimiento de la respuesta de un individuo que tiene un cáncer al tratamiento con un tratamiento antineoplásico que incluye atezolizumab)) y un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ , incluyendo el procedimiento: (a) determinar el nivel de expresión de los siguientes genes en una muestra del individuo en un punto temporal durante o después de la administración de un tratamiento antineoplásico que comprende una inmunoterapia y un antagonista estromal supresor al individuo: ACTA2, ADAM19, COMP, CTGF, TGFB1 y TGFB2; y (b) comparar el nivel de expresión de los genes en la muestra del individuo con un nivel de expresión de referencia de los genes, realizando un seguimiento, de este modo, de la respuesta del individuo sometido a tratamiento con el tratamiento antineoplásico.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos precedentes que implican la firma de 6 genes, un nivel de expresión de referencia es el nivel de expresión de los 6 genes (ACTA2, ADAM19, COMP, CTGF, TGFB1 y TGFB2) en una población de referencia, por ejemplo, una población de individuos que tienen un cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga (por ejemplo, CU, por ejemplo, CUm), un cáncer de riñón, un cáncer de pulmón, un cáncer de hígado, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas, un cáncer colorrectal o un cáncer de mama). En modos de realización particulares, el cáncer es un cáncer de vejiga (por ejemplo, CU, por ejemplo, CUm). En determinados modos de realización, un nivel de expresión de referencia es la mediana del nivel de expresión del uno o más genes en una población de referencia, por ejemplo, una población de individuos que tienen un cáncer. En otros modos de realización, el nivel de expresión de referencia puede ser el 40 % superior, el 30 % superior, el 20 % superior, el 10 % superior, el 5 % superior o el 1 % superior del nivel de expresión en la población de referencia. En algunos modos de realización, el nivel de expresión de referencia se determina por el análisis de componentes principales de los niveles de expresión transformados con puntuación Z. En determinados modos de realización, el nivel de expresión de referencia es un nivel de expresión preasignado para el uno o más genes. En algunos modos de realización, el nivel de expresión de referencia es el nivel de expresión del uno o más genes en una muestra biológica obtenida del paciente en un punto temporal previo, en el que el punto temporal previo es tras la administración del tratamiento antineoplásico. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos precedentes, un nivel de expresión de referencia es el nivel de expresión de los genes ACTA2, ADAM19, COMP, CTGF, TGFB1 y TGFB2 en una muestra biológica del paciente obtenida antes de (por ejemplo, minutos, horas, días, semanas (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 semanas), meses o años antes de) la administración del tratamiento antineoplásico. En otros modos de realización, el nivel de expresión de referencia es el nivel de expresión de los genes en una muestra biológica obtenida del paciente en un punto temporal posterior (por ejemplo, minutos, horas, días, semanas, meses o años después de la administración de un tratamiento antineoplásico).

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos precedentes que implican la firma de 6 genes, un nivel de expresión por encima de un nivel de expresión de referencia, o una expresión o número elevado o incrementado, se refiere a un incremento global de aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor en el nivel o número de un biomarcador (por ejemplo, proteína, ácido nucleico (por ejemplo, gen o ARNm) o célula), detectado por procedimientos tales como los descritos en el presente documento y/o conocidos en la técnica, en comparación con un nivel de expresión de referencia, muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control. En determinadas divulgaciones, la expresión o número elevado se refiere al incremento en el nivel de expresión/cantidad de un biomarcador (por ejemplo, uno o más de ACTA2, ADAM19, COMP, CTGF, TGFB1 y/o TGFB2) en la muestra en las que el incremento es al menos aproximadamente cualquiera de 1,1x, 1,2x, 1,3x, 1,4x, 1,5x, 1,6x, 1,7x, 1,8x, 1,9x, 2x, 2,1x, 2,2x, 2,3x, 2,4x, 2,5x, 2,6x, 2,7x, 2,8x, 2,9x, 3x, 3,5x, 4x, 4,5x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 15x, 20x, 30x, 40x, 50x, 100x, 500x o 1000x el nivel de expresión/cantidad del biomarcador respectivo en un nivel de expresión de referencia, muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control. En algunas divulgaciones, la expresión o número elevado se refiere a un incremento global en el nivel de expresión/cantidad de un biomarcador (por ejemplo, ACTA2, ADAM19, COMP, CTGF, TGFB1 y/o TGFB2) de más de aproximadamente 1,1 veces, aproximadamente 1,2 veces, aproximadamente 1,3 veces, aproximadamente 1,4 veces, aproximadamente 1,5 veces, aproximadamente 1,6 veces, aproximadamente 1,7 veces, aproximadamente 1,8 veces, aproximadamente 1,9 veces, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 2,1 veces, aproximadamente 2,2 veces, aproximadamente 2,3 veces, aproximadamente 2,4 veces, aproximadamente 2,5 veces, aproximadamente 2,6 veces, aproximadamente 2,7 veces, aproximadamente 2,8 veces, aproximadamente 2,9 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 3,5 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 4,5



veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 6 veces, aproximadamente 7 veces, aproximadamente 8 veces, aproximadamente 9 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 15 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 30 veces, aproximadamente 40 veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 100 veces, aproximadamente 500 veces, aproximadamente 1000 veces o más en comparación con un nivel de expresión de referencia, muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control, tejido de control o control interno (por ejemplo, gen constitutivo).

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos precedentes que implican la firma de 6 genes, un tumor del individuo tiene un fenotipo con exclusión inmunitaria caracterizado por la localización de linfocitos T CD8+ en el compartimento estromal peritumoral. En algunos modos de realización, los linfocitos T CD8+ se localizan en o cerca de las fibras de colágeno.

#### D. Biomarcadores adicionales ejemplares (por ejemplo, genes de Tef y genes de FAC)

Cualquiera de los procedimientos precedentes (por ejemplo, como se describe en la sección III, subsecciones A-C anteriores, en relación con la firma de 6 genes) puede incluir además determinar el nivel de expresión en la muestra de uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9) genes adicionales seleccionados del grupo que consiste en PD-L1, CD8A, CXCL10, CXCL9, GZMA, GZMB, IFNG, PRF1 y TBX21. En algunos modos de realización, el uno o más genes adicionales es PD-L1. En otros modos de realización, el uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) genes adicionales se seleccionan del grupo que consiste en CD8A, CXCL10, CXCL9, GZMA, GZMB, IFNG, PRF1 y TBX21. En algunos modos de realización, el procedimiento incluye además determinar el nivel de expresión de al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete o los ocho de CD8A, CXCL10, CXCL9, GZMA, GZMB, IFNG, PRF1 y TBX21. En algunos modos de realización, el uno o más genes adicionales son CD8A, CXCL10, CXCL9, GZMA, GZMB, IFNG, PRF1 y TBX21.

En otro aspecto, en el presente documento se divulga un procedimiento para evaluar una respuesta de un individuo que tiene un cáncer al tratamiento con un tratamiento antineoplásico que incluye una inmunoterapia (por ejemplo, un antagonista de unión al eje PD-L1, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab)) y un antagonista estromal supresor (por ejemplo, un antagonista de TGF- $\beta$ , por ejemplo, un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ ), incluyendo el procedimiento: (a) determinar el nivel de expresión de uno o más genes de Tef (por ejemplo, 1, 2 o 3 genes de Tef seleccionados de IFNG, GZMB y ZAP70) y/o uno o más genes de FAC (por ejemplo, 1, 2 o 3 genes de FAC seleccionados de LOXL2, TNC y POSTN) en una muestra del individuo en un punto temporal durante o después de la administración de un tratamiento antineoplásico que comprende una inmunoterapia y un antagonista estromal supresor al individuo; y (b) mantener, ajustar o detener el tratamiento en base a una comparación del nivel de expresión del uno o más genes de Tef y/o el uno o más genes de FAC en la muestra con un nivel de expresión de referencia del uno o más genes de Tef y/o el uno o más genes de FAC, en el que un cambio en el nivel de expresión del uno o más genes de Tef y/o el uno o más genes de FAC en la muestra del individuo en comparación con el nivel de expresión de referencia del uno o más genes de Tef y/o el uno o más genes de FAC es indicativo de una respuesta al tratamiento con el tratamiento antineoplásico. En algunos modos de realización, el cambio es un incremento en el nivel de expresión de uno o más genes de Tef (por ejemplo, IFNG, GZMB y/o ZAP70). En algunos modos de realización, el cambio es una disminución en el nivel de expresión de uno o más genes de FAC (por ejemplo, LOXL2, TNC y POSTN).

En otro aspecto, en el presente documento se divulga un procedimiento para realizar un seguimiento de la respuesta de un individuo que tiene un cáncer al tratamiento con un tratamiento antineoplásico que incluye una inmunoterapia (por ejemplo, un antagonista de unión al eje PD-L1, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab)) y un antagonista estromal supresor (por ejemplo, un antagonista de TGF- $\beta$ , por ejemplo, un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ ), incluyendo el procedimiento: (a) determinar el nivel de expresión de uno o más genes de Tef (por ejemplo, 1, 2 o 3 genes de Tef seleccionados de IFNG, GZMB y ZAP70) y/o uno o más genes de FAC (por ejemplo, 1, 2 o 3 genes de FAC seleccionados de LOXL2, TNC y POSTN) en una muestra del individuo en un punto temporal durante o después de la administración de un tratamiento antineoplásico que comprende una inmunoterapia y un antagonista estromal supresor al individuo; y (b) comparar el nivel de expresión del uno o más genes de Tef y/o el uno o más genes de FAC en la muestra del individuo con un nivel de expresión de referencia del uno o más genes de Tef y/o el uno o más genes de FAC, realizando un seguimiento, de este modo, de la respuesta del individuo sometido a tratamiento con el tratamiento antineoplásico.

#### E. Carga mutacional del tumor (CMT)

Cualquiera de los modos de realización precedentes (por ejemplo, como se describe en la sección III, subsecciones A-C anteriores, en relación con la firma de 6 genes o en la sección III, subsección D) puede incluir determinar una CMT en una muestra de tumor del individuo. La CMT se puede determinar usando cualquier enfoque adecuado, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 1 o en la solicitud de patente internacional n.º: PCT/US2017/055669. En algunos modos de realización, el individuo puede tener una CMT en una muestra de tumor que está en o por encima de una CMT de referencia. En otros modos de realización, el individuo puede tener una CMT que está por debajo de una CMT de referencia.

## F. Enfoques ejemplares para la determinación de niveles de expresión de biomarcadores

En algunos modos de realización de cualquiera de los modos de realización precedentes (por ejemplo, como se describe en la sección III, subsecciones A-C anteriores, en relación con las firmas de 6 genes, respectivamente, o en la sección III, subsecciones D y E), la muestra se obtiene del individuo antes de (por ejemplo, minutos, horas, días, semanas (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 semanas), meses o años antes de) la administración del tratamiento antineoplásico. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos precedentes, la muestra del individuo se obtiene de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 semanas (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 semanas) tras la administración del tratamiento antineoplásico. En algunos modos de realización, la muestra del individuo se obtiene de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 semanas tras la administración del tratamiento antineoplásico.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos precedentes, el nivel de expresión o número de un biomarcador se detecta en una muestra de tejido, una línea celular o células primarias o cultivadas, o sobrenadante celular, un lisado celular, plaquetas, suero, plasma, humor vítreo, líquido linfático, líquido sinovial, líquido folicular, semen, líquido amniótico, leche, sangre completa, células derivadas de sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, saliva, esputo, lágrimas, sudor, moco, lisados tumorales y medio de cultivo tisular, extractos tisulares, tales como tejido homogeneizado, tejido tumoral, extractos celulares o cualquier combinación de los mismos. En algunos modos de realización, la muestra es una muestra de tejido (por ejemplo, una muestra de tejido tumoral), una muestra de células, una muestra de sangre completa, una muestra de plasma, una muestra de suero o una combinación de las mismas. En algunos modos de realización, la muestra de tejido tumoral es la que la muestra de tejido tumoral incluye células tumorales, células inmunitarias infiltrantes de tumor, células estromales o una combinación de las mismas. En algunos modos de realización, la muestra de tejido tumoral es una muestra FFIP, una muestra de archivo, una muestra recién preparada o una muestra congelada.

Por ejemplo, en algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos precedentes, el nivel de expresión de un biomarcador se detecta en células inmunitarias infiltrantes de tumor, células tumorales, PBMC o combinaciones de las mismas usando técnicas conocidas (por ejemplo, citometría de flujo o IHQ). Las células inmunitarias infiltrantes de tumor incluyen, pero no se limitan a, células inmunitarias intratumorales, células inmunitarias peritumorales o cualquier combinación de las mismas y otras células de estroma tumorales (por ejemplo, fibroblastos). Dichas células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden ser linfocitos T (tales como linfocitos T CD8<sup>+</sup> (por ejemplo, linfocitos Tef CD8<sup>+</sup>) y/o linfocitos T CD4<sup>+</sup> (por ejemplo, linfocitos Tef CD4<sup>+</sup>), linfocitos B u otras células de linaje de médula ósea, incluyendo granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos), monocitos, macrófagos, células dendríticas (por ejemplo, células dendríticas interdigitantes), histiocitos y linfocitos citolíticos naturales (NK). En algunos modos de realización, la tinción para un biomarcador se detecta como tinción de membrana, tinción citoplásmica o combinaciones de las mismas. En otros modos de realización, la ausencia de un biomarcador se detecta como ausente o sin tinción en la muestra, en relación con una muestra de referencia.

En modos de realización particulares de cualquiera de los procedimientos precedentes, el nivel de expresión de un biomarcador se evalúa en una muestra que contiene o se sospecha que contiene células cancerosas. La muestra puede ser, por ejemplo, una biopsia de tejido o una lesión metastásica obtenida de un paciente que padece, se sospecha que padece o se le ha diagnosticado cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga (por ejemplo, CU, por ejemplo, CUM)). En algunos modos de realización, la muestra es una muestra de tejido vesical, una biopsia de un tumor de vejiga, una lesión o corte de cáncer de vejiga metastásico conocido o sospechoso, o una muestra de sangre, por ejemplo, una muestra de sangre periférica, conocida o que se sospecha que comprende células cancerosas circulantes, por ejemplo, células cancerosas de vejiga. La muestra puede comprender tanto células cancerosas, es decir, células tumorales, como células no cancerosas (por ejemplo, linfocitos, tales como linfocitos T o linfocitos NK) y, en determinados modos de realización, comprende tanto células cancerosas como no cancerosas. Los procedimientos de obtención de muestras biológicas que incluyen resecciones de tejido, biopsias y líquidos corporales, por ejemplo, muestras de sangre que comprenden células cancerosas/tumorales, son bien conocidos en la técnica.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos precedentes, el paciente tiene carcinoma, linfoma, blastoma (incluyendo meduloblastoma y retinoblastoma), sarcoma (incluyendo liposarcoma y sarcoma de células sinoviales), tumores neuroendocrinos (incluyendo tumores carcinoides, gastrinoma e insulinoma), mesotelioma, schwannoma (incluyendo neurinoma del acústico), meningioma, adenocarcinoma, melanoma y leucemia o neoplasias malignas linfáticas. En algunos modos de realización, el cáncer es cáncer de vejiga (por ejemplo, CU, por ejemplo, CUM), cáncer de riñón (por ejemplo, carcinoma de células renales (CCR), por ejemplo, CCR avanzado o CCR metastásico (CCRm)), cáncer epidermoide (por ejemplo, cáncer epidermoide epitelial), cáncer de pulmón (incluyendo carcinoma de pulmón microcítico (CPM), carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM), adenocarcinoma de pulmón y carcinoma epidermoide de pulmón), cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas (por ejemplo, ACDP), glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado (por ejemplo, CHC), hepatoma, cáncer de mama (incluyendo cáncer de mama metastásico), cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer tiroideo, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, cáncer de células de Merkel,

micosis fungoide, cáncer testicular, cáncer esofágico, tumores de vías biliares, cáncer de cabeza y cuello, linfoma de linfocitos B (incluyendo linfoma no hodgkiniano (LNH) de escasa malignidad/folicular; LNH linfocítico pequeño (LP); LNH de grado intermedio/folicular; LNH difuso de malignidad intermedia; LNH inmunoblástico de gran malignidad; LNH linfoblástico de gran malignidad; LNH de células no hendidas pequeñas de gran malignidad; LNH con gran masa tumoral; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con el SIDA; y macroglobulinemia de Waldenström); leucemia linfocítica crónica (LLC); leucemia linfocítica aguda (LLA); tricoleucemia; leucemia mielógena crónica; y trastorno linfoproliferativo postrasplante (TLPT), proliferación vascular anómala asociada con facomatosis, edema (tal como el asociado con tumores cerebrales) o síndrome de Meigs. En algunos modos de realización, el cáncer es un cáncer de vejiga (por ejemplo, CU, por ejemplo, CUM), un cáncer de riñón (por ejemplo, CCR), un cáncer de pulmón (por ejemplo, CPNM), un cáncer de hígado (por ejemplo, CHC), un cáncer de ovario o un cáncer de mama (por ejemplo, CMTN). En modos de realización preferentes, el paciente tiene un cáncer de vejiga (por ejemplo, CU, por ejemplo, CUM). Opcionalmente, el paciente puede tener una forma de cáncer avanzada, resistente al tratamiento, recidivante, resistente a la quimioterapia y/o resistente al platino.

En determinados modos de realización, la presencia y/o niveles de expresión/cantidad de un biomarcador en una primera muestra se incrementan o se elevan en comparación con la presencia/ausencia y/o niveles de expresión/cantidad en una segunda muestra. En determinados modos de realización, la presencia/ausencia y/o niveles de expresión/cantidad de un biomarcador en una primera muestra disminuyen o se reducen en comparación con la presencia y/o niveles de expresión/cantidad en una segunda muestra. En determinados modos de realización, la segunda muestra es una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control.

En determinados modos de realización, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control es una única muestra o múltiples muestras combinadas del mismo paciente o individuo que se obtienen en uno o más puntos temporales diferentes a cuando se obtiene la muestra de prueba.

Por ejemplo, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control se obtiene en un punto temporal anterior del mismo paciente o individuo a cuando se obtiene la muestra de prueba. Dicha muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control puede ser útil si la muestra de referencia se obtiene durante el diagnóstico inicial de cáncer y la muestra de prueba se obtiene más tarde cuando el cáncer se vuelve metastásico.

En determinados modos de realización, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control es una combinación de múltiples muestras de uno o más individuos sanos que no son el paciente. En determinados modos de realización, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control es una combinación de múltiples muestras de uno o más individuos con una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) que no son el paciente o individuo. En determinados modos de realización, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control son muestras de ARN agrupadas de tejidos normales o muestras de plasma o suero agrupadas de uno o más individuos que no son el paciente. En determinados modos de realización, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control son muestras de ARN agrupadas de tejidos tumorales o muestras de plasma o suero agrupadas de uno o más individuos con una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) que no son el paciente.

#### IV. Composiciones y formulaciones farmacéuticas

En un aspecto, la invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la firma de 6 genes de la invención se puede usar para identificar individuos que tienen un cáncer (incluyendo, pero sin limitarse a, un cáncer de vejiga (por ejemplo, CU, por ejemplo, CUM), un cáncer de riñón (por ejemplo, CCR), un cáncer de pulmón (por ejemplo, CPNM), un cáncer de hígado, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas (por ejemplo, ACDP), un cáncer colorrectal o un cáncer de mama) que se pueden beneficiar de tratamientos antineoplásicos que incluyen atezolizumab y un anticuerpo de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecífico. En otro aspecto, la invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la firma de 6 genes de la invención se puede usar para realizar un seguimiento de y/o evaluar la respuesta al tratamiento para individuos que tienen un cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga (por ejemplo, CU, por ejemplo, CUM), un cáncer de riñón (por ejemplo, CCR), un cáncer de pulmón (por ejemplo, CPNM), un cáncer de hígado, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas (por ejemplo, ACDP), un cáncer colorrectal o un cáncer de mama) que se tratan con tratamientos antineoplásicos que incluyen atezolizumab y un anticuerpo de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecífico. Estos agentes, y combinaciones de los mismos, son útiles para el tratamiento del cáncer, por ejemplo, como parte de cualquiera de los procedimientos y usos descritos en el presente documento, por ejemplo, en las secciones II y III anteriores. Se puede usar cualquier inmunoterapia y/o antagonista estromal supresor adecuado en los procedimientos y usos descritos en el presente documento.

## A. Inmunoterapias ejemplares

Las inmunoterapias se describen en la técnica (véase, por ejemplo, Chen et al. Immunity 39:1-10, 2013). La inmunoterapia puede ser una inmunoterapia activadora o una inmunoterapia supresora. En algunas divulgaciones, la inmunoterapia activadora incluye un agonista de CD28, 0X40, GITR, CD137, CD27, ICOS, HVEM, NKG2D, MICA, 2B4, IL-2, IL-12, IFN $\gamma$ , IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$ , IL-1, CDN, HMBG1 o TLR. En divulgaciones particulares, el agonista (por ejemplo, un agonista de CD28, 0X40, GITR, CD137, CD27, ICOS, HVEM, NKG2D, MICA, 2B4, IL-2, IL-12, IFN $\gamma$ , IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$ , IL-1, CDN, HMBG1 o TLR) incrementa, potencia o estimula una respuesta o función inmunitaria en un paciente que tiene cáncer. En algunas divulgaciones, el agonista modula la expresión y/o actividad de un ligando (por ejemplo, un ligando del receptor de linfocitos T), y/o incrementa o estimula la interacción del ligando con su receptor inmunitario, y/o incrementa o estimula la señalización intracelular mediada por la unión del ligando al receptor inmunitario. En otras divulgaciones, la inmunoterapia supresora incluye un antagonista del eje PD-L1, CTLA-4, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3, B7H4, CD96, TIGIT, CD226, prostaglandina, VEGF, endotelina B,IDO, arginasa, MICA/MICB, TIM-3, IL-10, IL-4 o IL-13. En modos de realización particulares, el antagonista (por ejemplo, un antagonista del eje PD-L1, CTLA-4, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3, B7H4, CD96, TIGIT, CD226, prostaglandina, VEGF, endotelina B,IDO, arginasa, MICA/MICB, TIM-3, IL-10, IL-4 o IL-13) es un agente que inhibe y/o bloquea la interacción de un ligando (por ejemplo, un ligando del receptor de linfocitos T) con su receptor inmunitario o es un antagonista de la expresión y/o actividad del ligando y/o del receptor, o es un agente que bloquea la señalización intracelular mediada por un ligando (por ejemplo, un ligando del receptor de linfocitos T) con su receptor inmunitario. En algunas divulgaciones, la inmunoterapia es un inhibidor del punto de control inmunitario. Los anticuerpos de inmunoterapia pueden tener cualquiera de los rasgos característicos, individualmente o en combinación, descritos en las secciones i-vii de la subsección D a continuación.

## B. Antagonistas de unión al eje PD-L1 ejemplares

Los antagonistas de unión al eje de PD-L1 incluyen antagonistas de unión a PD-1, antagonista de unión a PD-L1 y antagonistas de unión a PD-L2. PD-1 (muerte programada 1) también se denomina en la técnica "muerte celular programada 1", "PDCD1", "CD279" y "SLEB2". Un PD-1 humano ejemplar se muestra en el n.º de acceso UniProtKB/Swiss-Prot Q15116. PD-L1 (ligando de muerte programada 1) también se denomina en la técnica "ligando 1 de muerte celular programada 1", "PDCD1LG1", "CD274", "B7-H" y "PDL1". Un PD-L1 humano ejemplar se muestra en el n.º de acceso UniProtKB/Swiss-Prot Q9NZQ7.1. PD-L2 (ligando de muerte programada 2) también se denomina en la técnica "ligando 2 de muerte celular programada 1", "PDCD1LG2", "CD273", "B7-DC", "Btdc" y "PDL2". Un PD-L2 humano ejemplar se muestra en el n.º de acceso UniProtKB/Swiss-Prot Q9BQ51. En algunos modos de realización, PD-1, PD-L1 y PD-L2 son PD-1, PD-L1 y PD-L2 humanos. El antagonista de unión al eje PD-L1 puede ser, en algunos casos, un antagonista de unión a PD-1, un antagonista de unión a PD-L1 o un antagonista de unión a PD-L2. Se contempla expresamente que dichos anticuerpos antagonistas de unión al eje PD-L1 (por ejemplo, anticuerpos anti-PD-L1, anticuerpos anti-PD-1 y anticuerpos anti-PD-L2) u otros anticuerpos descritos en el presente documento (por ejemplo, anticuerpos anti-PD-L1 para la detección de los niveles de expresión de PD-L1) para su uso en cualquiera de los modos de realización enumerados en el presente documento puedan tener cualquiera de los rasgos característicos, individualmente o en combinación, descritos en las secciones i-vii de la subsección D a continuación.

## (i) Antagonistas de unión a PD-L1

En algunos casos, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a uno o más de sus compañeros de unión a ligando. En otros casos, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1. Aún en otros casos, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a B7-1. En algunos casos, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 tanto a PD-1 como a B7-1. El antagonista de unión a PD-L1 puede ser, sin limitación, un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno del mismo, una inmunoadhesina, una proteína de fusión, un oligopéptido o una molécula pequeña. En algunos modos de realización, el antagonista de unión a PD-L1 es una molécula pequeña que inhibe PD-L1. En algunos modos de realización, el antagonista de unión a PD-L1 es una molécula pequeña que inhibe PD-L1 y VISTA. En algunos modos de realización, el antagonista de unión a PD-L1 es CA-170 (también conocido como AUPM-170). En algunos modos de realización, el antagonista de unión a PD-L1 es una molécula pequeña que inhibe PDL1 y TIM3. En algunos modos de realización, la molécula pequeña es un compuesto descrito en los documentos WO2015/033301 y WO2015/033299.

En algunos modos de realización, el antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1. En el presente documento se contemplan y describen una variedad de anticuerpos anti-PD-L1. En cualquiera de los modos de realización en el presente documento, el anticuerpo anti-PD-L1 aislado se puede unir a un PD-L1 humano, por ejemplo, un PD-L1 humano como se muestra en el n.º de acceso UniProtKB/Swiss-Prot Q9NZQ7.1, o una variante del mismo. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 puede inhibir la unión entre PD-L1 y PD-1 y/o entre PD-L1 y B7-1. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal. En un modo de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en fragmentos Fab, Fab'-SH, Fv, scFv y (Fab')<sub>2</sub>. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo quimérico o humanizado. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo humano. Los ejemplos de anticuerpos anti-PD-L1 útiles en los procedimientos de la presente

invención y los procedimientos de su preparación se describen en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2010/077634 y la patente de EE. UU. n.º 8.217.149.

El anticuerpo anti-PD-L1 de acuerdo con la invención es atezolizumab (número de registro CAS: 1422185-06-5). Atezolizumab (Genentech), también conocido como MPDL3280A, es un anticuerpo anti-PD-L1.

Atezolizumab comprende:

(a) una secuencia de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 de GFTFSDSWIH (SEQ ID NO: 63), AWISPYGGSTYYADSVKGF (SEQ ID NO: 64) y RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 65), respectivamente, y

(b) una secuencia de HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 de RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 66), SASFLYS (SEQ ID NO: 67) y QQYLYHPAT (SEQ ID NO: 68), respectivamente.

Atezolizumab comprende una secuencia de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que:

(a) la secuencia de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 69), y

(b) la secuencia de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 70).

Atezolizumab comprende una secuencia de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que:

(a) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRF  
TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS  
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPK  
SNTKVDKKVEPKSCDKTHCTCPPELLEGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKKVSNAKALPAIEKTIKAKGQPRE  
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS  
RWQQGNVPSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 71), y

(b) la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD  
FTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYP  
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFN  
RGEC (SEQ ID NO: 72).

#### C. Antagonistas estromales supresores ejemplares

El antagonista estromal supresor es un antagonista de TGF-β.

El antagonista de TGF-β es un anticuerpo anti-TGF-β. El anticuerpo anti-TGF-β de acuerdo con la invención es un anticuerpo anti-TGF-β panespecífico. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-TGF-β puede ser cualquier anticuerpo anti-TGF-β divulgado, por ejemplo, en la pat. de EE. UU. n.º 5.571.714 o en las solicitudes de patente internacionales n.ºs WO 92/00330, WO 92/08480, WO 95/26203, WO 97/13844, WO 00/066631, WO 05/097832, WO 06/086469, WO 05/010049, WO 06/116002, WO 07/076391, WO 12/167143, WO 13/134365, WO 14/164709 o WO 16/201282. En modos de realización particulares, el anticuerpo anti-TGF-β es 1D11 o un derivado del mismo. Se contempla expresamente que dichos anticuerpos antagonistas estromales supresores (por ejemplo, anticuerpos anti-TGF-β) para su uso en cualquiera de los modos de realización enumerados en el presente documento pueden tener cualquiera de los rasgos característicos, individualmente o en combinación, descritos en las secciones i-vii de la subsección D a continuación.

Sin quedar ligado a ninguna teoría, el antagonista estromal supresor modula el estroma en el tejido diana para facilitar la infiltración de células inmunitarias en el tejido diana. Por ejemplo, el tratamiento de un tumor fibrótico que expresa un biomarcador descrito en el presente documento con un antagonista estromal supresor modula el

estroma en y alrededor del tumor para permitir la infiltración de células inmunitarias (por ejemplo, moduladas por la inmunoterapia) en el tumor. En algunos modos de realización, la infiltración de células inmunitarias incrementada es una infiltración incrementada de uno o más linfocitos T, linfocitos B, macrófagos o células dendríticas. En algunos modos de realización, los linfocitos T son linfocitos T CD8+ y/o linfocitos Tef. En algunos modos de realización, el individuo es resistente a la inmunoterapia antes del tratamiento con el antagonista estromal supresor. En algunos modos de realización, ya se ha administrado al individuo inmunoterapia en monoterapia.

#### D. Anticuerpos

##### ii. Fragmentos de anticuerpo

En determinados modos de realización, un anticuerpo de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecífico proporcionado en el presente documento es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, Fv y scFv, y otros fragmentos descritos a continuación. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson et al. (Nat. Med. 9:129-134, 2003). Para una revisión de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. (Springer-Verlag, Nueva York), pp. 269-315 (1994). Véase también el documento WO 93/16185 y las patentes de EE. UU. n.ºs 5.571.894 y 5.587.458. Para un análisis de los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> que comprenden residuos de epítipo de unión al receptor de rescate y que tienen una semivida in vivo incrementada, véase la patente de EE. UU. n.º 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véanse, por ejemplo, los documentos EP 404.097, WO 1993/01161, Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134, 2003 y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448, 1993. También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson et al. (Nat. Med. 9:129-134, 2003).

Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpo que comprenden todo o una porción del dominio variable de la cadena pesada o todo o una porción del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En determinados modos de realización, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.248.516 B1).

Se pueden preparar fragmentos de anticuerpo por diversas técnicas, incluyendo, pero sin limitarse a digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción por células huésped recombinantes (por ejemplo, E. coli o fago), de acuerdo con procedimientos conocidos.

##### iii. Anticuerpos quiméricos y humanizados

En determinados modos de realización, un anticuerpo de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecífico proporcionado en el presente documento es un anticuerpo quimérico. Se describen determinados anticuerpos quiméricos, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 4.816.567; y Morrison et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855, 1984). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En otro ejemplo, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo de "clase cambiada" en el que se ha cambiado la clase o subclase de la del anticuerpo original. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

En determinados modos de realización, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad en seres humanos, mientras se conservan la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano original. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR, (o porciones de las mismas) se derivan de un anticuerpo no humano y las FR (o porciones de las mismas) se derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante humana. En algunos modos de realización, se sustituyen algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado con los residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que se derivan los residuos de HVR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los procedimientos de su preparación se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson (Front. Biosci. 13:1619-1633, 2008), y se describen además, por ejemplo, en Riechmann et al. (Nature 332:323-329, 1988); Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033, 1989); patentes de EE. UU. n.ºs 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Kashmiri et al. (Methods 36:25-34, 2005) (que describe el injerto de región determinante de la especificidad (SDR)); Padlan (Mol. Immunol. 28:489-498, 1991) (que describe el "rebarnizado"); Dall'Acqua et al. (Methods 36:43-60, 2005) (que describe el "reordenamiento de FR"); Osbourn et al. (Methods 36:61-68, 2005) y Klimka et al. (Br. J. Cancer, 83:252-260, 2000) (que describe el enfoque de "selección guiada" para el reordenamiento de FR).

Las regiones estructurales humanas que se pueden usar para la humanización incluyen, pero no se limitan a: regiones estructurales seleccionadas usando el procedimiento de "mejor ajuste" (véase, por ejemplo, Sims et al. J. Immunol. 151:2296, 1993); regiones estructurales derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de la cadena ligera o pesada (véase, por ejemplo, Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285, 1992; y Presta et al. J. Immunol., 151:2623, 1993); regiones estructurales maduras humanas (mutadas somáticamente) o regiones estructurales de estirpe germinal humana (véase, por ejemplo, Almagro y Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633, 2008); y regiones estructurales derivadas del cribado de colecciones de FR (véase, por ejemplo, Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684, 1997; y Rosok et al. J. Biol. Chem. 271:22611-22618, 1996).

#### iv. Anticuerpos humanos

En determinados modos de realización, un anticuerpo de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecífico proporcionado en el presente documento es un anticuerpo humano. Se pueden producir anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Se describen anticuerpos humanos en general en van Dijk y van de Winkel (Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74, 2001) y Lonberg (Curr. Opin. Immunol. 20:450-459, 2008).

Se pueden preparar anticuerpos humanos administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a una exposición antigénica. Dichos animales típicamente contienen todos o una porción de los locus de inmunoglobulina humana, que reemplazan los locus de inmunoglobulina endógena, o que están presentes de forma extracromosómica o integrados aleatoriamente en los cromosomas del animal. En dichos ratones transgénicos se han inactivado, en general, los locus de inmunoglobulina endógena. Para una revisión de los procedimientos para obtener anticuerpos humanos a partir de animales transgénicos, véase Lonberg (Nat. Biotech. 23:1117-1125, 2005). Véanse también, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 6.075.181 y 6.150.584, que describen la tecnología XENOMOUSE™; la patente de EE. UU. n.º 5.770.429, que describe la tecnología HUMAB®; la patente de EE. UU. n.º 7.041.870, que describe la tecnología K-M MOUSE® y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®). Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por dichos animales se pueden modificar además, por ejemplo, por combinación con una región constante humana diferente.

También se pueden preparar anticuerpos humanos por procedimientos basados en hibridoma. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. Véase, por ejemplo, Kozbor (J. Immunol., 133:3001, 1984); Brodeur et al. (Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner et al. (J. Immunol., 147:86, 1991). Los anticuerpos humanos generados por medio de la tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos también se describen en Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006). Los procedimientos adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales a partir de líneas celulares de hibridoma) y Ni (Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268, 2006) (que describe hibridomas humano-humano). La tecnología de hibridoma humano (tecnología de trioma) también se describe en Vollmers y Brandlein, (Histology and Histopathology, 20(3):927-937, 2005) y Vollmers y Brandlein, (Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91, 2005).

También se pueden generar anticuerpos humanos aislando secuencias de dominio variable del clon Fv seleccionadas de colecciones de presentación en fagos derivadas de humano. A continuación, se pueden combinar dichas secuencias de dominio variable con un dominio constante humano deseado. Las técnicas para seleccionar anticuerpos humanos de colecciones de anticuerpos se describen a continuación.

#### v. Anticuerpos derivados de colecciones

Se puede aislar un anticuerpo de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecífico cribando colecciones combinatorias para detectar los anticuerpos con la actividad o las actividades deseadas. Por ejemplo, son conocidos en la técnica una variedad de procedimientos para generar colecciones de presentación en fagos y cribar dichas colecciones para detectar los anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Dichos procedimientos se revisan, por ejemplo, en Hoogenboom et al. (Methods in Molecular Biology 178:1-37, O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen además, por ejemplo, en McCafferty et al. (Nature 348:552-554, 1990); Clackson et al. (Nature 352: 624-628, 1991); Marks et al. (J. Mol. Biol. 222: 581-597, 1992); Marks y Bradbury (Methods in Molecular Biology 248:161-175, Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); 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).

En determinados procedimientos de presentación en fagos, los repertorios de genes de VH y VL se clonan por separado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en colecciones de fagos que, a continuación, se pueden cribar para detectar el fago de unión a antígeno como se describe en Winter et al. (Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455, 1994). Típicamente, los fagos presentan fragmentos de anticuerpo, como

fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o bien como fragmentos Fab. Las colecciones de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad con respecto al inmunógeno sin el requisito de construir hibridomas. De forma alternativa, se puede clonar el repertorio indiferenciado (por ejemplo, de un ser humano) para proporcionar una única fuente de anticuerpos para una amplia gama de antígenos no propios y propios sin ninguna inmunización como se describe por Griffiths et al. (EMBO J, 12: 725-734, 1993). Finalmente, también se pueden preparar sintéticamente colecciones indiferenciadas clonando segmentos de genes V no reordenados a partir de células madre y usando cebadores de PCR que contienen secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para lograr el reordenamiento in vitro, como se describe por Hoogenboom y Winter, (J. Mol. Biol., 227: 381-388, 1992). Las publicaciones de patente que describen colecciones de fagos con anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: la patente de EE. UU. n.º 5.750.373 y las publicaciones de patente de EE. UU. n.ºs 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo aislados de colecciones de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpo humano en el presente documento.

#### vi. Anticuerpos multiespecíficos

En uno cualquiera de los aspectos anteriores, un anticuerpo de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecífico proporcionado en el presente documento es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. En determinados modos de realización, una de las especificidades de unión es por TGF- $\beta$  y la otra es por cualquier otro antígeno. En determinados modos de realización, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítopos diferentes de TGF- $\beta$ . También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan TGF- $\beta$ . Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

Las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tienen especificidades diferentes (véase Milstein y Cuello, Nature 305: 537, 1983), el documento WO 93/08829 y Traunecker et al., EMBO J. 10: 3655, 1991) y genomanipulación por "botón en ojal" (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.731.168). También se pueden preparar anticuerpos multiespecíficos genomanipulando los efectos de conducción electrostática para preparar moléculas heterodiméricas con Fc de anticuerpo (véase, por ejemplo, el documento WO 2009/089004A1); reticulando dos o más anticuerpos o fragmentos (véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.676.980 y Brennan et al., Science, 229: 81, 1985); usando cremalleras de leucinas para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny et al., J. Immunol., 148(5): 1547-1553, 1992); usando la tecnología de "diacuerpos" para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico (véase, por ejemplo, Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448, 1993); y usando dímeros de Fv monocatenarios (sFv) (véase, por ejemplo, Gruber et al., J. Immunol., 152:5368, 1994); y preparando anticuerpos trispecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt et al. J. Immunol. 147: 60, 1991).

En el presente documento también se incluyen anticuerpos genomanipulados con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluyendo los "anticuerpos pulpo" (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576A1).

El anticuerpo o fragmento en el presente documento incluye un "FAB de doble acción" o "DAF" que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a PD-L1 y a otro antígeno diferente. El anticuerpo o fragmento en el presente documento también incluye un DAF que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a VEGF y a otro antígeno diferente.

#### vii. Variantes de anticuerpo

En determinados modos de realización, se contemplan variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecíficos. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se pueden preparar variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o por síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede preparar cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno.

##### a. Variantes de sustitución, inserción y deleción

En determinados modos de realización se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una o más sustituciones aminoacídicas. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las HVR y las FR. Se muestran sustituciones conservadoras en la tabla 6 bajo el encabezado "sustituciones preferentes". Se



proporcionan cambios más sustanciales en la tabla 6 bajo el encabezado "sustituciones ejemplares" y como se describe además a continuación en referencia a las clases de cadena lateral aminoacídica. Se pueden introducir sustituciones aminoacídicas en un anticuerpo de interés y cribar los productos para detectar una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno conservada/mejorada, inmunogenicidad disminuida, o ADCC o CDC mejorada.

**Tabla 6: sustituciones aminoacídicas ejemplares y preferentes**

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
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)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Trp(W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucina	Leu

10 Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con propiedades de cadena lateral comunes:

(1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras conllevarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo original (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para su estudio adicional tendrá(n) modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad incrementada y/o inmunogenicidad reducida) en relación con el anticuerpo original y/o habrá(n) conservado sustancialmente determinadas propiedades biológicas del anticuerpo original. Una variante de sustitución ejemplar es un anticuerpo madurado en afinidad, que se puede generar de

forma práctica, por ejemplo, usando técnicas de maduración de la afinidad basadas en presentación en fagos, tales como las descritas en el presente documento. En resumen, se mutan uno o más residuos de HVR y los anticuerpos variantes se presentan en fagos y se criban para detectar una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión).

Se pueden preparar alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en las HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Dichas alteraciones se pueden realizar en "puntos calientes" de HVR, es decir, residuos codificados por codones que experimentan una mutación con alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (véase, por ejemplo, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196, 2008), y/o residuos que se ponen en contacto con el antígeno, sometiéndose a prueba el VH o VL variante resultante para detectar la afinidad de unión. La maduración de la afinidad por construcción y reselección de colecciones secundarias se ha descrito, por ejemplo, en Hoogenboom et al. (*Methods in Molecular Biology* 178:1-37, O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001). En algunos modos de realización de maduración de la afinidad, se introduce diversidad en los genes variables elegidos para su maduración por cualquiera de una variedad de procedimientos (por ejemplo, PCR propensa a error, reordenamiento de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). A continuación, se crea una colección secundaria. A continuación, se criba la colección para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro procedimiento para introducir diversidad implica enfoques dirigidos a HVR, en los que se aleatorizan varios residuos de HVR (por ejemplo, 4-6 residuos a la vez). Se pueden identificar específicamente los residuos de HVR implicados en la unión a antígeno, por ejemplo, usando mutagénesis o modelado por barrido de alanina. A menudo se seleccionan, en particular, CDR-H3 y CDR-L3.

En determinados modos de realización se pueden producir sustituciones, inserciones o deleciones dentro de una o más HVR, siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo de unirse al antígeno. Por ejemplo, se pueden preparar alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras como se proporciona en el presente documento) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión en las HVR. Dichas alteraciones pueden estar, por ejemplo, fuera de los residuos en contacto con el antígeno en las HVR. En determinados modos de realización de las secuencias de VH y VL variantes proporcionadas anteriormente, cada HVR está inalterada o bien no contiene más de una, dos o tres sustituciones aminoacídicas.

Un procedimiento útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo a las que se puede dirigir la mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe por Cunningham y Wells (*Science*, 244:1081-1085, 1989). En este procedimiento, un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) se identifican y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con antígeno se ve afectada. Se pueden introducir otras sustituciones en las localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. De forma alternativa, o adicionalmente, o adicionalmente, se crea una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos adyacentes se pueden dirigir o eliminar como candidatos para sustitución. Se pueden cribar variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxiterminales que varían en longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuenciales de residuos aminoacídicos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión en el extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que incrementa la semivida en suero del anticuerpo.

#### b. Variantes de glucosilación

En determinados modos de realización, los anticuerpos de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecíficos de la invención se pueden alterar para incrementar o disminuir el grado en el que el anticuerpo se glucosila. La adición o deleción de sitios de glucosilación a un anticuerpo de la invención se puede lograr de forma práctica alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se cree o retire uno o más sitios de glucosilación.

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato fijado a la misma. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero típicamente comprenden un oligosacárido biantenarico ramificado que se fija en general por un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32, 1997. El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa fijada a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura de oligosacárido biantenarico. En algunos modos de realización se pueden realizar modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención para crear variantes de anticuerpo con determinadas propiedades mejoradas.

En un modo de realización, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa fijada (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser de un 1 % a un 80 %, de un 1 % a un 65 %, de un 5 % a un 65 % o de un 20 % a un 40 %. La

cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena glucídica en Asn297, en relación con la suma de todas las glucoestructuras fijadas a Asn297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y de alto contenido en manosa) como se mide por espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe en el documento WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al residuo de asparagina localizado en aproximadamente la posición 297 en la región Fc (numeración EU de los residuos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también se puede localizar aproximadamente  $\pm 3$  aminoácidos hacia 5' o hacia 3' de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia menores en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una función de ADCC mejorada. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de EE. UU. n.ºs US 2003/0157108; US 2004/0093621. Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpo "desfucosilado" o "carente de fucosa" incluyen: los documentos US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. (J. Mol. Biol. 336:1239-1249, 2004); y Yamane-Ohnuki et al. (Biotech. Bioeng. 87: 614, 2004). Los ejemplos de líneas celulares que pueden producir anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lec13 carentes de fucosilación de proteínas (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545, 1986); sol. de pat. de EE. UU. n.º US 2003/0157108 A1; y documento WO 2004/056312 A1, especialmente el ejemplo 11) y líneas celulares inactivadas, tales como células CHO inactivadas con el gen FUT8 de alfa-1,6-fucosiltransferasa (véanse, por ejemplo, Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614, 2004; Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688, 2006; y el documento WO 2003/085107).

Se proporcionan además variantes de anticuerpo con oligosacáridos bisegmentados, por ejemplo, en las que un oligosacárido biantenarío fijado a la región Fc del anticuerpo se bisegmenta por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener una fucosilación reducida y/o una función de ADCC mejorada. Los ejemplos de dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878; patente de EE. UU. n.º 6.602.684; y documento US 2005/0123546. También se proporcionan variantes de anticuerpo con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido fijado a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener una función de CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en el documento WO 1997/30087; el documento WO 1998/58964; y el documento WO 1999/22764.

#### c. Variantes de la región Fc

En determinados modos de realización se pueden introducir una o más modificaciones aminoacídicas en la región Fc de un anticuerpo de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecífico de la invención, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación aminoacídica (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácido.

En determinados modos de realización, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas, pero no todas, las funciones efectoras, que le hacen un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo in vivo sea importante, aunque determinadas funciones efectoras (tales como el complemento y ADCC) sean innecesarias o perjudiciales. Se pueden llevar a cabo ensayos de citotoxicidad in vitro y/o in vivo para confirmar la reducción/disminución de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo ensayos de unión al receptor de Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carezca de unión a Fc $\gamma$ R (de ahí que probablemente carezca de actividad de ADCC), pero conserve su capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, expresan solo Fc $\gamma$ RIII, mientras que los monocitos expresan Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet (Annu. Rev. Immunol. 9:457-492, 1991). Se describen ejemplos no limitantes de ensayos in vitro para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362 (véanse, por ejemplo, Hellstrom, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7059-7063, 1986) y Hellstrom, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:1499-1502, 1985; patente de EE. UU. n.º 5.821.337; Bruggemann et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361, 1987). De forma alternativa, se pueden emplear procedimientos de ensayo no radioactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACT1™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CYTOTOX 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen leucocitos mononucleares en la sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, se puede evaluar in vivo la actividad de ADCC de la molécula de interés, por ejemplo, en un modelo animal, tal como el divulgado en Clynes et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:652-656, 1998). También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo no se puede unir a C1q y de ahí que carezca de actividad de CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento se puede realizar un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163, 1996; Cragg et al., Blood. 101:1045-1052, 2003; y Cragg et al. Blood. 103:2738-2743, 2004). También se pueden realizar determinaciones de unión a FcRn y aclaramiento/semivida in vivo usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova et al., Int'l. Immunol. 18(12): 1759-1769, 2006).

Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patentes de EE. UU. n.ºs 6.737.056 y 8.219.149). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácido 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el mutante de Fc denominado "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 con alanina (patentes de EE. UU. n.ºs 7.332.581 y 8.219.149).

Se describen determinadas variantes de anticuerpo con una unión a FcR mejorada o disminuida (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.737.056; el documento WO 2004/056312 y Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604, 2001).

En determinados modos de realización, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones aminoacídicas que mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de los residuos).

En algunos modos de realización, se realizan alteraciones en la región Fc, que dan como resultado una unión a C1q y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alteradas (es decir, mejoradas o bien disminuidas), por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 6.194.551, el documento WO 99/51642 e Idusogie et al. (J. Immunol. 164:4178-4184, 2000).

Los anticuerpos con semividas incrementadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer et al., J. Immunol. 117:587, 1976; Kim et al., J. Immunol. 24:249, 1994), se describen en la pub. de EE. UU. n.º 2005/0014934A1. Esos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más de los residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, la sustitución del residuo 434 de la región Fc (patente de EE. UU. n.º 7.371.826).

Véanse también Duncan y Winter (Nature 322:738-40, 1988); la patente de EE. UU. n.º 5.648.260; la patente de EE. UU. n.º 5.624.821; y el documento WO 94/29351 en relación con otros ejemplos de variantes de la región Fc.

#### d. Variantes de anticuerpo genomanipulado con cisteína

En determinados modos de realización, puede ser deseable crear anticuerpos genomanipulados con cisteína, por ejemplo, "tioMAb", en los que uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen con residuos de cisteína. En modos de realización particulares, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Al sustituir esos residuos con cisteína, los grupos tiol reactivos se sitúan, de este modo, en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden usar para conjugar el anticuerpo con otros restos, tales como restos de fármaco o restos de conector-fármaco, para crear un inmunoconjugado, como se describe además en el presente documento. En determinados modos de realización se puede sustituir con cisteína uno cualquiera o más de los siguientes residuos: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Se pueden generar anticuerpos genomanipulados con cisteína como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.521.541.

#### e. Derivados de anticuerpo

En determinados modos de realización, un anticuerpo de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecífico proporcionado en el presente documento se puede modificar además para que contenga restos no proteínicos adicionales que son conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles. Los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o bien copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)/polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de poli(óxido de propileno)/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y mezclas de los mismos. El polietilenglicol-propionaldehído puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros fijados al anticuerpo puede variar y, si se fija más de un polímero, pueden ser las mismas o moléculas diferentes. En general, se puede determinar el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización en base a consideraciones que incluyen, pero sin limitarse a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se van a mejorar, si el derivado de anticuerpo se usará en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

En otro modo de realización se proporcionan conjugados de un anticuerpo de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecífico y un resto no proteínico que se pueden calentar selectivamente por exposición a radiación. En un modo de realización, el resto no proteínico es un nanotubo de carbono (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605, 2005). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, pero no se limita a, longitudes de onda que no dañan células normales, pero que calientan el resto no proteínico hasta una temperatura

a la que las células proximales al anticuerpo-resto no proteínico se destruyen.

#### f. Inmunoconjugados

La divulgación también proporciona inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecífico en el presente documento conjugado a uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes o fármacos quimioterápicos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o fragmentos de las mismas), o isótopos radioactivos.

En un modo de realización, un inmunoconjugado es un conjugado anticuerpo-fármaco (CAF) en el que un anticuerpo se conjuga a uno o más fármacos, incluyendo, pero sin limitarse a un maitansinoide (véanse las patentes de EE. UU. n.ºs 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1); una auristatina, tal como los restos del fármaco monometilauristatina DE y DF (MMAE y MMAF) (véanse las patentes de EE. UU. n.ºs 5.635.483 y 5.780.588 y 7.498.298); una dolastatina; una calicheamicina o derivado de la misma (véanse las patentes de EE. UU. n.ºs 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001 y 5.877.296; Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342, 1993; y Lode et al., *Cancer Res.* 58:2925-2928, 1998); una antraciclina, tal como daunomicina o doxorubicina (véanse Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477-523, 2006; Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362, 2006; Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532, 2002; King et al., *J. Med. Chem.* 45:4336-4343, 2002; y la patente de EE. UU. n.º 6.630.579); metotrexato; vindesina; un taxano, tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065.

En otro modo de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado a una toxina enzimáticamente activa o fragmento de la misma, incluyendo, pero sin limitarse a cadena A de difteria, fragmentos activos de no unión de la toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

En otro modo de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado a un átomo radioactivo para formar un radioconjugado. Una variedad de isótopos radioactivos están disponibles para la producción de radioconjugados. Los ejemplos incluyen  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$ ,  $Pb^{212}$  e isótopos radioactivos de Lu. Cuando se usa el radioconjugado para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para estudios gammagráficos, por ejemplo,  $Tc^{99m}$  o  $I^{123}$ , o un marcador de espín para resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como resonancia magnética, RM), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro. Los conjugados de un anticuerpo y un agente citotóxico se pueden preparar usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo) (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-acido (tales como bis-(p-acidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta et al., (*Science* 238:1098, 1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionúclido al anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El conector puede ser un "conector escindible" que facilita la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede usar un conector lábil en ácido, conector sensible a peptidasa, conector fotolábil, conector de dimetilo o conector que contenga disulfuro (Chari et al., *Cancer Res.* 52:127-131, 1992; y patente de EE. UU. n.º 5.208.020).

Los inmunoconjugados o CAF en el presente documento contemplan expresamente, pero no se limitan a dichos conjugados preparados con reactivos de reticulación, incluyendo, pero sin limitarse a, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB ((4-vinilsulfona)benzoato de succinimidilo), que están disponibles comercialmente (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE. UU.).

#### V. Ejemplos

Lo siguiente es un ejemplo de los procedimientos de la invención. Se entiende que se pueden poner en práctica otros modos de realización diversos, dada la descripción general proporcionada anteriormente. Se ofrecen los siguientes ejemplos a modo de ilustración y no a modo de limitación.

## Materiales y procedimientos

### A. Diseño de estudio, cohorte de pacientes, pruebas de PD-L1, evaluación de la respuesta

5 Las muestras para este análisis se obtuvieron de IMvigor210, que fue un estudio de fase II de un solo grupo que investigó atezolizumab (1200 mg cada 3 semanas (c3s)) en pacientes con carcinoma urotelial metastásico (CUM) (Identificador de ensayo clínico: NCT02108652). El criterio de valoración principal del ensayo fue lograr una tasa de respuesta parcial (RP) superior a un 10 % (criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST) v1.1). Fueron elegibles los pacientes en los que la quimioterapia basada en platino previa había fracasado o los pacientes no tratados previamente que no eran elegibles para quimioterapia basada en platino. El criterio de valoración principal se cumplió tanto en las poblaciones tratadas previamente como en las no tratadas. Era un requisito que a todos los pacientes se les extrajera tejido tumoral en los 2 años anteriores a la entrada en el estudio. Los tejidos se usaron inicialmente para el análisis de PD-L1 (anticuerpo SP142 usando la plataforma Ventana). La positividad de PD-L1 se definió como más de un 5 % de tinción de las células en el componente inmunitario del tejido tumoral. Se usó tejido adicional para el análisis exploratorio. Todos los pacientes tenían una enfermedad medible al inicio del estudio, lo que facilitó la evaluación de la respuesta. Se usó RECIST v1.1 para evaluar la respuesta al tratamiento. Se realizó una formación de imágenes de sección transversal cada 6 semanas. Todos los pacientes dieron la aprobación ética apropiada para este análisis.

### 20 B. Inmunohistoquímica (IHQ) de PD-L1

La IHQ de PD-L1 se ha descrito previamente en Powles et al. Nature 515:558-562, 2014. En resumen, las biopsias previas al cribado se obtuvieron de tejido incluido en parafina de archivo. Se requirió que los pacientes enviaran tejido al laboratorio central antes de la entrada en el estudio. Las muestras se procesaron en el momento del cribado. El tejido tumoral FFIP se tiñó con anticipación para detectar PD-L1 por inmunohistoquímica usando un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 humano de diagnóstico patentado (SP142). Las muestras se puntuaron en cuanto a la expresión de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor, que incluían macrófagos, células dendríticas y linfocitos. Las muestras se puntuaron como CI por inmunohistoquímica 0, 1, 2 o 3 si <1 %, ≥1 % pero <5 %, ≥5 % pero <10 % o ≥10% de células inmunitarias infiltrantes de tumor fueron positivas para PD-L1, respectivamente. Las puntuaciones de PD-L1 en pacientes con múltiples muestras de diferentes puntos temporales o muestras se basaron en la puntuación más alta. Este ensayo se validó para su uso en fase de investigación clínica en ensayos clínicos en el valor de corte de CI1 y CI2. Se realizó un análisis exploratorio de la expresión de PD-L1 en células tumorales (CT). Las muestras se puntuaron como CT0, CT1, CT2 o CT3 por inmunohistoquímica si <1 %, ≥1 % pero <5 %, ≥5 % pero <50 % o ≥50 % de células tumorales fueron positivas para PD-L1, respectivamente.

### C. Preparación de muestras de ácido nucleico

El diagnóstico anatomopatológico de cada caso se confirmó por la revisión de portaobjetos teñidos con HyE y todas las muestras que avanzaron hasta la extracción de ácido nucleico contenían un mínimo de un 20 % de células tumorales. Se marcaron las imágenes de HyE para macrodissección por un anatomopatólogo. A continuación, se extrajeron el ARN (kit de aislamiento de ARN High Pure FFPET, Roche) y el ADN (kit de tejido QIAAMP® DNA FFPE, Qiagen) de las secciones macrodissecadas.

45 La **fig. 5** muestra el número de pacientes con eficacia evaluable que tenían un estado de CI con PD-L1 conocido y al menos uno de los otros puntos de datos moleculares analizados aquí: secuenciación del exoma completo, identificación de perfiles mutacionales basada en FMOne, secuenciación de ARN y fenotipado inmunitario frente al cáncer. La **tabla 7** proporciona detalles demográficos de la población de pacientes evaluables por biomarcadores (BEP). Los pacientes para los que se generaron datos de secuenciación de ARN se eligieron como una BEP representativa, y se enumera la distribución de las covariables clínicas clave en comparación con la población por intención de tratar (ITT); solo se evaluaron los pacientes con eficacia evaluable. Se dan tanto el número de pacientes como los porcentajes (entre paréntesis). BCG: bacilo de Calmette y Guérin, ECOG: Grupo Oncológico Cooperativo de la Costa Este.

Tabla 7: demografía de la población ITT y BEP

Covariable		ITT (%)	PEB (%)
Sexo masculino		337 (79 %)	233 (78 %)
Raza blanca		390 (91 %)	270 (91 %)
BCG intravesical administrado		106 (25 %)	67 (22 %)
PD-L1	CI0	142 (33 %)	84 (28 %)
	CI1	155 (36 %)	112 (38 %)
	IC2+	132 (31 %)	102 (34 %)
ECOG	0	162 (38 %)	121 (41 %)
	1	243 (57 %)	165 (55 %)
	2	24 (6 %)	12 (4 %)
Tabaquismo	actualmente	42 (10 %)	32 (11 %)
	previamente	245 (57 %)	168 (56 %)
	nunca	142 (33 %)	98 (33 %)
Sitios metastásicos al inicio del estudio	hígado	121 (28 %)	81 (27 %)
	Solo LN	74 (17 %)	51 (17 %)
	visceral	200 (47 %)	139 (47 %)
	NA	34 (8 %)	27 (9 %)

#### D. Identificación de perfiles mutacionales (secuenciación del exoma completo (SEC) y panel FOUNDATIONONE® (FMOne))

Se generaron datos de SEC para 250 pacientes, secuenciando el ADN extraído tanto del tumor como de los leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica usando el kit Agilent SURESELECT® v5 (51 MB) en un secuenciador HISEQ® 2500 (ILLUMINA®). Se alinearon las lecturas del formato FASTQ con el genoma de referencia humano (NCBI Build 38) usando GSNAP (Wu et al. Bioinformatics 26:873-881, 2010; Wu et al. Methods Mol. Biol. 1418:283-334, 2016) versión "10-10-2013" (parámetros: '-M 2 -n 10 -B 2 -i 1 --pairmax-dna=1000 --terminal-threshold=1000 --gmap-mode=none --clip-overlap'). Las lecturas duplicadas en el archivo BAM resultante se marcaron usando PicardTools y las indeles se realinearon usando GATK IndelRealignerTool.

Las variantes somáticas se llamaron usando una unión de llamadas de Lofreq v2.1.2 (Wilm et al. Nucleic Acids Res. 40:11189-11201, 2012) y Strelka (Saunders et al. Bioinformatics 28:1811-1817, 2012). Las cualidades de indel se asignaron a las alineaciones usando "lofreq indelqual --dindel" y las mutaciones somáticas se llamaron usando "lofreq somatic" con la opción "--call-indels". Las mutaciones somáticas basadas en Strelka se llamaron usando el archivo de configuración "strelka\_config\_bwa\_default.ini" proporcionado por Strelka, siendo la única modificación la configuración "isSkipDepthFilters = 1" en lugar de "isSkipDepthFilters = 0". Se anotaron las mutaciones somáticas para detectar los efectos en los transcritos usando el predictor de efecto variante de Ensembl (McLaren et al. Genom Biol. 17:122, 2016) en modelos génicos basados en Refseq.

Para identificar las mutaciones expresadas, se contaron las alineaciones de RNAseq para las mutaciones somáticas identificadas en los datos del exoma usando la función tallyVariants del paquete R de VariantTools (Lawrence et al. VariantTools: Tools for Working with Genetic Variants, versión 1.12.0). El potencial de neoantígeno de cada mutación se predijo después de identificar los genotipos de HLA de los sujetos y asignar el par HLA-neoepitopo óptimo en todos los alelos de HLA y los péptidos de 8-11 meros que contienen la mutación, en base al valor mínimo de CI50 predicho por NetMHCcons (Karosiene et al. Immunogenetics 64:177-186, 2012). El genotipado de HLA se realizó en datos del exoma completo de leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC), usando Polysolver (Shukla et al. Nat. Biotech. 33:1152-1158, 2015).

Además, se extrajo ADN de cortes de 10 micrómetros de FFIP de 293 pacientes y se envió a un laboratorio certificado por las Enmiendas para la Mejora de Laboratorios Clínicos (CLIA), acreditado por el Estado de Nueva York y laboratorio acreditado por el Colegio de Anatomopatólogos de Estados Unidos (CAP) (Foundation Medicine, Cambridge, MA) para identificación de perfiles genómicos dirigidos basados en secuenciación de nueva generación (NGS). El ADN ligado al adaptador se sometió a una captura híbrida para todos los exones codificantes de 395 genes relacionados con el cáncer más intrones seleccionados de 31 genes reordenados con frecuencia en el cáncer (panel FMOne).

Las colecciones capturadas se secuenciaron hasta una mediana de la profundidad de cobertura de exón de >500x (ADN) o ~3 M de lecturas únicas (ARN) usando el kit Agilent SURESELECT® v5 a 51 Mb en el ILLUMINA® HISEQ® 2500, y las secuencias resultantes se analizaron para detectar sustituciones de bases, pequeñas inserciones y deleciones (indeles), alteraciones en el número de copias (amplificaciones focales y deleciones homocigotas) y fusiones/reordenamientos de genes, como se describe previamente (Frampton et al. Nat. Biotechnol. 31:1023-1031, 2013). Se retiraron las variantes de estirpe germinal frecuentes del Proyecto 1000 genomas (dbSNP142). Para maximizar la exactitud de detección de mutaciones (sensibilidad y especificidad) en muestras clínicas impuras, la prueba se optimizó y validó previamente para detectar sustituciones de bases con

una frecuencia de alelos mutantes (FAM)  $\geq 5$  %, indeles con una FAM  $\geq 10$  % con  $\geq 99$  % de exactitud y fusiones que se producen dentro de intrones/exones cebados con  $>99$  % de sensibilidad (Frampton et al. supra). Las alteraciones somáticas confirmadas conocidas depositadas en el Catálogo de Mutaciones Somáticas en Cáncer (COSMIC v62) se llaman a frecuencias alélicas  $>1$  % (Forbes et al. Nucleic Acids Res. 39:D945-D950, 2011).

A partir del panel FMOOne, se calculó la carga mutacional del tumor a partir del número de variantes cortas en regiones codificantes (sustituciones e indeles, incluyendo alteraciones sinónimas) que se detectaron. No se cuentan las alteraciones de estirpe germinal conocidas y previstas, ni las variantes somáticas conocidas y somáticas probables. La carga de mutaciones por Mb es el número de mutaciones contadas dividido entre las Mb de la región genómica diana del panel FMOOne. A menos que se indique de otro modo, la carga de mutaciones basada en FMOOne se usó para todos los análisis alrededor de la carga de mutaciones.

#### E. Asociación entre las mutaciones y la respuesta a atezolizumab o la carga de mutaciones

Para cada gen, se denominó mutante a un paciente si se informaba de una mutación conocida o probable para ese gen. Para los análisis basados en la vía, se denominó mutante a un paciente en una vía si se informaba de que algún gen dentro de la vía tenía una mutación conocida o probable. De otro modo, se consideraba que un paciente no era mutante. Se usó una prueba exacta de Fisher para determinar si el número de pacientes mutantes difería entre los pacientes que respondían al tratamiento (pacientes que responden al tratamiento completamente y parcialmente) y los pacientes que no respondían al tratamiento (enfermedad estable y progresiva). Se sometió a prueba una asociación entre el estado de mutación y la carga de mutaciones usando una prueba de Wilcoxon para datos independientes. Los valores de p de gen único se corrigieron por el número de pruebas realizadas usando el ajuste de Benjamini y Hochberg. Para análisis basados en la vía, se informan los valores de p nominales.

#### F. Identificación de perfiles de expresión génica

Se generaron perfiles de transcriptomas completos para 368 pacientes usando la tecnología TRUSEQ® RNA Access (ILLUMINA®). Las lecturas de RNAseq se alinearon en primer lugar con las secuencias de ARN ribosómico para retirar las lecturas ribosómicas. Las lecturas restantes se alinearon con el genoma de referencia humano (NCBI Build 38) usando la versión "10-10-2013" de GSNAP (Wu et al. Bioinformatics 26:873-881, 2010; Wu et al. Methods Mol. Biol. 1418:283-334, 2016), lo que permite un máximo de dos emparejamientos erróneos por secuencia de 75 bases (parámetros: '-M 2 -n 10 -B 2 -i 1 -N 1 -w 200000 -E 1 --pairmax-rna=200000 --clip-overlap'). Para cuantificar los niveles de expresión génica, se calculó el número de lecturas cartografiadas a los exones de cada gen RefSeq de una manera específica de hebra usando la funcionalidad proporcionada por el paquete de R/Bioconductor de GenomicAlignments (Lawrence et al. PLoS Comput. Biol. 0:e1003118, 2013).

#### G. Expresión génica diferencial y asociación con la carga de mutaciones o IHQ de PD-L1

Después del control de calidad usando el paquete de R/Bioconductor arrayQualityMetrics (Kauffmann et al. Genomics 95:138-142, 2010), los datos de recuento se normalizaron usando la media recortada de los valores de M (TMM) y se transformaron con voom a  $\log_2$ -recuentos por millón con ponderaciones de precisión asociados (Law et al. Genome Biol. 15:R29, 2014).

Para identificar los genes asociados con la tinción de la proteína PD-L1 en células inmunitarias (CI), se ajustó un modelo de regresión lineal, usando la expresión transformada con  $\log_2$  normalizada de cada gen como variable de respuesta y el porcentaje transformado con  $\log_2$  de las células inmunitarias identificadas como positivas para PD-L1 (Cip) como variables independientes. Los tamaños del efecto informados representan los coeficientes del ajuste del modelo, ajustados a escala por el doble de la desviación estándar de las Cip transformadas con  $\log_2$  multiplicado por la pendiente de la regresión. La **fig. 1C** representa gráficamente el tamaño del efecto y el valor de p ajustado solo para el término de positividad de CI con PD-L1.

Para identificar las biología asociadas con la respuesta a atezolizumab, se agruparon a los pacientes en pacientes que responden al tratamiento (pacientes que responden al tratamiento completamente y parcialmente) y pacientes que no responden al tratamiento (enfermedad estable y progresiva). Los genes expresados diferencialmente entre estos dos grupos se determinaron usando el paquete de R/Bioconductor limma (Ritchie et al. Nucleic Acids Res. 43:e47, 2015), que implementa un enfoque bayesiano empírico para estimar los cambios en la expresión génica usando pruebas de la t moderadas.

Para identificar los genes asociados con la carga mutacional del tumor, se ajustó un modelo de regresión lineal, usando la expresión transformada con  $\log_2$  normalizada de cada gen como variable de respuesta y el lote, así como la cohorte de la carga de mutaciones, como variables independientes (ya que se descubrió que estas dos últimas se correlacionan con CMT). Usando la función anovaO de R, se calcularon los valores de p de la prueba F. Los tamaños del efecto informados representan los coeficientes del ajuste del modelo, ajustados a escala por el doble de la desviación estándar de CMT.

#### H. Análisis de enriquecimiento del conjunto de genes usando la Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto



(KEGG)

Tras las pruebas de asociación (expresión génica con respuesta o carga de mutaciones), Fios Genomics analizó los 1000 genes principales (clasificados por valor de p) para el enriquecimiento de los miembros de la vía de KEGG usando una prueba hipergeométrica (Falcon et al. Bioinformatics 23:257-258, 2007), evaluando los genes regulados por incremento y por disminución por separado. Los valores de p de enriquecimiento se corrigieron por el número de vías sometidas a prueba usando el procedimiento de Benjamini y Hochberg. Los resultados completos de los análisis de enriquecimiento se informan en la **tabla 8** (respuesta) y la **tabla 9** (carga de mutaciones). La **tabla 8** enumera los conjuntos de genes de KEGG significativamente (FDR <0,1) enriquecidos en genes expresados diferencialmente por respuesta (RC/RP frente a EE/EP). La "dirección" indica si la categoría se enriqueció en genes regulados por incremento ("incremento") o por disminución ("disminución") en los pacientes que responden al tratamiento. Los "genes identificados" enumeran todos los genes dentro de una categoría dada que se descubrió que se asocian con la respuesta. "S" indica el número de estos genes, "N" da el número total de genes en una categoría, mientras que "p (aj.)" contiene los valores de p de enriquecimiento ajustados (prueba hipergeométrica). La **tabla 9** enumera los conjuntos de genes de KEGG significativamente (FDR <0,05) enriquecidos en genes correlacionados con CMT. La "dirección" indica si la categoría se enriqueció en genes correlacionados positivamente ("positiva") o negativamente ("negativa") con CMT. Los "genes identificados" enumeran todos los genes dentro de una categoría dada que se descubrió que se correlacionan con CMT. "S", "N" y "p (aj.)" son como en la **tabla 8**.

**Tabla 8: vías asociadas con la respuesta**

Dirección	Nombre	Genes identificados	S	N	p (aj.)
Incremento	Replicación del ADN	DNA2, FEN1, LIG1, MCM2, MCM4, MCM6, MCM7, PCNA, POLA2, POLE, POLE2, PRIM1, PRIM2, RFC2, RFC3, RFC4, RFC5, RNASEH2A, RPA1, RPA3	20	36	0,0000
Incremento	Ciclo celular	BUB1, BUB1B, CCNA2, CCNB2, CCNE1, CCNE2, CDC20, CDC25A, CDC25C, CDC6, CDK1, CDK2, CDKN2A, DBF4, E2F1, E2F2, ESPL1, MAD2L1, MAD2L2, MCM2, MCM4, MCM6, MCM7, ORC1, ORC6, PCNA, PLK1, SKP2, SMC3, TFDP1, TTK, YWHAB	32	124	0,0000
Incremento	Vía de la anemia de Fanconi	BLM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, EME1, ERCC4, FANCA, FANCB, FANCD2, FANCI, PALB2, RAD51, RAD51C, RMI1, RMI2, RPA1, RPA3, TOP3A, UBE2T	19	53	0,0000
Incremento	Lupus eritematoso sistémico	H2AFV, H2AFZ, HIST1H2AB, HIST1H2AG, HIST1H2AH, HIST1H2AI, HIST1H2AM, HIST1H2BC, HIST1H2BD, HIST1H2BF, HIST1H2BJ, HIST1H2BK, HIST1H2BL, HIST1H2BN, HIST1H2BO, HIST1H3B, HIST1H3D, HIST1H3H, HIST1H4A, HIST1H4B, HIST2H2AB, HIST2H2AC, HIST2H2BE, HIST2H2BF, HIST2H3D, HIST3H2A, IFNG	27	134	0,0000
Incremento	Alcoholismo	CREB3L4, H2AFV, H2AFZ, HIST1H2AB, HIST1H2AG, HIST1H2AH, HIST1H2AI, HIST1H2AM, HIST1H2BC, HIST1H2BD, HIST1H2BF, HIST1H2BJ, HIST1H2BK, HIST1H2BL, HIST1H2BN, HIST1H2BO, HIST1H3B, HIST1H3D, HIST1H3H, HIST1H4A, HIST1H4B, HIST2H2AB, HIST2H2AC, HIST2H2BE, HIST2H2BF, HIST2H3D, HIST3H2A	27	179	0,0000
Incremento	Recombinación homóloga	BLM, BRCA2, EME1, RAD51, RAD51C, RAD54L, RPA1, RPA3, TOP3A, XRCC2, XRCC3	11	28	0,0000
Incremento	Reparación de emparejamiento erróneo	EXO1, LIG1, PCNA, RFC2, RFC3, RFC4, RFC5, RPA1, RPA3	9	23	0,0000
Incremento	Reparación por escisión nucleotídica	CETN2, ERCC4, LIG1, PCNA, POLE, POLE2, RFC2, RFC3, RFC4, RFC5, RPA1, RPA3	12	47	0,0000
Incremento	Meiosis de ovocitos	AURKA, BUB1, CCNB2, CCNE1, CCNE2, CDC20, CDC25C, CDK1, CDK2, ESPL1, FBXO5, MAD2L1, MAD2L2, PLK1, SGOL1, SMC3, YWHAB	17	113	0,0000
Incremento	Carcinogénesis vírica	CCNA2, CCNE1, CCNE2, CDC20, CDK1, CDK2, CDKN2A, CREB3L4, GTF2E1, HIST1H2BC, HIST1H2BD, HIST1H2BF, HIST1H2BJ, HIST1H2BK, HIST1H2BL, HIST1H2BN, HIST1H2BO, HIST1H4A,	23	206	0,0000

		HIST1H4B, HIST2H2BE, HIST2H2BF, SKP2, YWHAB			
Incremento	Reparación por escisión de bases	FEN1, LIG1, NEIL3, PARP1, PARP2, PCNA, POLE, POLE2, UNG	9	33	0,0000
Incremento	Vía de señalización p53	CCNB2, CCNE1, CCNE2, CDK1, CDK2, CDKN2A, GTSE1, PPM1D, RFWD2, RRM2	10	68	0,0008
Incremento	Empalmosoma	HNRNPM, LSM3, LSM4, LSM5, MAGOHB, PRPF19, SF3B2, SF3B3, SF3B4, SNRNP40, SNRPA1, SNRPC, USP39, WBP11	14	132	0,0013
Incremento	Proteosoma	IFNG, PSMA4, PSMB2, PSMB4, PSMC4, PSMD4, PSMD7	7	44	0,0045
Incremento	Maduración de ovocitos mediada por progesterona	BUB1, CCNA2, CCNB2, CDC25A, CDC25C, CDK1, CDK2, MAD2L1, MAD2L2, PLK1	10	88	0,0054
Incremento	MicroARN en cáncer	BRCA1, CCNE1, CCNE2, CDC25A, CDC25C, CDCA5, CDKN2A, DNMT1, E2F1, E2F2, EZH2, KIF23, STMN1, TRIM71	14	186	0,0298
Incremento	Metabolismo de pirimidina	CTPS1, DTYMK, POLA2, POLE, POLE2, PRIM1, PRIM2, RRM2, TYMS	9	104	0,0515
Incremento	Degradación del ARN	CNOT10, EXOSC2, EXOSC8, LSM3, LSM4, LSM5, PARN	7	76	0,0771
Disminución	Interacción citocina-receptor de citocina	ACVR1, CCL24, FLT4, IFNGR1, IL4R, IL6ST, KIT, LIF, PDGFA, PDGFRB, TGFB1, TGFB2, TNFRSF10B, TNFRSF14, TNFRSF1A	15	264	0,0835

Tabla 9: vías asociadas con CMT

Dirección	Nombre	Genes identificados	S	N	p (aj.)
Positiva	Replicación del ADN	FEN1, LIG1, MCM2, MCM4, MCM7, POLD1, POLE, POLE3, RFC2, RNASEH2A, RPA1	11	36	0,0000
Positiva	Ciclo celular	ANAPC2, CCNB1, CDC20, CDC25A, CDC45, CDC6, CDKN2B, E2F1, E2F2, ESPL1, MCM2, MCM4, MCM7, PKMYT1, TFDPI, TTK	16	124	0,0001
Positiva	Reparación por escisión nucleotídica	LIG1, POLD1, POLE, POLE3, RAD23A, RAD23B, RFC2, RPA1	8	47	0,0039
Positiva	Enfermedad de Huntington	ATP5D, ATP5G1, ATP5O, BAX, COX5B, COX6B1, COX7B2, NDUFA13, NDUFA8, NDUFB7, NDUFS7, PLCB3, POLR2I, POLR2L, SLC25A5	15	193	0,0311
Positiva	Vía de la anemia de Fanconi	ATRIP, EME1, FANCC, FANCG, RAD51, RMI1, RPA1	7	53	0,0326
Positiva	Recombinación homóloga	EME1, POLD1, RAD51, RAD54L, RPA1	5	28	0,0361
Positiva	Ciclo del citrato (ciclo TCA)	ACLY, MDH1, MDH2, PCK2, SUCLG1	5	30	0,0418
Positiva	Esteatosis hepática no alcohólica (EHNA)	BAX, COX5B, COX6B1, COX7B2, GSK3A, NDUFA13, NDUFA8, NDUFB7, NDUFS7, RXRA, SREBF1, TRAF2	12	151	0,0418
Positiva	Fosforilación oxidativa	ATP5D, ATP5G1, ATP5O, ATP6V1F, COX5B, COX6B1, COX7B2, NDUFA13, NDUFA8, NDUFB7, NDUFS7	11	133	0,0418
Positiva	Reparación por escisión de bases	FEN1, LIG1, POLD1, POLE, POLE3	5	33	0,0462
Negativa	Cascadas del complemento y la coagulación	CFH, F8, PROC, SERPINA5, SERPIND1, TFPI	6	69	0,0267
Negativa	Vía de señalización PI3K-Akt	DDIT4, EGF, FGF7, GNG11, ITGAV, ITGB3, JAK1, KIT, LAMA4, LPAR1, LPAR6, NGFR, PTEN, RBL2	14	345	0,0267
Negativa	Vías en el cáncer	AGTR1, EDNRA, EGF, FGF7, GNG11, HIF1A, ITGAV, JAK1, KIT, LAMA4, LPAR1, LPAR6, PTEN, TGFB2, TRAF5	15	397	0,0267

## I. Conjuntos de genes usados para firmas

Debido a que las vías de KEGG a menudo incluyen grandes cantidades de genes con funciones poco relacionadas, se construyeron conjuntos de genes refinados (**tabla 10**) para las cuatro biología centrales mencionadas en el texto. Específicamente:

(i) para los genes de reparación de daño en ADN, se usó un conjunto de genes como se describe por Lange et al. Nat. Rev. Cancer 11:96-110, 2011;

(ii) para los genes reguladores del ciclo celular, se usaron genes dentro de la vía p53/Rb que TCGA informó que se informa con frecuencia en el cáncer de vejiga (The Cancer Genome Atlas Research Nature 507:315-322, 2014);

(iii) para los genes de T efectores CD8, se usó la firma interna publicada previamente (Rosenberg et al. Lancet 387:1909-1920, 2016; Balar et al. Lancet 389:67-76, 2017); y

(iv) para TGF- $\beta$ , se consideraron tres firmas diferentes. En primer lugar, para realizar un seguimiento del aporte de la vía, se evaluaron los ligandos (TGFB1, TGFB2 y TGFB3) y los receptores (TGFB1R1, TGFB1R2 y TGFB1R3) para detectar su asociación con el resultado en IMvigor210. TGFB1 y TGFB1R2 se asociaron significativamente con el resultado ( $p_{aj.} = 8,956 \times 10^{-3}$  y  $p_{aj.} = 1,070 \times 10^{-2}$ , respectivamente), y los dos se usaron como la firma interna de dos genes de TGF- $\beta$ . En segundo lugar, para realizar un seguimiento de la salida de la vía, se generó una firma de respuesta de TGF- $\beta$  panfibroblástica (pan-F-TBRS), como se describe a continuación. Además, en la **fig. 2A**, también se mostró un conjunto más grande de genes que se informa que están implicados en la organización de la matriz extracelular (Sjödahl et al. Clin. Cancer. Res. 18:3377-3386, 2012).

## J. Cálculo de la puntuación de firma

Para el análisis de la expresión génica, en primer lugar se transformó la expresión de cada gen en una firma con puntuación z. A continuación, se realizó un análisis de componentes principales y se extrajo el componente principal 1 para que sirviera como puntuación de firma génica. Este enfoque tiene la ventaja de centrar la puntuación del conjunto en el bloque más grande de genes bien correlacionados (o anticorrelacionados) del conjunto, mientras que se reducen las contribuciones de los genes que no se rastrean con otros miembros del conjunto.

## K. Asociaciones entre las puntuaciones de firma génica o carga mutacional del tumor y rasgos de interés

A continuación están los procedimientos estadísticos que se usaron para las diversas pruebas a lo largo de los ejemplos:

(i) para las asociaciones con la respuesta, solo se consideraron los pacientes con eficacia evaluable; estos se agruparon en pacientes que responden al tratamiento (RC/RP) y pacientes que no responden al tratamiento (EE/EP), a menos que se establezca de otro modo;

(ii) para asociaciones de rasgos binarios, por ejemplo, la respuesta, con rasgos continuos distribuidos normalmente, tal como puntuaciones de expresión génica, se realizaron pruebas de la t de dos muestras; si se realizaron múltiples pruebas por pares dentro de una firma génica - combinación de rasgos, se corrigieron los valores de p por Bonferroni;

(iii) para asociaciones de rasgos binarios, por ejemplo, la respuesta o el estado de mutación, con CMT que mostró una distribución sesgada, se realizaron pruebas de Wilcoxon para datos emparejados. CMT se transformó con  $\log_2$ ; se excluyó del análisis a un paciente con valor atípico con 0 CMT;

(iv) para evaluar las asociaciones entre dos rasgos cualitativos, por ejemplo, la respuesta y el nivel de CI, se realizaron las pruebas exactas de Fisher;

(v) para las asociaciones con el fenotipo inmunitario, se trató el fenotipo inmunitario como un factor ordenado (desierto < exclusión < infiltrado) y se calcularon los valores de p de la prueba del cociente de verosimilitud usando ANOVA. Una excepción fue la prueba de asociación con CMT, donde se usó una prueba H de Kruskal Wallis; y

(vi) también se usaron pruebas de cociente de verosimilitud para someter a prueba las asociaciones entre un rasgo continuo, tal como la puntuación de firma de expresión génica, y un rasgo cualitativo con más de 2 grupos, tal como el nivel de CI. Además, se usó la misma prueba para evaluar la interacción entre dos rasgos, comparando un modelo donde los dos rasgos se incluían como dos variables independientes con un modelo que incluía un término de interacción entre estas dos variables.

En visualizaciones de CMT en escala  $\log_2$ , se eliminaron los pacientes sin mutaciones (dependiendo de la

población evaluable del biomarcador exacto, esto fue solo uno o dos pacientes). En todos los gráficos, el número de pacientes dentro de cada grupo se da en la parte superior.

#### L. Varianza explicada en la respuesta

Los modelos lineales generalizados se ajustaron utilizando la respuesta binaria (RC/RP frente a EE/EP) como variable dependiente y las puntuaciones de única/combinaciones de diferentes firmas o CMT como variables independientes. Se extrajo la pseudo- $R^2$  de regresión logística como una medida de la "varianza explicada" en la respuesta del paciente, es decir, el porcentaje de variación en la respuesta del paciente que se puede atribuir a las contribuciones de los aportes biológicos (véase Dobson et al. An Introduction to Generalized Linear Models. Chapman y Hall/CRC Press, 2008).

#### M. Subtipificación molecular

Los subtipos de TCGA se asignaron de acuerdo con la metodología descrita en Rosenberg et al. supra.

Para asignar subtipos de Lund, se proporcionó un conjunto de datos de centroides de expresión génica para 1038 genes por Sjö Dahl et al. (Sjodahl et al. Clin. Cancer Res. 18:3377-3386, 2012; Sjodahl et al. Am. J. Pathol. 183:681-691, 2013). Se usó un conjunto reducido de 884 centroides que se superponían con los genes detectados en los datos de RNAseq informados para asignar un subtipo molecular (MS1 a, MS1 b, MS2a1, MS2a2, MS2b1, MS2b2.1 y MS2b2.2). Puesto que estos centroides se basaron en perfiles de expresión génica de micromatrices, que no se pueden transferir simplemente a otra plataforma como la secuenciación de ARN, se eligió realizar la asignación del subtipo molecular calculando la distancia de correlación de Spearman entre los niveles de expresión centrados en la mediana ( $\log_2$ ) de estos 884 genes y los centroides. Al usar un enfoque basado en clasificaciones, el objetivo era minimizar los efectos específicos de la plataforma (sin embargo, cabe destacar que el uso de Pearson en lugar de Spearman proporcionó resultados muy similares). A cada muestra se le asignó el subtipo molecular con la distancia más corta. Posteriormente, las agrupaciones MS1 a y MS1 b se combinaron con los subtipos urotelial A, MS2a1 y MS2a2 con subtipos genómicamente inestables, respectivamente; las agrupaciones MS2b1, MS2b2.1 y MS2b2.2 son equivalentes a los subtipos infiltrado, urotelial B y basaloide/de tipo SCC, respectivamente.

Téngase en cuenta que recientemente se ha sugerido "de tipo urotelial" como reemplazo del original "urobasal" (Lerner et al. Bladder Cancer 2:37-47, 2016). Aquí se usa la nomenclatura actualizada. De forma similar, ahora es preferente "basaloide/de tipo SCC" al "de tipo SCC" original.

#### N. Conjuntos de genes usados para la matriz cromática de subtipos

Los marcadores de subtipo de Lund se asignaron como se describe anteriormente. Para entender mejor la relación entre estos subtipos y diversos ejes de la biología considerados en este manuscrito, las **figs. 2A y 2H** muestran valores de expresión génica para genes adicionales (es decir, genes que no necesariamente se usaron para la asignación de subtipos) de 13 biología. Los genes presentados son miembros representativos de conjuntos de genes más grandes construidos como sigue:

**A:** firma del gen FGFR3 informada por Sjö Dahl et al. 2012, supra (se seleccionaron representantes);

**B:** firma de T efector CD8 (Rosenberg et al. supra);

**C:** mecanismo de procesamiento de antígenos informado por Şenbabaoğlu et al. Genome Biol. 17:231, 2016;

**D:** firma de punto de control inmunitario;

**E:** MKI67 y genes del ciclo celular seleccionados (KEGG) que contribuyeron al enriquecimiento del conjunto de genes para su asociación con la respuesta (**tabla 8**);

**F:** histonas dependientes de la replicación del ADN (representantes de histonas descubiertas en la **tabla 8**);

**G:** miembros seleccionados del conjunto de genes de reparación de daño en ADN, presentado anteriormente;

**H:** conjunto de organización de la matriz extracelular (MEC) informado por Sjö Dahl et al. 2012 (se seleccionaron representantes);

**I:** firma de dos genes de TGF- $\beta$ ;

**J:** firma de angiogénesis informada por Sjö Dahl et al. 2012 (se seleccionaron representantes);

**K:** marcadores de transición epitelio-mesenquimatoso (TEM) informados por Damrauer et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111:3110-3115, 2014;

**L:** pan-F-TBRS, determinada como se describe a continuación; y

**TCGA:** los genes expresaron el subtipo TCGA específicamente, como se informa por The Cancer Genome Atlas Research Nature, supra (**fig. 2H**).

#### O. Doble tinción CD8/tricrómica

Se realizó la doble tinción CD8/tricrómica combinada en cortes de FFIP de 4  $\mu$ m. El procedimiento de IHQ se realizó en primer lugar usando el anticuerpo monoclonal de conejo anti-CD8 humano SP16 (Spring Bioscience; n.º de cat. M3160) en una dilución 1:100 durante una hora a temperatura ambiente tras la recuperación de antígeno usando el reactivo Cell Conditioning 1 (CC1, Ventana Medical Systems; n.º de cat. 950-124). El anticuerpo primario unido específicamente se visualizó usando el kit OMNIMAP™ DAB (Ventana, n.º cat. 760-149). Después de completar el procedimiento de IHQ y enjuagar con agua destilada, se fijaron los portaobjetos en fijador de Bouin a 60 °C durante 1 h y a continuación se sometieron a una tinción tricrómica de rutina que consistía en hematoxilina de Weigert, fucsina ácida-escarlata de Biebrich, ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico y azul de anilina como se describe previamente (Laboratory Methods in Histotechnology, Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas, 1992, p. 132). Al finalizar el procedimiento de tinción, los portaobjetos se deshidrataron en una concentración creciente de etanol, se sumergieron en xileno y, a continuación, se cubrieron con cubreobjetos usando un medio de montaje sintético.

#### P. Estudios in vivo

La línea celular de carcinoma mamario murino EMT6 se obtuvo de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Las células se cultivaron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 más L-glutamina 2 mM con suero bovino fetal al 10 % (HYCLONE®). Las células en crecimiento en fase logarítmica se centrifugaron, se lavaron una vez con solución salina equilibrada de Hank (HBSS), se contaron y se resuspendieron en HBSS al 50 % y MATRIGEL™ al 50 % (BD Biosciences) a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml para su inyección en ratones. Se obtuvieron ratones hembra Balb/c de Charles River Laboratories (Hollister, CA). Los ratones se alojaron en jaulas Micro-isolator para roedores estándar y se aclimataron a las condiciones del estudio durante al menos 3 días antes del implante de células tumorales. Los animales tenían 8-10 semanas de edad. Para el estudio solo se usaron animales que parecían estar sanos y sin anomalías evidentes. Se inocularon a los ratones  $1 \times 10^5$  células de EMT6 en 100  $\mu$ l de HBSS MATRIGEL™ (1:1) en el cuerpo adiposo mamario izquierdo n.º 5. Cuando el tumor alcanzó un volumen de 130-230 mm<sup>3</sup> (aproximadamente 8 días después de la inoculación), los animales se distribuyeron en grupos de tratamiento en base al volumen del tumor y se trataron con anticuerpos de control de isotipo, anti-PD-L1 (primera dosis de 10 mg/kg seguida de 5 mg/kg después de esto), anti-TGF beta (10 mg/kg) o una combinación de anti-PD-L1 con anti-TGF beta. Siete días después del inicio del tratamiento, se sacrificaron los ratones y se extrajeron los tumores para análisis IHQ o bien citometría de flujo. Para los estudios de eficacia, se administraron los anticuerpos tres veces por semana durante 3 semanas (por vía intravenosa durante la primera dosis y por vía intraperitoneal después de esto). Se midieron los tumores dos veces por semana con un calibrador y se calcularon los volúmenes del tumor usando la fórmula del elipsoide modificada,  $1/2 \times (\text{largo} \times \text{ancho}^2)$ . Cuando los volúmenes del tumor descendieron por debajo de 32 mm<sup>3</sup> (el límite más bajo de detección) se consideraron regresiones completas (RC) (un 100 % de inhibición del crecimiento tumoral). Se sacrificaron los ratones si los volúmenes del tumor excedían 2000 mm<sup>3</sup>. Ningún ratón cumplió con los criterios para su sacrificio debido a la pérdida de peso corporal ni presentó signos clínicos adversos durante el estudio. Todos los estudios con animales en el presente documento se aprobaron por el Comité institucional para el cuidado y uso de animales de Genentech. Se estimó que los tamaños de grupo usados para este estudio eran los más pequeños necesarios para generar datos significativos.

#### Q. Cuantificación de proteínas y ARN de tumor completo en ratones

Se analizó la abundancia de isoformas de TGF- $\beta$  en tumores EMT6 no tratados a niveles tanto de ARN como de proteína, por RNAseq y ELISA, respectivamente. Para el análisis RNAseq, se extrajeron tumores de un tamaño promedio de 300 mm<sup>3</sup>. Para la cuantificación por ELISA de la proteína TGF- $\beta$ , se extrajeron los tumores 14 días después de la inoculación en el cuerpo adiposo mamario, se ultracongelaron rápidamente y posteriormente se lisaron con tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) en un sistema de homogenización TissueLyser (Qiagen). Se cuantificó la proteína total por el ensayo de ácido bicinonínico (BCA) y se normalizó el aporte de proteína total en todas las muestras. El TGF- $\beta$  en las muestras se activó con ácido y se midió siguiendo las instrucciones del kit de ELISA (TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 de ratón, R&D Systems; TGF- $\beta$ 3 de ratón, LSBio). VEGF se cuantificó usando el kit de ELISA QUANTIKINE® para VEGF de ratón (R&D Systems) en plasma extraído siete días después del comienzo del tratamiento.

## R. Preparación de suspensión de células sueltas y tinción de anticuerpo para citometría de flujo

Se extrajeron los tumores siete días después del inicio del tratamiento. Los tumores se pesaron y se digirieron enzimáticamente usando una mezcla de dispasa (Life Technologies), colagenasa P y DNase (Roche) durante 45 min a 37 °C, para obtener una suspensión de células sueltas. Se contaron las células usando un VI-CELL® XR (Beckman Coulter).

Para la tinción con fosfo-SMAD (pSMAD), las células se fijaron y permeabilizaron usando tampón de lisar/fijar BD PHOSFLOW™ y tampón de permeabilización III BD PHOSFLOW™ (BD Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se tiñeron con un anticuerpo conjugado con ficoeritrina (PE) contra la forma fosforilada de SMAD2 y SMAD3 durante 1 h en hielo a una concentración de 0,08 µg/ml (clon 072-670, BD Biosciences, San José, CA). Para la tinción de linfocitos T, las células se incubaron en primer lugar con un bloque de Fc BD de ratón (clon 2.4G2, 5 µg/ml, BD Biosciences) y una tinción de viabilidad (tinción de células muertas LIVE/DEAD® Fixable Aqua, Invitrogen) durante 30 min en hielo. A continuación, las células se tiñeron con los siguientes anticuerpos: CD45 (BV605, clon 30-F11, 0,67 µg/ml, BD Biosciences), TCRb (PE, clon H57-597, 2 µg/ml, Biolegend), CD8 (APC-Cy7, clon 53-6.7, 1 µg/ml, Biolegend) durante 30 min en hielo. Las células se fijaron y permeabilizaron (EBIOSCIENCE™ Foxp3/conjunto de tampón de tinción de factor de transcripción, Thermo Fisher Scientific Inc.) para tinción para detectar granzima B (FITC, clon NGZB, 5 µg/ml, EBIOSCIENCE™, Thermo Fisher Scientific Inc.).

Los datos de citometría de flujo se recopilaron con un analizador celular BD LSRFORTESSA™ o FACSYMPHONY™ (BD Biosciences) y se analizaron usando el programa informático FLOWJO® (versión 10.2, FlowJo, LLC).

## S. Inmunohistoquímica en tejido de ratón

Se extrajeron los tumores siete días después del inicio del tratamiento. Los tumores se fijaron en formol tamponado neutro (NBF) al 10 % y se incluyeron en parafina. La IHQ se realizó en cortes histológicos incluidos en parafina de 4 µm de espesor montados en portaobjetos de vidrio SUPERFROST™ Plus. La tinción se realizó en el dispositivo de tinción LAB VISION™ Autostainer (ThermoFisher Scientific). Los cortes se desparafinaron y se rehidrataron en agua desionizada. La recuperación de antígeno se realizó con 1x solución de recuperación DAKO Target Retrieval Solution (Agilent Technologies) durante 20 min a 99 °C y se enfrió hasta 74 °C. Posteriormente, la peroxidasa endógena se desactivó incubando en cortes en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 % durante 4 min a temperatura ambiente. Se detectó CD3 (ThermoFisher Scientific, clon SP7, n.º de cat. RM-9107-S, dilución 1:200) usando un anticuerpo secundario anti-conejo (7,5 µg/ml) con el kit de detección ABC Peroxidase Elite (Vector Laboratories, n.º de cat. PK-6100). Los cortes se contratiñeron con hematoxilina de Mayer, se deshidrataron, se montaron con medio de montaje permanente y se cubrieron con un cubreobjetos.

## T. Generación de firma de respuesta de TGF-β panfibroblástica (pan-F-TBRS)

Se privaron de suero células de fibroblastos primarias de vejiga (PHBR, células de fibroblastos de vejiga normal primarias, PCS-420-013™, ATCC), colon (CCD-18CO, CRL-1459™, ATCC), mama (HMF, n.º 7630, ScienCell Research Laboratories), pulmón (IMR90, CCL-186™, ATCC), páncreas (HPaSteC, n.º 3836, ScienCell Research Laboratories) y ovario (HOF, n.º 7336, ScienCell Research Laboratories) durante la noche antes del tratamiento con (1) control, (2) TGF-β1 (10 ng/ml, n.º) o (3) TGF-β1 (10 ng/ml) + el inhibidor de TGF-β galunisertib (10 µM) por duplicado durante 24 h. Los genes inducidos por TGF-β se identificaron por análisis del transcriptoma de RNAseq comparando las tres condiciones anteriores. Se determinó F-TBRS usando los siguientes criterios: (1) nivel de expresión al menos 2 veces mayor en el grupo tratado con TGF-β1 en comparación con los controles (tasa de descubrimiento falso (FDR) 0,1); (2) nivel de expresión al menos 2 veces menor en el grupo de TGF-β1 + inhibidor en comparación con el tratamiento con TGF-β1 solo (FDR 0,1); (3) cumplir con los criterios (1) y (2) en los 6 tipos de células de fibroblastos. Los genes que pasaron estos tres criterios (n = 79) se clasificaron de acuerdo con la fuerza de la inhibición (control frente a TGF-β1 + inhibidor de TGF-β); y se filtraron por al menos 5 recuentos por millón de reducción de la media para definir una pan-F-TBRS de 19 genes tisular.

## U. Generación de pan-F-TBRS de 6 genes tisular (firma de 6 genes)

Se desarrolló una pan-F-TBRS de 6 genes tisular en base a los datos de pan-F-TBRS de 19 genes descritos anteriormente, pero priorizando además los componentes (TGFB1 y TGFB2) y las dianas (CTGF, ADAM19, ACTA2 y COMP) de la vía de TGF-β. Para validar el valor predictivo de la firma de 6 genes, se calcularon los cocientes de riesgos instantáneos para efectos pronósticos (usando modelos de regresión de riesgos instantáneos proporcionales de Cox continuos univariantes) y efectos predictivos, y se calcularon los cocientes de riesgos instantáneos para efectos predictivos (usando la prueba del orden logarítmico con la mediana del punto de corte) en ensayos clínicos con atezolizumab. El análisis demostró que la alta expresión de la firma de 6 genes se asocia con la falta de respuesta a la monoterapia con atezolizumab (atezo) en ensayos de CU, carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de mama triple negativo (CMTN) y adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP). Véase, por ejemplo, las **figs. 6B y 6C**, que muestran datos de IMvigor210 y del estudio POPLAR (NCT01903993), respectivamente. Además, en el conjunto de datos de cáncer colorrectal (CaCR) de TCGA, la alta expresión de la

firma de 6 genes también se asoció significativamente con una supervivencia global desfavorable y se enriqueció en el subtipo molecular CMS4, lo que se correlaciona con un subgrupo de supervivencia desfavorable de pacientes con CaCR (Guinney et al. Nat. Med. 21(11):1350-1356, 2015). Véanse las **figs. 6A, 7A y 7B**.

#### 5 V. Firmas de respuesta de TGF- $\beta$ en macrófagos y linfocitos T (TBRS en M y linfocitos T)

Las TBRS específicas de macrófagos y linfocitos T se adoptaron de Calon et al. Nat. Genet. 47:320-329, 2015; 1178 y 69 genes, respectivamente. Las puntuaciones de firma se calcularon (1) derivando el primer componente principal (PC1) de los genes de firma en los datos de RNAseq de EMT6, (2) obteniendo los genes de firma que  
10 tienen al menos una correlación de clasificación de Spearman de 0,8 con PC1, y (3) tomando el promedio de puntuaciones Z para los genes de la etapa (2). El filtrado en la etapa (2) dio como resultado 101 y 10 genes para M-TBRS y linfocitos T-TBRS, respectivamente.

#### 15 W. Análisis estadístico de la infiltración de linfocitos T

Las imágenes de campo claro se adquirieron por plataformas de barrido de portaobjetos automatizadas NanoZoomer de Hamamatsu con un aumento final de 200 $\times$ . Las imágenes se analizaron con la versión 2016b del paquete de programa informático MATLAB® (MathWorks). Se definieron las regiones de interés (RDI) por un anatomopatólogo. Las células marcadas con CD3+ que se encontraban dentro del borde de la RDI se identificaron  
20 por umbrales de intensidad y filtrado morfológico simple. Se evaluó la infiltración de células inmunitarias para cada portaobjetos (es decir, cada ratón) calculando la distancia media más cercana al borde de la RDI sobre todas las células marcadas con CD3+ dentro de la RDI en ese portaobjetos. A continuación, se normalizaron las distancias medias por portaobjetos dividiendo entre la distancia máxima desde el borde de la RDI hasta el centro de la RDI. A continuación, se agruparon las distancias medias normalizadas en los tres estudios (666, 1430, 1436) y se  
25 analizaron por regresión lineal con el grupo de tratamiento como una variable cualitativa fija y el área de la RDI y el número total de células CD3+ dentro de la RDI como covariables. Se informó de medias ajustadas por covariable e intervalos de confianza al 95 % para cada grupo de tratamiento. Se realizaron comparaciones por pares entre los grupos de tratamiento usando la prueba de diferencia significativa genuina (HSD) de Tukey. Todos los análisis se realizaron usando R, y los cálculos de distancia se realizaron usando el paquete 'spatstat' para R (Baddeley et al.  
30 Spatial Point Patterns: Methodology and Applications with R. Chapman y Hall/CRC Press, 2015).

#### **Ejemplo 1: la inmunidad tumoral preexistente se asocia con respuestas completas en tumores inflamados**

La mayoría de los tumores sólidos humanos parecen presentar uno de tres fenotipos inmunitarios distintos: el  
35 fenotipo de "inflamación inmunitaria", caracterizado por una fuerte infiltración de linfocitos T CD8+ y expresión de PD-L1; el fenotipo de "exclusión inmunitaria", en el que los linfocitos T se acumulan en el estroma rico en matriz extracelular, y el fenotipo de "desierto inmunitario", con una clara escasez de linfocitos infiltrantes dentro del tumor o el estroma circundante. Se cree que los tumores inflamados son más sensibles al bloqueo del punto de control en comparación con los fenotipos de exclusión inmunitaria o desierto inmunitario, que se predice que son débilmente  
40 sensibles o no sensibles. Sin embargo, esta asociación no se ha sometido a prueba sistemáticamente en el contexto de grandes ensayos clínicos o dentro de un único tipo de tumor. Para entender la respuesta al tratamiento con atezolizumab en CUM, se combinaron análisis moleculares e histológicos integrados con un enfoque de traducción inversa para someter a prueba los presentes hallazgos funcionalmente.

Para la investigación de la actividad clínica del bloqueo de PD-L1 con atezolizumab, se incluyeron 429 pacientes  
45 con CUM avanzado en un ensayo clínico de fase 2 de un solo grupo (IMvigor210; NCT02108652). La tasa de respuesta objetiva se evaluó por RECIST v1.1 y sirvió como criterio de valoración del ensayo. Los pacientes que lograron una respuesta completa (RC) o una respuesta parcial se clasificaron como pacientes que responden al tratamiento y se compararon con los pacientes que no responden al tratamiento, que presentaban una enfermedad estable (EE) o una enfermedad progresiva (EP). La evaluación de la asociación de la expresión de PD-L1 en las  
50 células inmunitarias (CI) infiltrantes de tumor en tumores de referencia con la respuesta (tasa de respuesta objetiva) fue un criterio de valoración coprincipal. El estado de CI con PD-L1 se definió por el porcentaje de células inmunitarias positivas para PD-L1 en el microambiente tumoral (TME): CI0 (< 1 %); CI1 ( $\geq$  1 % pero < 5 %) y CI2+ ( $\geq$  5 %).

Como se descubrió previamente en una cohorte más pequeña de pacientes, la expresión de PD-L1 en CI se asoció  
55 significativamente con la respuesta, y los tumores con alta expresión de PD-L1 (CI2+) presentaron la tasa de RC más alta (**fig. 1A**). Se observó un beneficio mejorado en la SG con atezolizumab en pacientes con altas puntuaciones de CI con PD-L1 (CI2/3) en comparación con pacientes con puntuaciones más bajas de CI con PD-L1 (CI0/1) (**fig. 8A**). Se realizó la secuenciación del ARN de transcriptoma completo en tejidos previos al  
60 tratamiento de 298 participantes de IMvigor210 para evaluar los rasgos característicos asociados con la respuesta a atezolizumab e identificar genes que tenían niveles de expresión asociados con la expresión de PD-L1 en CI (**fig. 1B**). Los genes inducibles por interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) están entre los más altamente correlacionados. Conjuntos de genes asociados con linfocitos T efectoros (Tef) CD8+ y moléculas de punto de control inmunitario (**tabla 10**), de los que muchos son genes estimulados por IFN- $\gamma$ , mostraron la expresión más diferencial (**figs. 1B y 1C**). El conjunto de genes de Tef CD8+ también se asoció significativamente con la respuesta, en particular con la RC (**fig.**

1D). Los cuartiles de la puntuación de Tef CD8+ se asociaron con la supervivencia global (fig. 1U). Esto sugiere que la expresión de PD-L1 en CI marca tejidos tumorales que tienen inmunidad de linfocitos T CD8+ y supresión inmunitaria adaptativa preexistentes, pero que todavía están preparados para responder al tratamiento anti-PD-L1.

5 **Tabla 10: conjuntos de genes usados para análisis de firma**

<b>Firma génica</b>	<b>Plataforma</b>	<b>Genes</b>	<b>Fuente</b>
<b>T efectores (Tef) CD8</b>	Identificación de perfiles de expresión génica	CD8A, CXCL10, CXCL9, GZMA, GZMB, IFNG, PRF1, TBX21	PMID: 26952546
<b>Reparación de daño en ADN</b>	Identificación de perfiles de expresión génica	ALKBH2, ALKBH3, APEX1, APEX2, APLF, ATM, ATR, ATRIP, BLM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CCNH, CDK7, CETN2, CHAF1A, CHEK1, CHEK2, CLK2, DCLRE1C, DDB1, DDB2, DUT, ENDOV, ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, ERCC8, FAN1, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCM, GTF2H1, GTF2H2, GTF2H3, GTF2H4, GTF2H5, H2AFX, HLT, HUS1, LIG1, LIG3, LIG4, MBD4, MDC1, MGMT, MLH1, MLH3, MMS19, MNAT1, MPG, MSH2, MSH3, MSH4, MSH5, MSH6, MUTYH, NEIL1, NEIL2, NEIL3, NHEJ1, NTHL1, NUDT1, OGG1, PALB2, PARP1, PARP2, PARP3, PCNA, PER1, PMS1, PMS2, PNKP, POLB, POLD1, POLE, POLG, POLH, POLL, POLM, POLO, PRKDC, RAD1, RAD17, RAD18, RAD23A, RAD23B, RAD51C, RAD9A, RECQL4, RECQL5, RIF1, RNF168, RNF4, RNF8, RPA1, RPA2, RPA3, RPA4, RRM2B, SETMAR, SHPRH, SMUG1, TDP1, TDP2, TOPBP1, TP53, TREX1, UBE2A, UBE2B, UBE2N, UBE2V2, UNG, UVSSA, WRN, XAB2, XPA, XPC, XRCC1, XRCC4, XRCC5, XRCC6	Lange et al. supra
<b>Gen TGF-<math>\beta</math> 2</b>	Identificación de perfiles de expresión génica	TGFB1, TGFB2	Asociación de gen único con la respuesta en este estudio.
<b>Pan-F-TBRS</b>	Identificación de perfiles de expresión génica	ACTA2, ACTG2, ADAM12, ADAM19, CNN1, COL4A1, CTGF, CTPS1, FAM101B, FSTL3, HSPB1, IGFBP3, PXDC1, SEMA7A, SH3PXD2A, TAGLN, TGFB1, TNS1, TPM1	Firma de respuesta de TGF- $\beta$ panfibroblástica determinada experimentalmente.
<b>Mecanismo de procesamiento de antígenos</b>	Identificación de perfiles de expresión génica	B2M, HLA-A, HLA-B, HLA-C, TAP1, TAP2	PMID: 27855702
<b>Punto de control inmunitario</b>	Identificación de perfiles de expresión génica	CD274, CTLA4, HAVCR2, LAG3, PDCD1, PDCD1LG2, TIGIT	
<b>TEM</b>	Identificación de perfiles de expresión génica	CLDN3, CLDN7, CLDN4, CDH1, VIM, TWIST1, ZEB1, ZEB2	PMID: 24520177
<b>MEC</b>	Identificación de perfiles de expresión génica	ACTA2, COL1A2, COL3A1, COL5A1, COL6A1, DCN, LAMA4, LUM, PDGFRB, TGFB3	PMID: 22553347



<b>Genes relacionados con FGFR3</b>	Identificación de perfiles de expresión génica	FGFR3, TP63, WNT7B	PMID: 22553347
<b>Histonas descubiertas por KEGG</b>	Identificación de perfiles de expresión génica	HIST1H2AG, HIST1H2AI, HIST1H2BL, HIST2H2BF	Este estudio.
<b>Angiogénesis</b>	Identificación de perfiles de expresión génica	CDH5, SOX17, SOX18, TEK	PMID: 22553347
<b>Anemia de Fanconi</b>	Identificación de perfiles de expresión génica	APITD1, ATR, ATRIP, BLM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, C17orf70, C19orf40, EME1, EME2, ERCC1, ERCC4, FAN1, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCL, FANCM, HES1, MLH1, MUS81, PALB2, PMS2, POLH, POLI, POLK, POLN, RAD51, RAD51C, REV1, REV3L, RMI1, RMI2, RPA1, RPA2, RPA3, RPA4, SLX4, STRA13, Telo2, TOP3A, TOP3B, UBE2T, USP1, WDR48	KEGG hsa03460
<b>Ciclo celular</b>	Identificación de perfiles de expresión génica	ABL1, ANAPC1, ANAPC10, ANAPC11, ANAPC13, ANAPC2, ANAPC4, ANAPC5, ANAPC7, ATM, ATR, BUB1, BUB1B, BUB3, CCNA1, CCNA2, CCNB1, CCNB2, CCNB3, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CCNE2, CCNH, CDC14A, CDC14B, CDC16, CDC20, CDC23, CDC25A, CDC25B, CDC25C, CDC26, CDC27, CDC45, CDC6, CDC7, CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, CDK7, CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C, CDKN2D, CHEK1, CHEK2, CREBBP, CUL1, DBF4, E2F1, E2F2, E2F3, E2F4, E2F5, EP300, ESPL1, FZR1, GADD45A, GADD45B, GADD45G, GSK3B, HDAC1, HDAC2, MAD1L1, MAD2L1, MAD2L2, MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6, MCM7, MDM2, MYC, ORC1, ORC2, ORC3, ORC4, ORC5, ORC6, PCNA, PKMYT1, PLK1, PRKDC, PTTG1, PTTG2, RAD21, RB1, RBL1, RBL2, RBX1, SFN, SKP1, SKP2, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMC1A, SMC1B, SMC3, STAG1, STAG2, TFDP1, TFDP2, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TP53, TTK, WEE1, YWHAB, YWHAE, YWHAG, YWHAH, YWHAQ, YWHAZ, ZBTB17	KEGG hsa4110
<b>Replicación del ADN</b>	Identificación de perfiles de expresión génica	DNA2, FEN1, LIG1, MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6, MCM7, PCNA, POLA1, POLA2, POLD1, POLD2, POLD3, POLD4, POLE, POLE2, POLE3, POLE4, PRIM1, PRIM2, RFC1, RFC2, RFC3, RFC4, RFC5, RNASEH1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, RPA1, RPA2, RPA3, RPA4, SSBP1	KEGG hsa3030
<b>Reparación por escisión nucleotídica</b>	Identificación de perfiles de expresión génica	CCNH, CDK7, CETN2, CUL4A, CUL4B, DDB1, DDB2, ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, ERCC8, GTF2H1, GTF2H2, GTF2H3, GTF2H4, GTF2H5, LIG1, MNAT1, PCNA, POLD1, POLD2, POLD3, POLD4, POLE, POLE2, POLE3, POLE4, RAD23A, RAD23B, RBX1, RFC1, RFC2, RFC3, RFC4, RFC5, RPA1, RPA2, RPA3, RPA4, XPA, XPC	KEGG hsa3420

<b>Recombinación homóloga</b>	Identificación de perfiles de expresión génica	BLM, BRCA2, EME1, MRE11A, MUS81, NBN, POLD1, POLD2, POLD3, POLD4, RAD50, RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RAD52, RAD54B, RAD54L, RPA1, RPA2, RPA3, RPA4, SHFM1, SSBP1, TOP3A, TOP3B, XRCC2, XRCC3	KEGG hsa3440
<b>Reparación de emparejamiento erróneo</b>	Identificación de perfiles de expresión génica	EXO1, LIG1, MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH6, PONA, PMS2, POLD1, POLD2, POLD3, POLD4, RFC1, RFC2, RFC3, RFC4, RFC5, RPA1, RPA2, RPA3, RPA4, SSBP1	KEGG hsa3430
<b>Reguladores del ciclo celular</b>	Identificación de perfiles de expresión génica y mutacionales	ATM, CCND1, CCNE1, CDKN1A, CDKN2A, E2F3, FBXW7, MDM2, RB1, TP53	PMID: 24476821
<b>Reparación de daño en ADN</b>	Identificación de perfiles mutacionales	ATM, ATR, BLM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CHEK1, CHEK2, ERCC4, FANCA, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCM, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NUDT1, PALB2, PARP1, PARP2, PARP3, PMS2, POLD1, POLE, PRKDC, RAD51C, RPA1, TP53	Lange et al. supra

**Ejemplo 2: la carga mutacional del tumor (CMT), impulsada por la proliferación, la expresión de APOBEC o las deficiencias en la reparación de daño en ADN, se asocia con la respuesta a atezolizumab**

5 El cáncer de vejiga, junto con el melanoma y el carcinoma de pulmón no microcítico, se caracteriza por tener una de las CMT somáticas más altas entre los cánceres humanos. La respuesta a atezolizumab se asoció significativamente con CMT en CUM, y esta asociación también fue significativa en el conjunto de datos completo de IMvigor210 (**fig. 1E**). La pertinencia de CMT es probablemente por medio de una posibilidad incrementada de neoantígenos inmunógenos y, consecuente con esto, la carga de neoantígenos tumorales (TNB) prevista también se asoció significativamente con la respuesta (**fig. 1F**). CMT y TNB también se asociaron con SG (**figs. 1V y 1W**). Por ejemplo, se observó un beneficio mejorado en la SG con atezolizumab en pacientes con alta CMT en relación con pacientes con baja CMT, usando la mediana de CMT como valor de corte (**fig. 8B**). También se observó una SG mejorada con atezolizumab en pacientes con tanto alta CMT como puntuaciones altas de CI con PD-L1 (**fig. 8C**).

15 A continuación, se evaluaron los correlatos transcripcionales y mutacionales de CMT en CUM. En primer lugar, se realizó un análisis diferencial de expresión génica, seguido de un análisis de enriquecimiento del conjunto de genes. Las vías más significativamente asociadas con CMT fueron aquellas implicadas en el ciclo celular, la replicación del ADN y el daño, detección y reparación del ADN (**fig. 1G, tabla 9**). Las firmas para estas vías se correlacionaron con MKI67 y, por tanto, con la proliferación (**fig. 1H**). En segundo lugar, se observó que los niveles de expresión para la enzima de edición de ARNm de apolipoproteína B, polipéptido catalítico 3A (APOBEC3A) y APOBEC3B, dos citidina desaminasas reguladas por incremento en el cáncer de vejiga y otros cánceres, se correlacionaron débil pero significativamente con CMT y la respuesta (**figs. 1I y 1J**). En tercer lugar, se examinaron las mutaciones de pérdida de función en miembros de la respuesta al daño en ADN (DDR) o, dada la pertinencia de la tasa de proliferación, los conjuntos de genes reguladores del ciclo celular para detectar su correlación con CMT. Los tumores con una o más mutaciones en el conjunto de genes de DDR mostraron tasas de respuesta y CMT significativamente mayores, tanto con como sin ("sin") inclusión de TP53 (**figs. 1K y 1L, tabla 11**). La **tabla 11** muestra que se sometieron a prueba conjuntos de genes de reparación del ADN (DDR) y regulación del ciclo celular para detectar su asociación con la respuesta (RC/RP frente a EE/EP) y CMT ("categoría"), con o sin inclusión de TP53. Se informan el número de pacientes con al menos una mutación en los genes que pertenecen a un conjunto de genes ("n mutante"), el tamaño del efecto ("estimación"), así como los valores de p nominales. La expresión de MKI67 y la puntuación de replicación del ADN también se asociaron con la respuesta a atezolizumab (**fig. 1Z**).

35 **Tabla 11: estado de mutación de las vías de reparación del ADN y regulación del ciclo celular y asociación con la respuesta y CMT**

Vía	n mutante	categoría	estimación	p
Regulación del ciclo celular	177	respuesta	0,47948	0,038621
Regulación del ciclo celular sin TP53	125	respuesta	0,735606	0,31104

DDR	145	respuesta	0,50265	0,0274968
DDR sin TP53	51	respuesta	0,426164	1,17E-02
Regulación del ciclo celular	214	CMT	-3,6	2,04E-06
Regulación del ciclo celular sin TP53	150	CMT	-0,91003	4,76E-02
Vía DDR	173	CMT	-3,59998	8,64E-07
Vía DDR sin TP53	60	CMT	-5,39995	1,84E-06

Los tumores con una o más mutaciones en el conjunto regulador del ciclo celular también presentaron tasas de respuesta y CMT significativamente mayores, aunque aquí la asociación con la respuesta se impulsó por TP53 (figs. 1M y 1N, tablas 11 y 12). Conjuntamente, estos resultados demuestran que múltiples factores, incluyendo la proliferación, la actividad APOBEC y los defectos en DDR o la regulación del ciclo celular, contribuyen a la CMT en el cáncer de vejiga, dando lugar a respuestas incrementadas al bloqueo de PD-L1. En la **tabla 12**, se dan símbolos y el número de pacientes mutantes para cada gen sometido a prueba. Se sometió a prueba la asociación con el estado de mutación tanto para detectar la respuesta (RC/RP frente a EE/EP) como la CMT ("categoría"). Se informan el tamaño del efecto ("estimación"), así como los valores de p nominales ("p") y ajustados ("p (aj.)"). Las dos últimas columnas indican si un gen dado es miembro del conjunto de genes de DDR y/o del regulador del ciclo celular ("RegCC").

**Tabla 12: estado de mutación de genes únicos y asociación con la respuesta y la CMT**

Gen	n mutante	categoría	estimación	p	p (aj.)	En DDR	En RegCC
ACVR1B	3	CMT	-0,900043	6,93E-01	0,900459333	FALSO	FALSO
ACVR1B	3	respuesta	Inf.	5,75E-01	1	FALSO	FALSO
AKT1	3	CMT	-1,79995	0,685694	0,900459333	FALSO	FALSO
AKT1	3	respuesta	0,667846	1	1	FALSO	FALSO
AKT2	2	CMT	-7,20994	0,166424	0,453154506	FALSO	FALSO
AKT2	2	respuesta	0,333324	0,439745	1	FALSO	FALSO
AKT3	2	CMT	-0,899936	0,886628	0,938081009	FALSO	FALSO
AKT3	2	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
APC	9	CMT	-2,70005	0,23619	0,550298351	FALSO	FALSO
APC	9	respuesta	0,660537	0,69521	1	FALSO	FALSO
ARAF	1	CMT	-18,0201	0,137297	0,437029887	FALSO	FALSO
ARAF	1	respuesta	0	0,250996	0,872612588	FALSO	FALSO
ARFRP1	1	CMT	0,899972	0,854389	0,92832651	FALSO	FALSO
ARFRP1	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
ARID1A	70	CMT	-4,50999	6,45E-07	0,000145851	FALSO	FALSO
ARID1A	62	respuesta	0,559204	0,0904854	0,872612588	FALSO	FALSO
ARID2	7	CMT	-14,41	0,00512586	0,150903898	FALSO	FALSO
ARID2	5	respuesta	0,496176	0,601863	1	FALSO	FALSO
ASXL1	5	CMT	-18,0199	0,0137686	0,207446907	FALSO	FALSO
ASXL1	5	respuesta	0,216728	0,10244	0,872612588	FALSO	FALSO
ATM	13	CMT	-4,50002	0,0350601	0,3433731	VERDADERO	VERDADERO
ATM	11	respuesta	0,261315	0,0317334	0,872612588	VERDADERO	VERDADERO
ATR	4	CMT	-13,51	0,00734488	0,150903898	VERDADERO	FALSO
ATR	3	respuesta	0,164576	0,156242	0,872612588	VERDADERO	FALSO

# ES 2 984 919 T3

ATRX	2	CMT	-15,3101	0,0395031	0,3433731	FALSO	FALSO
ATRX	2	respuesta	0,333324	0,439745	1	FALSO	FALSO
AURKA	1	CMT	0,899972	0,854389	0,92832651	FALSO	FALSO
AURKA	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
AXIN1	2	CMT	-8,11002	0,155164	0,445262375	FALSO	FALSO
AXIN1	2	respuesta	0,333324	0,439745	1	FALSO	FALSO
AXL	1	CMT	-27,03	0,113957	0,408798127	FALSO	FALSO
AXL	1	respuesta	0	0,250996	0,872612588	FALSO	FALSO
BACH1	1	CMT	-27,03	0,113957	0,408798127	FALSO	FALSO
BACH1	0	respuesta	0	1	1	FALSO	FALSO
BAP1	5	CMT	-0,900021	0,705022	0,905312341	FALSO	FALSO
BAP1	5	respuesta	1,34632	1	1	FALSO	FALSO
BARD1	1	CMT	-1,80005	0,731325	0,922679337	FALSO	FALSO
BARD1	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
BCL2L1	4	CMT	1,80993	0,34711	0,68131722	FALSO	FALSO
BCL2L1	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
BCL2L2	2	CMT	-1,80991	0,548746	0,843650313	FALSO	FALSO
BCL2L2	2	respuesta	0,333324	0,439745	1	FALSO	FALSO
BCOR	1	CMT	-25,22	0,119477	0,416119176	FALSO	FALSO
BCOR	1	respuesta	0	0,250996	0,872612588	FALSO	FALSO
BCORL1	3	CMT	-13,51	0,065011	0,408798127	FALSO	FALSO
BCORL1	3	respuesta	0,667846	1	1	FALSO	FALSO
BRAF	6	CMT	-2,11E-06	0,918449	0,956541355	FALSO	FALSO
BRAF	5	respuesta	0,216728	0,10244	0,872612588	FALSO	FALSO
BRCA1	6	CMT	-7,21004	0,111409	0,408798127	FALSO	FALSO
BRCA1	4	respuesta	0,329736	0,262556	0,872612588	FALSO	FALSO
BRCA2	10	CMT	-2,71	0,162778	0,452443732	VERDAD ERO	FALSO
BRCA2	9	respuesta	0,660537	0,69521	1	VERDAD ERO	FALSO
BRD4	1	CMT	-27,93	0,107343	0,408798127	FALSO	FALSO
BRD4	0	respuesta	0	1	1	FALSO	FALSO
BRIP1	3	CMT	0,900061	0,736787	0,922679337	VERDAD ERO	FALSO
BRIP1	2	respuesta	0,333324	0,439745	1	VERDAD ERO	FALSO
CASP8	2	CMT	-21,6199	0,0254157	0,294538267	FALSO	FALSO
CASP8	1	respuesta	0	0,250996	0,872612588	FALSO	FALSO
CCND1	32	CMT	2,35E-05	0,824791	0,92832651	FALSO	VERDAD ERO
CCND1	26	respuesta	1,13041	1	1	FALSO	VERDAD ERO
CCND2	1	CMT	4,50997	0,222643	0,529786821	FALSO	FALSO
CCND2	0	respuesta	0	1	1	FALSO	FALSO
CCND3	5	CMT	0,900012	0,73896	0,922679337	FALSO	FALSO
CCND3	5	respuesta	1,34632	1	1	FALSO	FALSO
CCNE1	12	CMT	0,909984	0,417896	0,75467319	FALSO	VERDAD ERO
CCNE1	8	respuesta	0,322416	0,111683	0,872612588	FALSO	VERDAD ERO

# ES 2 984 919 T3

CD274	4	CMT	-0,234732	0,888785	0,938081009	FALSO	FALSO
CD274	2	respuesta	0,333324	0,439745	1	FALSO	FALSO
CDC73	1	CMT	-2,35E-05	0,962226	0,968688231	FALSO	FALSO
CDC73	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
CDH1	6	CMT	-29,7301	0,00360566	0,135813193	FALSO	FALSO
CDH1	3	respuesta	0,667846	1	1	FALSO	FALSO
CDH2	1	CMT	-27,03	0,113957	0,408798127	FALSO	FALSO
CDH2	0	respuesta	0	1	1	FALSO	FALSO
CDK4	2	CMT	-3,59996	0,413533	0,753697242	FALSO	FALSO
CDK4	2	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
CDK6	5	CMT	-0,900046	0,808321	0,92832651	FALSO	FALSO
CDK6	4	respuesta	Inf.	0,574746	1	FALSO	FALSO
CDK8	2	CMT	-3,77E-06	1	1	FALSO	FALSO
CDK8	1	respuesta	0	0,250996	0,872612588	FALSO	FALSO
CDKN1B	6	CMT	-3,60991	0,338032	0,68131722	FALSO	FALSO
CDKN1B	5	respuesta	1,34632	1	1	FALSO	FALSO
CDKN2A	54	CMT	-0,899978	0,343403	0,68131722	FALSO	VERDAD ERO
CDKN2A	44	respuesta	1,9556	0,130946	0,872612588	FALSO	VERDAD ERO
CDKN2B	41	CMT	-6,38E-05	0,795052	0,92832651	FALSO	FALSO
CDKN2B	34	respuesta	2,11029	0,200236	0,872612588	FALSO	FALSO
CEBPA	2	CMT	-13,51	0,0482635	0,39863575	FALSO	FALSO
CEBPA	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
CHD2	2	CMT	-13,51	0,0626281	0,408798127	FALSO	FALSO
CHD2	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
CHD4	1	CMT	-7,21006	0,300198	0,646140457	FALSO	FALSO
CHD4	1	respuesta	0	0,250996	0,872612588	FALSO	FALSO
CHEK2	3	CMT	-1,79997	0,510214	0,81554169	VERDAD ERO	FALSO
CHEK2	3	respuesta	Inf.	0,574746	1	VERDAD ERO	FALSO
CREBBP	30	CMT	-7,21	2,35E-05	0,002656438	FALSO	FALSO
CREBBP	27	respuesta	0,441408	0,0598306	0,872612588	FALSO	FALSO
CRKL	2	CMT	3,60996	0,157615	0,445262375	FALSO	FALSO
CRKL	2	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
CTCF	2	CMT	-20,7201	0,0265376	0,294538267	FALSO	FALSO
CTCF	2	respuesta	0,333324	0,439745	1	FALSO	FALSO
CTNNB1	8	CMT	-1,79998	0,612614	0,872346467	FALSO	FALSO
CTNNB1	7	respuesta	0,436474	0,37208	1	FALSO	FALSO
CUL3	2	CMT	1,79994	0,74361	0,923383846	FALSO	FALSO
CUL3	2	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
CYLD	1	CMT	-27,03	0,113957	0,408798127	FALSO	FALSO
CYLD	1	respuesta	0	0,250996	0,872612588	FALSO	FALSO
DAXX	1	CMT	-27,93	0,107343	0,408798127	FALSO	FALSO
DAXX	1	respuesta	0	0,250996	0,872612588	FALSO	FALSO
DICER1	3	CMT	-5,40006	0,21188	0,529786821	FALSO	FALSO
DICER1	3	respuesta	0,667846	1	1	FALSO	FALSO
DNMT3A	8	CMT	-1,79996	0,630572	0,872346467	FALSO	FALSO

# ES 2 984 919 T3

DNMT3A	6	respuesta	0,664231	0,642647	1	FALSO	FALSO
EGFR	11	CMT	0,900018	0,619994	0,872346467	FALSO	FALSO
EGFR	10	respuesta	3,10714	0,458956	1	FALSO	FALSO
EMSY	1	CMT	1,79997	0,644251	0,872346467	FALSO	FALSO
EMSY	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
EP300	16	CMT	-2,70004	0,154497	0,445262375	FALSO	FALSO
EP300	11	respuesta	0,889329	1	1	FALSO	FALSO
EPHA3	1	CMT	2,69992	0,462896	0,798583939	FALSO	FALSO
EPHA3	1	respuesta	0	0,250996	0,872612588	FALSO	FALSO
EPHA6	2	CMT	-1,80005	0,785188	0,92832651	FALSO	FALSO
EPHA6	1	respuesta	0	0,250996	0,872612588	FALSO	FALSO
EPHA7	1	CMT	-23,42	0,125204	0,416119176	FALSO	FALSO
EPHA7	0	respuesta	0	1	1	FALSO	FALSO
EPHB1	2	CMT	0,90002	0,64461	0,872346467	FALSO	FALSO
EPHB1	2	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
ERBB2	31	CMT	-2,7	0,0624137	0,408798127	FALSO	FALSO
ERBB2	28	respuesta	0,819104	0,647802	1	FALSO	FALSO
ERBB3	18	CMT	-1,80996	0,222186	0,529786821	FALSO	FALSO
ERBB3	16	respuesta	0,403958	0,130846	0,872612588	FALSO	FALSO
ERBB4	3	CMT	-8,10995	0,0665214	0,408798127	FALSO	FALSO
ERBB4	2	respuesta	0,333324	0,439745	1	FALSO	FALSO
ERRFI1	1	CMT	-40,54	0,0915622	0,408798127	FALSO	FALSO
ERRFI1	1	respuesta	0	0,250996	0,872612588	FALSO	FALSO
EZH2	1	CMT	-13,51	0,1571	0,445262375	FALSO	FALSO
EZH2	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
FAM123B	1	CMT	-18,0201	0,137297	0,437029887	FALSO	FALSO
FAM123B	1	respuesta	0	0,250996	0,872612588	FALSO	FALSO
FANCA	1	CMT	-29,73	0,0998104	0,408798127	VERDAD ERO	FALSO
FANCA	1	respuesta	0	0,250996	0,872612588	VERDAD ERO	FALSO
FANCC	1	CMT	3,60996	0,319946	0,668246752	VERDAD ERO	FALSO
FANCC	1	respuesta	Inf.	1	1	VERDAD ERO	FALSO
FANCD2	1	CMT	-13,51	0,1571	0,445262375	VERDAD ERO	FALSO
FANCD2	1	respuesta	Inf.	1	1	VERDAD ERO	FALSO
FANCI	1	CMT	-6,30005	0,355732	0,68131722	FALSO	FALSO
FANCI	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
FAS	2	CMT	-10,81	0,0720309	0,408798127	FALSO	FALSO
FAS	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
FAT1	11	CMT	-0,900028	0,602166	0,872346467	FALSO	FALSO
FAT1	9	respuesta	0,404735	0,234402	0,872612588	FALSO	FALSO
FBXW7	13	CMT	-12,61	0,000827519	0,046754824	FALSO	VERDAD ERO
FBXW7	12	respuesta	0,220239	0,0125031	0,86158545	FALSO	VERDAD ERO
FGF10	17	CMT	-6,77E-05	0,872111	0,938081009	FALSO	FALSO
FGF10	12	respuesta	0,450284	0,182862	0,872612588	FALSO	FALSO

# ES 2 984 919 T3

FGF14	3	CMT	-3,59994	0,501442	0,81554169	FALSO	FALSO
FGF14	3	respuesta	0,164576	0,156242	0,872612588	FALSO	FALSO
FGF19	20	CMT	0,89991	0,670271	0,894242118	FALSO	FALSO
FGF19	16	respuesta	1,48364	0,767315	1	FALSO	FALSO
FGF23	1	CMT	4,50997	0,222643	0,529786821	FALSO	FALSO
FGF23	0	respuesta	0	1	1	FALSO	FALSO
FGF3	22	CMT	0,900045	0,471973	0,802974602	FALSO	FALSO
FGF3	18	respuesta	1,18599	1	1	FALSO	FALSO
FGF4	13	CMT	1,80002	0,256311	0,585114	FALSO	FALSO
FGF4	10	respuesta	3,10714	0,458956	1	FALSO	FALSO
FGF6	2	CMT	4,51001	0,0638199	0,408798127	FALSO	FALSO
FGF6	0	respuesta	0	1	1	FALSO	FALSO
FGFR1	7	CMT	-2,69998	0,311112	0,663314264	FALSO	FALSO
FGFR1	7	respuesta	0,126038	0,0119594	0,86158545	FALSO	FALSO
FGFR2	3	CMT	-0,899953	0,797003	0,92832651	FALSO	FALSO
FGFR2	3	respuesta	0,667846	1	1	FALSO	FALSO
FGFR3	56	CMT	-5,97E-05	0,84819	0,92832651	FALSO	FALSO
FGFR3	50	respuesta	0,829608	0,588823	1	FALSO	FALSO
FLCN	3	CMT	-1,80006	0,458804	0,798583939	FALSO	FALSO
FLCN	3	respuesta	0,667846	1	1	FALSO	FALSO
FLT3	1	CMT	1,79997	0,644251	0,872346467	FALSO	FALSO
FLT3	0	respuesta	0	1	1	FALSO	FALSO
F0XP1	7	CMT	1,79994	0,395267	0,732215918	FALSO	FALSO
F0XP1	7	respuesta	2,03921	0,683488	1	FALSO	FALSO
FRS2	23	CMT	-0,899976	0,639385	0,872346467	FALSO	FALSO
FRS2	19	respuesta	0,42895	0,0970036	0,872612588	FALSO	FALSO
FUBP1	2	CMT	3,6	0,504942	0,81554169	FALSO	FALSO
FUBP1	2	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
GATA1	1	CMT	1,79997	0,644251	0,872346467	FALSO	FALSO
GATA1	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
GATA2	1	CMT	-3,60E+00	0,561803	0,852130725	FALSO	FALSO
GATA2	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
GATA3	3	CMT	1,80E+00	0,597378	0,872346467	FALSO	FALSO
GATA3	3	respuesta	0,667846	1	1	FALSO	FALSO
GATA4	1	CMT	2,69992	0,462896	0,798583939	FALSO	FALSO
GATA4	1	respuesta	0.00E+00	0,250996	0,872612588	FALSO	FALSO
GATA6	3	CMT	1,80001	0,51242	0,81554169	FALSO	FALSO
GATA6	2	respuesta	0,333324	0,439745	1	FALSO	FALSO
GNA13	3	CMT	-3,59998	0,525757	0,825146403	FALSO	FALSO
GNA13	2	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
GNAS	6	CMT	1,80005	0,322296	0,668246752	FALSO	FALSO
GNAS	6	respuesta	0,32612	0,168613	0,872612588	FALSO	FALSO
GPR124	1	CMT	0,899972	0,854389	0,92832651	FALSO	FALSO
GPR124	0	respuesta	0.00E+00	1	1	FALSO	FALSO
GRIN2A	1	CMT	0,899972	0,854389	0,92832651	FALSO	FALSO
GRIN2A	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
HGF	1	CMT	-42,34	0,089309	0,408798127	FALSO	FALSO

# ES 2 984 919 T3

HGF	0	respuesta	0	1	1	FALSO	FALSO
HNF1A	2	CMT	-18,02	0,0335033	0,3433731	FALSO	FALSO
HNF1A	2	respuesta	0,333324	0,439745	1	FALSO	FALSO
HRAS	12	CMT	0,899988	0,62817	0,872346467	FALSO	FALSO
HRAS	11	respuesta	1.53E+00	0,735541	1	FALSO	FALSO
IGF1	2	CMT	-5,39992	0,284939	0,631335431	FALSO	FALSO
IGF1	2	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
IGF2R	1	CMT	-27,03	0,113957	0,408798127	FALSO	FALSO
IGF2R	1	respuesta	0	0,250996	0,872612588	FALSO	FALSO
IKBKE	1	CMT	2,70E+00	0,462896	0,798583939	FALSO	FALSO
IKBKE	0	respuesta	0	1	1	FALSO	FALSO
INPP4B	1	CMT	-5,05E+01	0,0871006	0,408798127	FALSO	FALSO
INPP4B	1	respuesta	0.00E+00	0,250996	0,872612588	FALSO	FALSO
IRS2	5	CMT	-2,70008	0,367558	0,698051328	FALSO	FALSO
IRS2	5	respuesta	4,96E-01	0,601863	1	FALSO	FALSO
JAK1	2	CMT	-2,43E+01	0,0232944	0,292474133	FALSO	FALSO
JAK1	2	respuesta	0.00E+00	0,062247	0,872612588	FALSO	FALSO
JAK2	3	CMT	1.81E+00	0,519066	0,82034207	FALSO	FALSO
JAK2	2	respuesta	3,33E-01	0,439745	1	FALSO	FALSO
JUN	1	CMT	-6,30E+00	0,355732	0,68131722	FALSO	FALSO
JUN	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
KDM5A	1	CMT	7.21E+00	0,0998104	0,408798127	FALSO	FALSO
KDM5A	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
KDM5C	4	CMT	-6,30E+00	0,260724	0,586228337	FALSO	FALSO
KDM5C	4	respuesta	3,30E-01	0,262556	0,872612588	FALSO	FALSO
KDM6A	55	CMT	-1,8	0,121569	0,416119176	FALSO	FALSO
KDM6A	47	respuesta	0,515273	0,0624163	0,872612588	FALSO	FALSO
KDR	2	CMT	0,899949	0,896573	0,938081009	FALSO	FALSO
KDR	1	respuesta	0	0,250996	0,872612588	FALSO	FALSO
KEAP1	1	CMT	-27,03	0,113957	0,408798127	FALSO	FALSO
KEAP1	1	respuesta	0	0,250996	0,872612588	FALSO	FALSO
KEL	2	CMT	-11,7101	0,088666	0,408798127	FALSO	FALSO
KEL	1	respuesta	0	0,250996	0,872612588	FALSO	FALSO
KIT	3	CMT	3,51E-06	0,939854	0,961117665	FALSO	FALSO
KIT	2	respuesta	0,333324	0,439745	1	FALSO	FALSO
KRAS	6	CMT	0,900048	0,571685	0,861338733	FALSO	FALSO
KRAS	5	respuesta	1,34632	1	1	FALSO	FALSO
LRP1B	10	CMT	-9,01002	0,00902982	0,17006161	FALSO	FALSO
LRP1B	9	respuesta	0,155516	0,00896804	0,86158545	FALSO	FALSO
LRP6	1	CMT	-27,03	0,113957	0,408798127	FALSO	FALSO
LRP6	1	respuesta	0	0,250996	0,872612588	FALSO	FALSO
LYN	4	CMT	-5,79284	0,261987	0,586228337	FALSO	FALSO
LYN	4	respuesta	Inf.	0,574746	1	FALSO	FALSO
LZTR1	1	CMT	-18,0201	0,137297	0,437029887	FALSO	FALSO
LZTR1	1	respuesta	0	0,250996	0,872612588	FALSO	FALSO
MAGI2	2	CMT	-0,899977	0,811092	0,92832651	FALSO	FALSO
MAGI2	2	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO



ES 2 984 919 T3

MAP2K4	1	CMT	-12,61	0,171459	0,45461214	FALSO	FALSO
MAP2K4	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
MAP3K1	2	CMT	-9,91004	0,0878833	0,408798127	FALSO	FALSO
MAP3K1	2	respuesta	0,333324	0,439745	1	FALSO	FALSO
MAP3K13	1	CMT	-12,61	0,171459	0,45461214	FALSO	FALSO
MAP3K13	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
MCL1	8	CMT	-4,49997	0,106906	0,408798127	FALSO	FALSO
MCL1	7	respuesta	0,833937	1	1	FALSO	FALSO
MDM2	25	CMT	-0,89997	0,54233	0,843650313	FALSO	VERDADE RO
MDM2	20	respuesta	0,470372	0,114587	0,872612588	FALSO	VERDADE RO
MDM4	1	CMT	-6,30005	0,355732	0,68131722	FALSO	FALSO
MDM4	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
MEN1	3	CMT	-1,80996	0,546091	0,843650313	FALSO	FALSO
MEN1	2	respuesta	0	0,062247	0,872612588	FALSO	FALSO
CUMPLID O	2	CMT	-1,80003	0,830658	0,92832651	FALSO	FALSO
CUMPLID O	0	respuesta	0	1	1	FALSO	FALSO
MITF	1	CMT	4,50997	0,222643	0,529786821	FALSO	FALSO
MITF	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
MLL2	63	CMT	-0,899944	0,501383	0,81554169	FALSO	FALSO
MLL2	53	respuesta	1,18463	0,723338	1	FALSO	FALSO
MLL3	4	CMT	-21,6299	0,00550322	0,150903898	FALSO	FALSO
MLL3	3	respuesta	0	0,0152493	0,86158545	FALSO	FALSO
MPL	1	CMT	-5,40005	0,420747	0,75467319	FALSO	FALSO
MPL	1	respuesta	0	0,250996	0,872612588	FALSO	FALSO
MSH2	4	CMT	-25,2199	0,00171259	0,077409068	VERDAD ERO	FALSO
MSH2	3	respuesta	0,667846	1	1	VERDAD ERO	FALSO
MSH6	6	CMT	-0,899991	0,720075	0,914252528	VERDAD ERO	FALSO
MSH6	5	respuesta	1,34632	1	1	VERDAD ERO	FALSO
MST1R	1	CMT	0,899972	0,854389	0,92832651	FALSO	FALSO
MST1R	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
MTOR	3	CMT	-4,51002	0,183279	0,475640114	FALSO	FALSO
MTOR	2	respuesta	0,333324	0,439745	1	FALSO	FALSO
MUTYH	3	CMT	-2,69997	0,460887	0,798583939	VERDAD ERO	FALSO
MUTYH	3	respuesta	0,667846	1	1	VERDAD ERO	FALSO
MYC	13	CMT	-1,07E-05	0,894618	0,938081009	FALSO	FALSO
MYC	10	respuesta	1,354	1	1	FALSO	FALSO
MYCL1	9	CMT	-1,8	0,472547	0,802974602	FALSO	FALSO
MYCL1	9	respuesta	0,660537	0,69521	1	FALSO	FALSO
MYCN	5	CMT	-9,90994	0,0702785	0,408798127	FALSO	FALSO
MYCN	5	respuesta	0,216728	0,10244	0,872612588	FALSO	FALSO
MYST3	7	CMT	-3,59996	0,185205	0,475640114	FALSO	FALSO
MYST3	6	respuesta	0,664231	0,642647	1	FALSO	FALSO

# ES 2 984 919 T3

NBN	1	CMT	-23,42	0,125204	0,416119176	FALSO	FALSO
NBN	1	respuesta	0	0,250996	0,872612588	FALSO	FALSO
NCOR1	10	CMT	-7,20992	0,0119391	0,192731186	FALSO	FALSO
NCOR1	9	respuesta	1,17881	1	1	FALSO	FALSO
NF1	6	CMT	-5,39999	0,0883754	0,408798127	FALSO	FALSO
NF1	5	respuesta	0,496176	0,601863	1	FALSO	FALSO
NF2	6	CMT	-0,900005	0,71461	0,912439887	FALSO	FALSO
NF2	4	respuesta	0,329736	0,262556	0,872612588	FALSO	FALSO
NFE2L2	2	CMT	1,80004	0,394637	0,732215918	FALSO	FALSO
NFE2L2	2	respuesta	0,333324	0,439745	1	FALSO	FALSO
NFKBIA	2	CMT	0,90002	0,64461	0,872346467	FALSO	FALSO
NFKBIA	2	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
NKX2-1	6	CMT	0,899935	0,615534	0,872346467	FALSO	FALSO
NKX2-1	6	respuesta	Inf.	0,341617	1	FALSO	FALSO
NOTCH1	4	CMT	-1,79998	0,690117	0,900459333	FALSO	FALSO
NOTCH1	4	respuesta	1,00538	1	1	FALSO	FALSO
NOTCH2	4	CMT	3,16E-06	0,884086	0,938081009	FALSO	FALSO
NOTCH2	3	respuesta	0,667846	1	1	FALSO	FALSO
NOTCH3	2	CMT	1,79999	0,510315	0,81554169	FALSO	FALSO
N0TCH3	2	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
N0TCH4	5	CMT	-3,17E-05	0,934137	0,960632518	FALSO	FALSO
N0TCH4	3	respuesta	0,667846	1	1	FALSO	FALSO
NRAS	2	CMT	-13,52	0,059729	0,408798127	FALSO	FALSO
NRAS	2	respuesta	0	0,062247	0,872612588	FALSO	FALSO
NTRK1	1	CMT	-6,30005	0,355732	0,68131722	FALSO	FALSO
NTRK1	1	respuesta	0	0,250996	0,872612588	FALSO	FALSO
NTRK3	1	CMT	6,30992	0,125204	0,416119176	FALSO	FALSO
NTRK3	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
NUP93	4	CMT	-1,79997	0,67266	0,894242118	FALSO	FALSO
NUP93	3	respuesta	0,667846	1	1	FALSO	FALSO
PALB2	3	CMT	-1,80003	0,621392	0,872346467	VERDAD ERO	FALSO
PALB2	3	respuesta	0,667846	1	1	VERDAD ERO	FALSO
PARK2	1	CMT	-13,51	0,1571	0,445262375	FALSO	FALSO
PARK2	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
PARP4	1	CMT	5,40997	0,164161	0,452443732	FALSO	FALSO
PARP4	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
PAX5	3	CMT	-2,78E-05	0,92622	0,960209725	FALSO	FALSO
PAX5	2	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
PBRM1	5	CMT	-9,01005	0,222102	0,529786821	FALSO	FALSO
PBRM1	4	respuesta	0,108148	0,0499291	0,872612588	FALSO	FALSO
PDCD1LG 2	4	CMT	0,910011	0,701112	0,905312341	FALSO	FALSO
PDCD1LG 2	3	respuesta	0,667846	1	1	FALSO	FALSO
PDGFRA	2	CMT	0,899949	0,896573	0,938081009	FALSO	FALSO
PDGFRA	1	respuesta	0	0,250996	0,872612588	FALSO	FALSO
PIK3C2B	1	CMT	-6,30005	0,355732	0,68131722	FALSO	FALSO

# ES 2 984 919 T3

PIK3C2B	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
PIK3CA	45	CMT	-0,900037	0,297028	0,646140457	FALSO	FALSO
PIK3CA	38	respuesta	0,793515	0,547066	1	FALSO	FALSO
PIK3CB	1	CMT	0,899972	0,854389	0,92832651	FALSO	FALSO
PIK3CB	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
PIK3CG	1	CMT	-42,34	0,089309	0,408798127	FALSO	FALSO
PIK3CG	0	respuesta	0	1	1	FALSO	FALSO
PIK3R1	4	CMT	-7,92E-05	0,964402	0,968688231	FALSO	FALSO
PIK3R1	4	respuesta	0,329736	0,262556	0,872612588	FALSO	FALSO
PIK3R2	1	CMT	-4,50006	0,484823	0,81554169	FALSO	FALSO
PIK3R2	0	respuesta	0	1	1	FALSO	FALSO
PMS2	2	CMT	-28,83	0,0208602	0,292474133	VERDAD ERO	FALSO
PMS2	1	respuesta	0	0,250996	0,872612588	VERDAD ERO	FALSO
POLE	1	CMT	-27,03	0,113957	0,408798127	VERDAD ERO	FALSO
POLE	1	respuesta	0	0,250996	0,872612588	VERDAD ERO	FALSO
PRKCI	4	CMT	4,80E-05	0,872354	0,938081009	FALSO	FALSO
PRKCI	3	respuesta	0,667846	1	1	FALSO	FALSO
PRSS8	1	CMT	-9,91006	0,229453	0,540170604	FALSO	FALSO
PRSS8	1	respuesta	0	0,250996	0,872612588	FALSO	FALSO
PTCH2	1	CMT	-29,73	0,0998104	0,408798127	FALSO	FALSO
PTCH2	1	respuesta	0	0,250996	0,872612588	FALSO	FALSO
PTEN	11	CMT	-1,81007	0,404451	0,74313761	FALSO	FALSO
PTEN	8	respuesta	0,322416	0,111683	0,872612588	FALSO	FALSO
PTPN11	1	CMT	-3,60006	0,561803	0,852130725	FALSO	FALSO
PTPN11	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
PTPRD	3	CMT	0,899972	0,791712	0,92832651	FALSO	FALSO
PTPRD	2	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
RAD50	3	CMT	-7,21005	0,0779225	0,408798127	FALSO	FALSO
RAD50	3	respuesta	Inf.	0,574746	1	FALSO	FALSO
RAD51	1	CMT	-2,35E-05	0,962226	0,968688231	FALSO	FALSO
RAD51	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
RAD51C	2	CMT	-1,81006	0,656689	0,88340306	VERDAD ERO	FALSO
RAD51C	1	respuesta	0	0,250996	0,872612588	VERDAD ERO	FALSO
RAF1	16	CMT	0,900031	0,388914	0,732215918	FALSO	FALSO
RAF1	14	respuesta	0,584639	0,349916	1	FALSO	FALSO
RB1	44	CMT	-1,80008	0,108637	0,408798127	FALSO	VERDAD ERO
RB1	38	respuesta	0,683208	0,316049	1	FALSO	VERDAD ERO
RBM10	12	CMT	-4,50005	0,038652	0,3433731	FALSO	FALSO
RBM10	10	respuesta	0,774318	0,715047	1	FALSO	FALSO
REL	2	CMT	-17,12	0,0379235	0,3433731	FALSO	FALSO
REL	2	respuesta	0	0,062247	0,872612588	FALSO	FALSO
RICTOR	22	CMT	2,81E-05	0,830895	0,92832651	FALSO	FALSO
RICTOR	16	respuesta	0,535247	0,242047	0,872612588	FALSO	FALSO

# ES 2 984 919 T3

RNF43	2	CMT	-27,93	0,0220481	0,292474133	FALSO	FALSO
RNF43	2	respuesta	0	0,062247	0,872612588	FALSO	FALSO
ROS1	2	CMT	-1,80997	0,687275	0,900459333	FALSO	FALSO
ROS1	2	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
RPA1	1	CMT	0,899972	0,854389	0,92832651	VERDAD ERO	FALSO
RPA1	1	respuesta	Inf.	1	1	VERDAD ERO	FALSO
RPTOR	1	CMT	-13,51	0,1571	0,445262375	FALSO	FALSO
RPTOR	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
RUNX1	2	CMT	-7,20997	0,139933	0,439234139	FALSO	FALSO
RUNX1	2	respuesta	0,333324	0,439745	1	FALSO	FALSO
SDHA	1	CMT	-7,21006	0,300198	0,646140457	FALSO	FALSO
SDHA	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
SETD2	6	CMT	-6,30994	0,0273686	0,294538267	FALSO	FALSO
SETD2	6	respuesta	1,69097	1	1	FALSO	FALSO
SF3B1	7	CMT	1,87E-05	0,935129	0,960632518	FALSO	FALSO
SF3B1	3	respuesta	0,164576	0,156242	0,872612588	FALSO	FALSO
SLIT2	4	CMT	1,80005	0,610903	0,872346467	FALSO	FALSO
SLIT2	3	respuesta	Inf.	0,574746	1	FALSO	FALSO
SMAD2	1	CMT	-36,03	0,0950275	0,408798127	FALSO	FALSO
SMAD2	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
SMAD3	1	CMT	-2,35E-05	0,962226	0,968688231	FALSO	FALSO
SMAD3	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
SMAD4	3	CMT	4,50999	0,0493885	0,39863575	FALSO	FALSO
SMAD4	2	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
SMARCA 4	9	CMT	-3,61005	0,172994	0,45461214	FALSO	FALSO
SMARCA 4	8	respuesta	0,547957	0,418026	1	FALSO	FALSO
SOX10	1	CMT	-2,70008	0,640011	0,872346467	FALSO	FALSO
SOX10	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
S0X2	1	CMT	3,60996	0,319946	0,668246752	FALSO	FALSO
S0X2	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
S0X9	3	CMT	-1,80001	0,49275	0,81554169	FALSO	FALSO
S0X9	3	respuesta	Inf.	0,574746	1	FALSO	FALSO
SPEN	4	CMT	-7,20994	0,0704492	0,408798127	FALSO	FALSO
SPEN	2	respuesta	0,333324	0,439745	1	FALSO	FALSO
SPTA1	5	CMT	-0,900026	0,806257	0,92832651	FALSO	FALSO
SPTA1	5	respuesta	Inf.	0,335003	1	FALSO	FALSO
SRC	1	CMT	0,899972	0,854389	0,92832651	FALSO	FALSO
SRC	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
STAG2	21	CMT	-2,69996	0,222698	0,529786821	FALSO	FALSO
STAG2	17	respuesta	0,591772	0,383584	1	FALSO	FALSO
STAT4	2	CMT	-0,899977	0,811092	0,92832651	FALSO	FALSO
STAT4	2	respuesta	0,333324	0,439745	1	FALSO	FALSO
STK11	2	CMT	0,899989	0,772323	0,92832651	FALSO	FALSO
STK11	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
TBX3	3	CMT	-7,21003	0,0706912	0,408798127	FALSO	FALSO

TBX3	2	respuesta	0	0,062247	0,872612588	FALSO	FALSO
TERT	186	CMT	-1,80005	0,00617139	0,150903898	FALSO	FALSO
TERT	159	respuesta	0,991699	1	1	FALSO	FALSO
TET2	5	CMT	-11,71	0,0113234	0,192731186	FALSO	FALSO
TET2	3	respuesta	0,667846	1	1	FALSO	FALSO
TNFRSF14	1	CMT	0,899972	0,854389	0,92832651	FALSO	FALSO
TNFRSF14	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
TNKS	2	CMT	1,79999	0,629643	0,872346467	FALSO	FALSO
TNKS	2	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
TOP1	1	CMT	0,899972	0,854389	0,92832651	FALSO	FALSO
TOP1	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
TOP2A	3	CMT	-22,52	0,00709567	0,150903898	FALSO	FALSO
TOP2A	3	respuesta	0,667846	1	1	FALSO	FALSO
TP53	145	CMT	-2,70001	0,000173155	0,013044343	VERDADERO	VERDADERO
TP53	120	respuesta	0,720106	0,307979	1	VERDADERO	VERDADERO
TRRAP	1	CMT	-13,51	0,1571	0,445262375	FALSO	FALSO
TRRAP	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
TSC1	19	CMT	3,68E-06	0,82796	0,92832651	FALSO	FALSO
TSC1	19	respuesta	1,27769	0,789154	1	FALSO	FALSO
TSC2	1	CMT	0,899972	0,854389	0,92832651	FALSO	FALSO
TSC2	1	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
VEGFA	2	CMT	1,81002	0,504942	0,81554169	FALSO	FALSO
VEGFA	2	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
WT1	2	CMT	-6,30991	0,254046	0,585114	FALSO	FALSO
WT1	1	respuesta	0	0,250996	0,872612588	FALSO	FALSO
ZNF217	2	CMT	0,89999	0,791643	0,92832651	FALSO	FALSO
ZNF217	2	respuesta	Inf.	1	1	FALSO	FALSO
ZNF703	17	CMT	-0,900011	0,354452	0,68131722	FALSO	FALSO
ZNF703	16	respuesta	0,535247	0,242047	0,872612588	FALSO	FALSO

### Ejemplo 3: el eje TGF- $\beta$ se asocia con el escape inmunitario principal

- 5 Seguidamente, se intentó identificar cualquier rasgo característico adicional más allá de la inmunidad de los linfocitos T CD8+ y CMT que se asociaba con la respuesta. Consecuente con una relación positiva entre la proliferación y la CMT, los conjuntos de genes asociados con la replicación del ADN, el ciclo celular y las histonas se enriquecieron significativamente en los pacientes que responden al tratamiento (**fig. 10, tabla 8**). El análisis de enriquecimiento del conjunto de genes también identificó el conjunto de genes de citocina-receptor de citocina como el único rasgo característico asociado con la falta de respuesta (**fig. 10, tabla 8**). Es importante destacar que
- 10 los genes asociados más significativamente dentro de esta vía fueron IFNGR1 y los genes implicados en la vía de señalización de TGF- $\beta$ , incluyendo TGFB1, ACVR1 y TGFBR2. Si bien es conocido que el IFN- $\gamma$  tiene efectos favorables sobre la inmunidad antitumoral, esta citocina también está emergiendo como un factor clave en la resistencia principal al tratamiento de punto de control y al escape inmunitario adquirido. En la presente gran cohorte de pacientes con CUM, se observó una expresión significativamente potenciada de IFN- $\gamma$  en los pacientes
- 15 que responden al tratamiento, mientras que la expresión de IFNGR1 se enriqueció en los pacientes que no responden al tratamiento. Esto está en consonancia con estudios recientes que sugieren que la señalización de IFN- $\gamma$  promueve la expresión de múltiples ligandos inhibidores de linfocitos T e induce mecanismos epigenéticos que suprimen los linfocitos T.
- 20 TGF- $\beta$  es una citocina pleótrópica asociada con un pronóstico desfavorable en múltiples tipos de tumor. En general, se cree que la señalización de TGF- $\beta$  desempeña un papel prooncológico en los cánceres avanzados al promover la inmunosupresión, la angiogénesis, la metástasis, la transición epitelio a mesenquimatoso (TEM), la activación de fibroblastos y la desmoplasia. En IMvigor210, una firma basada en los dos genes de la vía de TGF- $\beta$  con mayor puntuación compuesta por TGFB1 y TGFBR2 mostró una expresión media incrementada en pacientes que no

responden al tratamiento (**fig. 1P**). La expresión de TGFB1 se asoció con una respuesta objetiva desfavorable y, cuando se dividió por cuartiles, también se asoció con una SG reducida (**figs. 1X y 1Y**). Dado que la expresión elevada de TGF- $\beta$  podría indicar una función incrementada de linfocitos T reguladores, TEM y/o inmunosupresión asociada al estroma, es probable que desempeñe un papel significativo en la restricción de la respuesta a atezolizumab.

#### Ejemplo 4: tres vías centrales impulsan la respuesta y la resistencia al tratamiento anti-PD-L1

Conjuntamente, estos datos sugieren que la respuesta a la inhibición del punto de control en el cáncer de vejiga está dictada por la combinación de tres ejes biológicos centrales: la inmunidad de linfocitos T preexistente y la CMT se asocian positivamente con la respuesta a atezolizumab, mientras que la actividad de la vía de TGF- $\beta$  se asocia con la progresión de la enfermedad y la falta de respuesta (**fig. 1Q**).

Para entender mejor cómo se relacionan estas tres vías entre sí y para revelar su importancia relativa en la predicción de resultados, se realizó un análisis estadístico de modelos competitivos. Se usó la pseudo- $R^2$  de regresión logística como una medida de la "varianza explicada" en la respuesta global del paciente (es decir, el porcentaje de variación en la respuesta del paciente que se puede atribuir a los aportes biológicos) (véase, por ejemplo, Dobson et al. supra). Cuando se consideraron aportes únicos, la firma de Tef CD8+ explicó un 5 % de la variabilidad en la respuesta del paciente, mientras que la firma de TGF- $\beta$  de dos genes explicó un 16 % y la CMT explicó un 30 % (**fig. 1R**). Seguidamente, se preguntó si estos tres aportes biológicos son intercambiables o si contribuyen independientemente a predecir la respuesta. Un modelo que combina los tres ejes incrementó la varianza explicada en la respuesta del paciente a un 42 % y mejoró con respecto a cada modelo de un único eje (**fig. 1R**). El modelo que combina los tres ejes también mejoró significativamente en todos los modelos de dos ejes (**fig. 1S**), indicando que la información proporcionada por cada eje es al menos parcialmente independiente de los otros dos.

#### Ejemplo 5: la taxonomía molecular revela relaciones entre los impulsores de la respuesta y la resistencia

Para resaltar el poder del marco actual de las tres vías descritas anteriormente (es decir, inmunidad de linfocitos T preexistente, CMT y actividad de la vía de TGF- $\beta$ ) e ilustrar la pertinencia de la señalización de TGF- $\beta$ , se exploró la relación entre la subtipificación molecular del tumor establecido y las tres vías. Recientemente se describieron múltiples procedimientos de clasificación taxonómica en base a la expresión génica (Lerner et al. supra). Previamente se aplicó la taxonomía de The Cancer Genome Atlas (TCGA) (Calon et al. Nat. Genet. 47:320-329, 2015) a muestras de IMvigor210, pero también se exploró la taxonomía de Lund (Sjödahl et al. Clin. Cancer Res. 18:3377-3386, 2012; Sjödahl et al. Am. J. Pathol. 183:681-691, 2013), que clasifica además CUM para incluir un subtipo genómicamente inestable (GU) (**fig. 2A**). Dada la importancia demostrada de la CMT, se planteó la hipótesis de que el subtipo GU se enriquecería significativamente en los pacientes que responden al tratamiento. De hecho, GU se enriqueció para tumores con alta CMT (**figs. 2A-2C**) y tuvo una tasa de respuesta mucho mayor (47,2 %) que los otros subtipos de Lund (17,6 %) (**fig. 2D**). El aumento en la tasa de respuesta en el subtipo GU excedió las diferencias observadas entre los subtipos de TCGA (**fig. 2E**), pero, inesperadamente, esto no se pudo atribuir a la carga de mutaciones, ya que el subtipo luminal II de TCGA se enriqueció de forma similar para tumores con alta CMT (**figs. 2B y 2C**). En cambio, se identificó la fuente de la diferencia evaluando por separado a los pacientes clasificados solo como luminal II de TCGA, solo GU de Lund o ambos (**fig. 2F**). Si bien los tumores luminales II tenían una mayor expresión del gen de Tef CD8+ independientemente de su marcador Lund, solo aquellos tumores luminales II que también se clasificaron como GU tenían una firma de TGF- $\beta$  baja. Por tanto, una firma de TGF- $\beta$  desfavorable, que da lugar a una proporción desfavorable de Tef CD8 con respecto a TGF- $\beta$ , superó a una CMT alta en este grupo de pacientes, dando como resultado una respuesta deficiente.

Se ha identificado una asociación entre los subtipos de expresión definidos por The Cancer Genome Atlas (TCGA) y la respuesta clínica a la monoterapia con atezolizumab en cohortes individuales de IMvigor210. Se ha descubierto que la CMT está fuertemente relacionada con la respuesta y, además, se captura al menos parcialmente por patrones de expresión génica. Con esto en mente, se exploró una clasificación molecular alternativa para el CU, la taxonomía de Lund (Sjödahl et al. Clin. Cancer Res. 18:3377-3386, 2012; Sjödahl et al. Am. J. Pathol. 183:681-691, 2013), que incluye un subtipo genómicamente inestable (GU) (**fig. 2A**).

El subtipo GU de Lund tuvo una tasa de respuesta drásticamente mayor que los otros subtipos de Lund (**fig. 2D**), y fuertemente enriquecida para tumores con alta CMT (**figs. 2B y 2C**). El subtipo GU de Lund también tuvo las tasas de mutación más altas para TP53 (34 %) y RB1 (43 %), consecuente con una asociación entre la proliferación y la mutación (**fig. 2A**).

Los subtipos basaloide/de tipo SCC (SCCL) y de tipo urotelial B (UroB) se asociaron con una alta expresión de genes de T efectoras CD8+ y sus correlatos, incluyendo una alta expresión de PD-L1 en CI (**fig. 2A**). Si bien estos tumores mostraron tasas de RC similares a las de los tumores GU, la tasa de respuesta global fue menor (**fig. 2D**). Esto se podría deber en parte a la baja CMT y al relativo enriquecimiento de la firma de TGF- $\beta$  (**figs. 2A y 2G**).

Los tumores de tipo urotelial A (UroA) compartían muchos rasgos característicos moleculares con el subtipo luminal I por la clasificación de TCGA, por ejemplo, alta expresión de FGFR3, TP63 y WNT7B (**fig. 2H**). La tasa de respuesta mínima observada en el subtipo UroA es probablemente un reflejo de una baja CMT y una inmunidad preexistente limitada.

El subtipo infiltrado de Lund recibió su nombre debido a la presencia tanto de linfocitos T como de miofibroblastos. En consonancia con esta clasificación, los tumores infiltrados tenían una expresión elevada de los genes de T efectores CD8+, pero también la expresión relativa más alta de los genes asociados con las vías prooncogénas e inmunosupresoras, incluyendo TGF- $\beta$ , la activación del estroma y la angiogénesis, la matriz extracelular y la TEM, dando lugar a una proporción desfavorable de T efectores CD8+ con respecto a la firma de TGF- $\beta$  (**figs. 2A y 2G**). El subtipo infiltrado también tuvo la mediana de CMT más baja (**figs. 2B y 2C**), y esto, en combinación con la proporción desfavorable de T efectores CD8+ con respecto a TGF- $\beta$ , es consecuente con el subtipo infiltrado que muestra la tasa de respuesta más deficiente (**fig. 2D**).

#### **Ejemplo 6: la activación de la vía de TGF- $\beta$ restringe las respuestas a anti-PD-L1 en tumores con exclusión inmunitaria**

Dada la asociación de la señalización de TGF- $\beta$  con los componentes estromales y el impacto negativo que las células estromales pueden tener en los linfocitos T CD8+, seguidamente se examinó la relación entre el fenotipo inmunitario de tumor y la respuesta a atezolizumab. Se usó inmunohistoquímica para evaluar la infiltración de linfocitos T CD8+ y se clasificaron los tumores en fenotipos de desierto inmunitario, exclusión inmunitaria o inflamación inmunitaria en base a la presencia y localización de los linfocitos T CD8+ en el TME (**fig. 3A**). Una proporción significativa de los tumores de vejiga (aproximadamente un 48 %) presentó el fenotipo con exclusión inmunitaria, mientras que los tumores con desierto inmunitario y con inflamación inmunitaria constituyeron aproximadamente un 26 % cada uno. El fenotipo con exclusión inmunitaria se caracterizó por la localización de linfocitos T CD8+ principalmente en el compartimento estromal peritumoral, yuxtapuestos a fibras de colágeno (revelados por la tinción tricrómica; **fig. 3B**).

La proximidad de los linfocitos T CD8 al estroma desmoplásico en tumores con exclusión inmunitaria (**figs. 3A y 3B**) y la asociación del ligando de TGF- $\beta$  y la expresión génica del receptor con la falta de respuesta (**fig. 1O**) implican ambos la vía de TGF- $\beta$ . Para entender mejor el papel de esta vía, se consideraron dos firmas génicas diferentes. La primera es una firma de dos genes (TGFB1 y TGFBR2, descritos anteriormente) que representa el aporte a la vía. La firma de aporte de dos genes no mostró ninguna diferencia en el nivel de expresión en todos los fenotipos inmunitarios, pero se elevó en los pacientes que no responden al tratamiento solo en los tumores con exclusión inmunitaria (**fig. 3C**). La segunda firma se desarrolló para medir la salida de la vía de TGF- $\beta$  específicamente en fibroblastos de diferentes tejidos. La "firma de respuesta de TGF- $\beta$  panfibroblástica" (pan-F-TBRS) incluye 19 genes que se inducen fuerte y específicamente por TGFB1 en todo un panel de líneas celulares de fibroblastos primarios humanos derivados de seis tejidos. Al igual que con la firma de dos genes, la falta de respuesta en los tumores con exclusión inmunitaria se asoció significativamente con puntuaciones de pan-F-TBRS más altas (**fig. 3D**). A diferencia de la firma de dos genes, la puntuación de pan-F-TBRS se elevó tanto en tumores con inflamación inmunitaria como en tumores con exclusión inmunitaria. Sin embargo, consecuente con la firma de TGF- $\beta$  de 2 genes, la pan-F-TBRS estratificó a los pacientes que no responden al tratamiento y a los pacientes que responden al tratamiento solo en los tumores con exclusión inmunitaria, con un enriquecimiento significativo en los pacientes que progresaron con el tratamiento. Estos resultados sugieren que la asociación observada entre los genes de la vía de TGF- $\beta$  y la falta de respuesta se puede atribuir, al menos en parte, al impacto de esta vía sobre los fibroblastos en el microambiente tisular (TME).

#### **Ejemplo 7: la inhibición de TGF- $\beta$ mejora la infiltración de linfocitos T y las respuestas terapéuticas al anti-PD-L1**

Quizás la implicación más inesperada del análisis de biomarcadores es la asociación de la vía de TGF- $\beta$  con la falta de respuesta a atezolizumab en IMvigor210 (**figs. 1O, 1P, 3C y 3D**). La señalización de TGF- $\beta$  puede tener muchos efectos complejos tanto en los tumores como en el sistema inmunitario, tales como impedir directamente el crecimiento tumoral en fase inicial, promover la TEM y la metástasis del tumor, favorecer el desarrollo de linfocitos T reguladores y promover la inversión estromal de los tumores. La observación de niveles elevados de pan-F-TBRS en el fenotipo con exclusión inmunitaria sugirió que los efectos de la señalización de TGF- $\beta$  en el estroma activado pueden dar lugar a la restricción tanto de la afluencia como de la eficacia de los linfocitos T. De hecho, los linfocitos T CD8+ activados no estuvieron ausentes en los tumores con exclusión inmunitaria (a diferencia de los tumores con desierto inmunitario (**fig. 3A**), y no presentaron una baja CMT (**fig. 3E**), lo que sugiere que la exclusión física de los linfocitos T del parénquima tumoral por la barrera estromal fue un rasgo característico importante que limitó la respuesta al tratamiento en este grupo.

Por lo tanto, se estableció un modelo de ratón para investigar el papel de barrera para un estroma activado por TGF- $\beta$ . Para este propósito, se utilizó el modelo de carcinoma mamario de ratón EMT6 porque da lugar al fenotipo con exclusión inmunitaria en el que los linfocitos T se localizan en la periferia del tumor en asociación con las fibras de colágeno (**fig. 4A**) y todas las isoformas de TGF- $\beta$  y PD-L1 se expresan en el TME (**figs. 4B y 4C**). Se

implantaron ortotópicamente células tumorales de EMT6 en ratones BALB/c. Una vez que los tumores alcanzaron aproximadamente 160 mm<sup>3</sup>, se inició el tratamiento con anti-PD-L1 y/o 1D11, un anticuerpo de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecífico. El tratamiento con 1D11 redujo la señalización de TGF- $\beta$ , como se demuestra por los niveles reducidos de SMAD2/3 fosforilado en el tumor (**fig. 4L**) y VEGF-A en el plasma (**fig. 4M**). El doble bloqueo de PD-L1 y TGF- $\beta$  en ratones con tumores establecidos dio lugar a una regresión tumoral completa en la mayoría de los ratones, mientras que anti-PD-L1 solo dio lugar a menos regresiones completas (**figs. 4D-4F**). El bloqueo de TGF- $\beta$  solo no tuvo efecto sobre el crecimiento tumoral in vivo (**figs. 4D-4F**). El doble bloqueo de anticuerpos también dio lugar a un incremento en la abundancia de linfocitos T infiltrantes de tumor (**figs. 4G-4I y 4O**). Los niveles de granzima B también incrementaron por cada linfocito T CD8+ en el grupo de politerapia (**figs. 4J y 4N**). De forma notoria, el bloqueo de PD-L1 y TGF- $\beta$  combinados alteró la distribución de los linfocitos T de una localización en gran medida peritumoral a un patrón más intratumoral (**figs. 4G, 4K y 4O**). Por tanto, el doble bloqueo de TGF- $\beta$  y PD-L1 promovió la localización de linfocitos T en los insulinosomas y mejoró las respuestas terapéuticas.

Para entender mejor los mecanismos subyacentes a la respuesta a este doble bloqueo, se realizó una secuenciación de ARN en tumores de cada una de las cuatro condiciones de tratamiento. La firma de Tef CD8+ usada para analizar tumores humanos se elevó en los tumores de ratón tratados con una combinación de anti-PD-L1 y anti-TGF- $\beta$  (**figs. 4P y 4T**). A pesar de que la monoterapia anti-PD-L1 incrementó la expresión de la firma génica de Tef, el efecto no fue significativo (**fig. 4P**). Estos resultados sugirieron que la inhibición de TGF- $\beta$  potenciaba el efecto de anti-PD-L1 de manera significativa para potenciar la inmunidad antitumoral. A continuación, se evaluó la firma de expresión de TGF- $\beta$  en diferentes poblaciones de células estromales dentro del tumor. La pan-F-TBRS se redujo significativamente en el tratamiento combinado (**fig. 4Q**). Por el contrario, no se observó ninguna reducción en la TBRS asociada con linfocitos T o macrófagos (**fig. 4R**). De acuerdo con estos resultados, el análisis de fosfoflujo en tumores EMT6 demostró que la señalización de TGF- $\beta$ , reflejada por pSMAD2/3, se redujo significativamente en células CD45-, pero no en células CD45+ tras la politerapia (**fig. 4L**). Los efectos competitivos de la firma de Tef y pan-F-TBRS en el TME se pueden integrar con la proporción de Tef con respecto a pan-F-TBRS. Esta puntuación de proporción mostró un incremento en el tratamiento combinado en comparación con el control y los tratamientos con un único anticuerpo (**fig. 4S**). La expresión de los genes de Tef CD8+ se elevó en tumores de ratón tratados con una combinación de anti-PD-L1 y anti-TGF- $\beta$ , mientras que la expresión de los genes de remodelación de fibroblastos paraneoplásicos (FAC) disminuyó (**figs. 4T y 4U**). Por ejemplo, la expresión de IFNG, GZMB y la proteína cinasa 70 asociada a la cadena Zeta (ZAP70) se elevó en tumores de ratón tratados con una combinación de anti-PD-L1 y anti-TGF- $\beta$ , y la expresión del homólogo 2 de lisil oxidasa (LOXL2), la tenascina C (TNC) y la periostina (POSTN) disminuyó en tumores de ratón tratados con una combinación de anti-PD-L1 y anti-TGF- $\beta$  (**fig. 4U**). Sin quedar vinculado a ninguna teoría, el doble bloqueo terapéutico de TGF- $\beta$  y PD-L1 puede convertir un tumor con exclusión inmunitaria en un tumor inflamado al reprogramar los FAC y modificar la arquitectura estromal.

En resumen, el bloqueo de TGF- $\beta$  puede crear sinergia con los anticuerpos anti-PD-L1 para incrementar el recuento de linfocitos Tef CD8+ en el lecho tumoral e impulsar una inmunidad antitumoral fuerte. Aunque la señalización elevada de TGF- $\beta$  puede tener consecuencias adicionales, estos resultados son consecuentes con la idea de que el estroma activado por TGF- $\beta$  en el grupo con exclusión inmunitaria actúa para amortiguar la función de Tef y restringir físicamente la entrada de linfocitos T en el propio tumor.

#### Firmas pancancerosas

Se realizó una evaluación integral de los factores genéticos moleculares, celulares y tumorales asociados con la respuesta y el escape inmunitario principal al bloqueo del punto de control en pacientes incluidos en un estudio de fase 2 de un solo brazo que sometió a prueba la eficacia de atezolizumab en CUM. Dado el gran tamaño de la cohorte usada para este análisis, se llegó a varias conclusiones funcionales importantes con respecto a las características del tumor que rigen la verosimilitud de respuesta. De hecho, se descubrió que tres ejes biológicos desempeñan papeles distintos e independientes: (1) inmunidad preexistente, representada por la expresión de PD-L1 en CI y la expresión génica o correlatos histológicos de la actividad de Tef CD8+; (2) CMT, medida directamente, pero también reflejada en firmas moleculares de proliferación y respuesta al daño en ADN o en mutaciones de pérdida de función que afectan estos procesos; y (3) señalización de la vía de TGF- $\beta$ . Si bien cada uno contribuye significativamente a la base multifactorial de la respuesta, la señalización de TGF- $\beta$  y la CMT conjuntamente proporcionan el mayor poder explicativo del cáncer de vejiga.

En base al enriquecimiento de la firma de TGF- $\beta$  en tumores de CUM con exclusión inmunitaria que no responden, así como un posible papel en la compensación de alta CMT y/o inmunidad preexistente en subtipos de Lund enriquecidos en cuanto a falta de respuesta, se planteó la hipótesis de que la señalización de TGF- $\beta$  puede contrarrestar la inmunidad antitumoral. Para someter a prueba esta hipótesis y entender mejor el papel funcional de TGF- $\beta$  en la restricción de la respuesta al bloqueo del punto de control inmunitario, se usó un modelo de ratón que imita varios aspectos de los tumores con exclusión inmunitaria en pacientes. En este modelo, la inhibición simultánea de la señalización de TGF- $\beta$  y PD-L1 convirtió los tumores de un fenotipo excluido en un fenotipo inflamado, dando como resultado una infiltración tumoral potenciada por linfocitos Tef CD8+ y un marcado incremento en la regresión tumoral.



5 Se espera que la base multifactorial de la respuesta a la inmunoterapia descrita en el presente documento sea aplicable a otros tipos de tumor más allá del cáncer de vejiga, y las tasas de respuesta pancancerosa al bloqueo del punto de control inmunitario se pueden mejorar además al tener en cuenta los tres ejes. Asimismo, se espera que los determinantes de la respuesta y la resistencia al tratamiento anti-PD-L1 se extiendan a otros inhibidores del punto de control inmunitario.

10 En total, estos datos respaldan el uso de los biomarcadores y firmas descritos en el presente documento (por ejemplo, la pan-F-TBRS), por ejemplo, como biomarcadores predictivos y farmacodinámicos para predecir y realizar un seguimiento de la respuesta de pacientes con cáncer (por ejemplo, pacientes con cáncer de vejiga) al tratamiento antineoplásico que incluye una inmunoterapia (por ejemplo, un antagonista de unión al eje PD-L1, tal como un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab)) y un antagonista estromal supresor (por ejemplo, un antagonista de TGF- $\beta$ , tal como un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ ).

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de identificación de un individuo que tiene un cáncer que se puede beneficiar del tratamiento con un tratamiento antineoplásico que comprende un antagonista del eje PD-L1 y un antagonista de TGF- $\beta$  o para seleccionar un tratamiento para un individuo que tiene un cáncer, comprendiendo el procedimiento determinar el nivel de expresión de los siguientes genes en una muestra del individuo:

alfa-actina-2 (ACTA2), una proteína 19 que contiene los dominios de desintegrina y metaloproteínasa (ADAM19), proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP), factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF), factor de crecimiento y transformación beta 1 (TGFB1) y receptor del factor de crecimiento y transformación beta 2 (TGFB2),

en el que un nivel de expresión de ACTA2, ADAM19, COMP, CTGF, TGFB1 y TGFB2 en la muestra que está en o por encima de un nivel de expresión de referencia de los genes identifica al individuo como alguien que se puede beneficiar del tratamiento con un tratamiento antineoplásico que comprende un antagonista del eje PD-L1 y un antagonista de TGF- $\beta$ , en el que el antagonista del eje PD-L1 es atezolizumab, y en el que el antagonista de TGF- $\beta$  es un anticuerpo de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecífico.

2. Un tratamiento antineoplásico que comprende un antagonista del eje PD-L1 y un antagonista de TGF- $\beta$  para su uso en el tratamiento de un individuo que tiene un cáncer, en el que antes del tratamiento se ha determinado que el nivel de expresión de ACTA2, ADAM19, COMP, CTGF, TGFB1 y TGFB2 en la muestra está en o por encima de un nivel de expresión de referencia de los genes, en el que el antagonista del eje PD-L1 es atezolizumab, y en el que el antagonista de TGF- $\beta$  es un anticuerpo de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecífico.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, o el tratamiento antineoplásico para su uso de la reivindicación 2, que comprende además:

(i) determinar el nivel de expresión en la muestra de uno o más genes adicionales seleccionados del grupo que consiste en PD-L1, CD8A, CXCL10, CXCL9, GZMA, GZMB, IFNG, PRF1 y TBX21; opcionalmente en el que el uno o más genes adicionales es (i) PD-L1 o (ii) se selecciona del grupo que consiste en CD8A, CXCL10, CXCL9, GZMA, GZMB, IFNG, PRF1 y TBX21; opcionalmente que comprende además determinar el nivel de expresión de al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete o los ocho de CD8A, CXCL10, CXCL9, GZMA, GZMB, IFNG, PRF1 y TBX21; que opcionalmente comprende además determinar el nivel de expresión de CD8A, CXCL10, CXCL9, GZMA, GZMB, IFNG, PRF1 y TBX21; y/o

(ii) determinar una puntuación de carga mutacional del tumor (CMT) en una muestra de tumor del individuo.

4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3, o el tratamiento antineoplásico para su uso de la reivindicación 2, en el que:

(i) el cáncer se selecciona del grupo que consiste en un cáncer de vejiga, un cáncer de riñón, un cáncer de pulmón, un cáncer de hígado, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas, un cáncer colorrectal o un cáncer de mama, opcionalmente en el que (i) el cáncer de vejiga es un carcinoma urotelial (CU), además opcionalmente en el que el CU es un CU metastásico o (ii) el cáncer de páncreas es un adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP);

(ii) un tumor del individuo tiene un fenotipo con exclusión inmunitaria caracterizado por la localización de linfocitos T CD8+ en el compartimento estromal peritumoral, opcionalmente en el que los linfocitos T CD8+ se localizan en o cerca de fibras de colágeno;

(iii) el nivel de expresión de referencia se determina a partir de una población de individuos que tienen un cáncer, opcionalmente en el que el nivel de expresión de referencia es la mediana de un nivel de expresión o se determina por análisis de componentes principales de niveles de expresión transformados con puntuación Z;

(iv) el nivel de expresión es un nivel de expresión de ácido nucleico, opcionalmente en el que el nivel de expresión de ácido nucleico es un nivel de expresión de ARNm, además opcionalmente en el que el nivel de expresión de ARNm se determina por RNA-seq, RT-qPCR, qPCR, qPCR múltiple o RT-qPCR, análisis de micromatrices, SAGE, técnica MassARRAY, ISH o una combinación de los mismos;

(v) el nivel de expresión es un nivel de expresión de proteínas, opcionalmente en el que el nivel de expresión de proteínas se determina por inmunohistoquímica (IHQ), inmunoelectrotransferencia, ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), inmunoprecipitación, inmunofluorescencia, radioinmunoanálisis o espectrometría de masas; o

(vi) la muestra es una muestra de tejido, una muestra de células, una muestra de sangre completa, una muestra de plasma, una muestra de suero o una combinación de las mismas, opcionalmente en el que la muestra de tejido es una muestra de tejido tumoral, además opcionalmente en el que la muestra de tejido tumoral comprende células tumorales, células inmunitarias infiltrantes de tumor, células estromales o una combinación de las mismas, además

opcionalmente en el que la muestra de tejido tumoral es una muestra fijada con formol e incluida en parafina (FFIP), una muestra de archivo, una muestra recién preparada o una muestra congelada.

5      5. El procedimiento o el tratamiento antineoplásico para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el anticuerpo de bloqueo de TGF- $\beta$  panespecífico es 1D11.

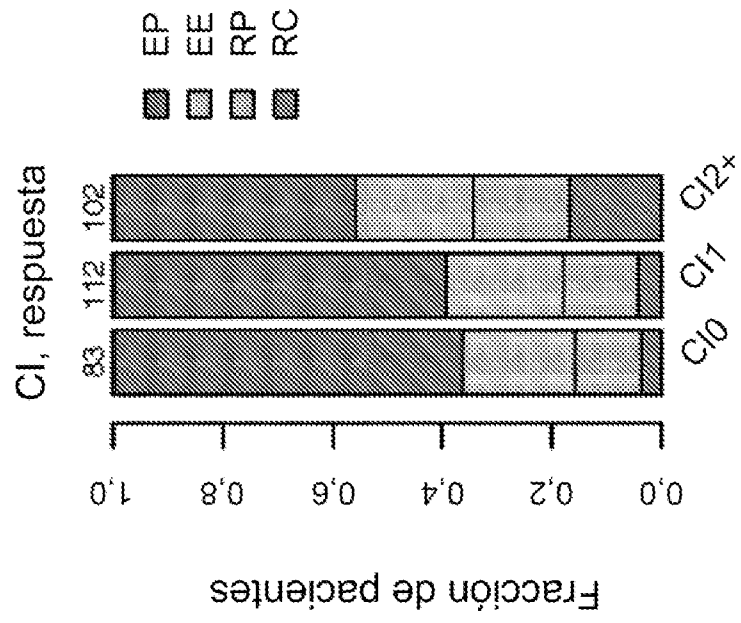
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-5, en el que el tratamiento antineoplásico se formula para su administración en combinación con un agente terapéutico adicional.

10      7. El tratamiento antineoplásico para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en el que el tratamiento antineoplásico se usa en combinación con un agente terapéutico adicional.

15      8. El procedimiento de la reivindicación 6 o el tratamiento antineoplásico para su uso de la reivindicación 7, en el que el agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en un agente inmunoterápico, un agente citotóxico, un agente inhibidor del crecimiento, un agente de radioterapia, un agente antiangiogénico y combinaciones de los mismos.

20      9. El procedimiento o el tratamiento antineoplásico para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el individuo es un ser humano.

FIG. 1A



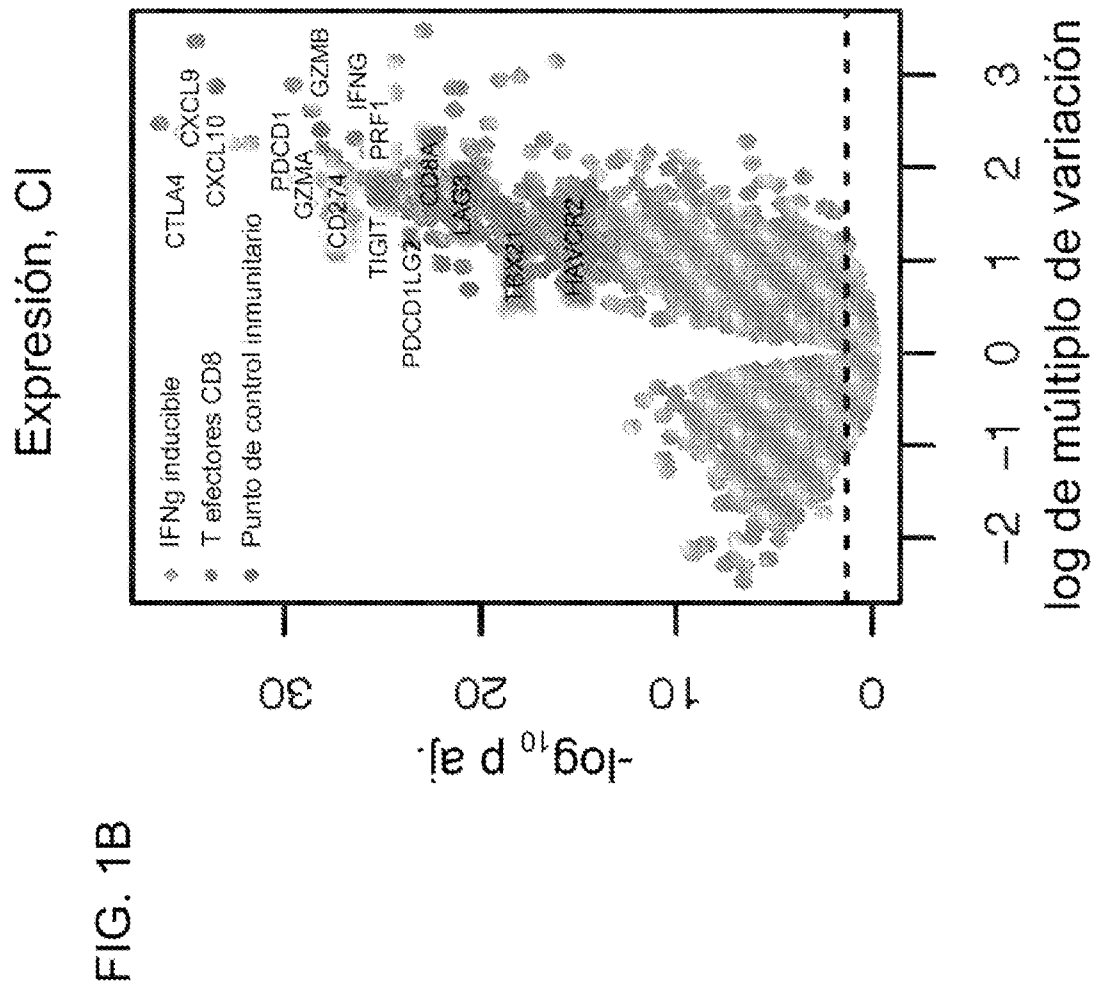


FIG. 1C

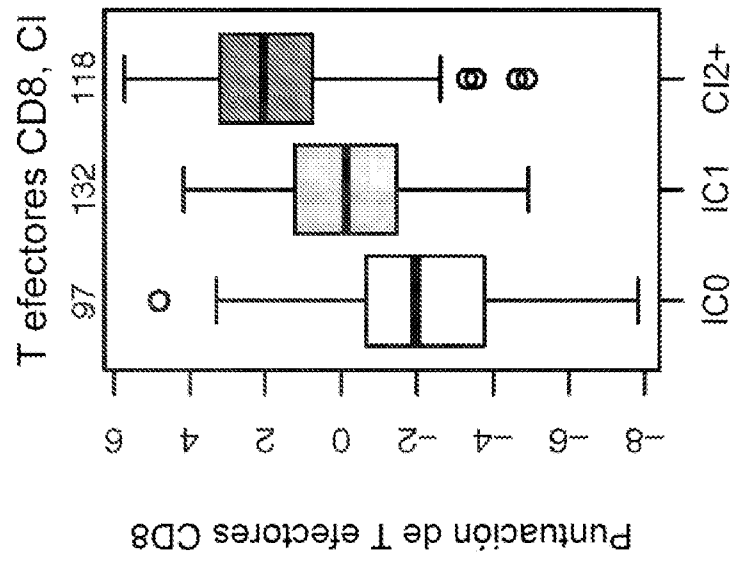


FIG. 1D

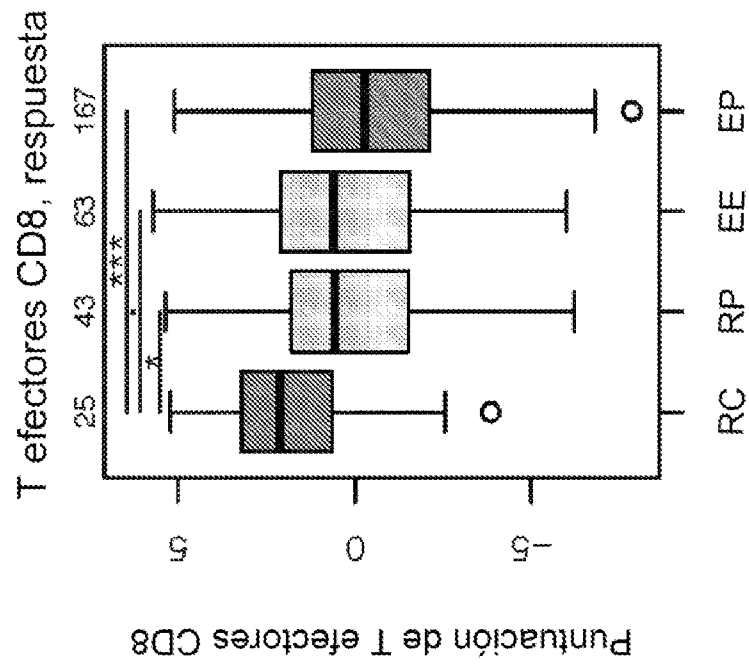


FIG. 1F

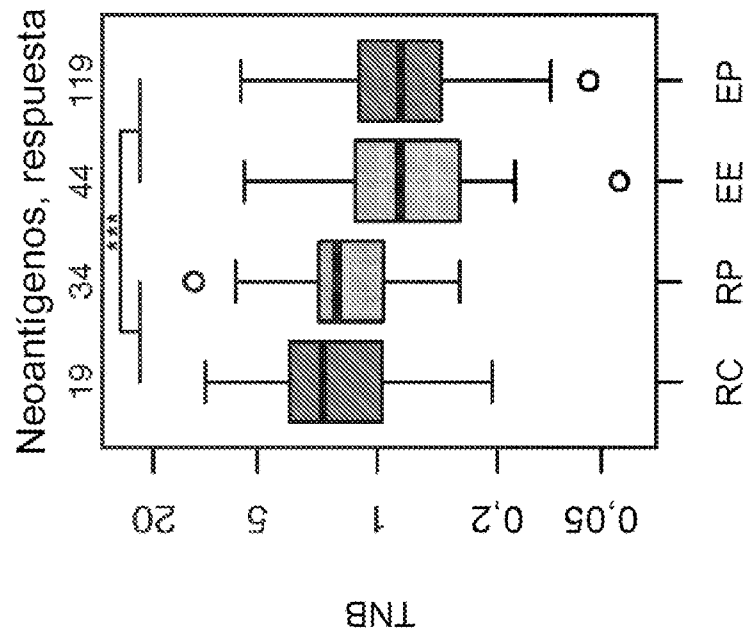


FIG. 1E

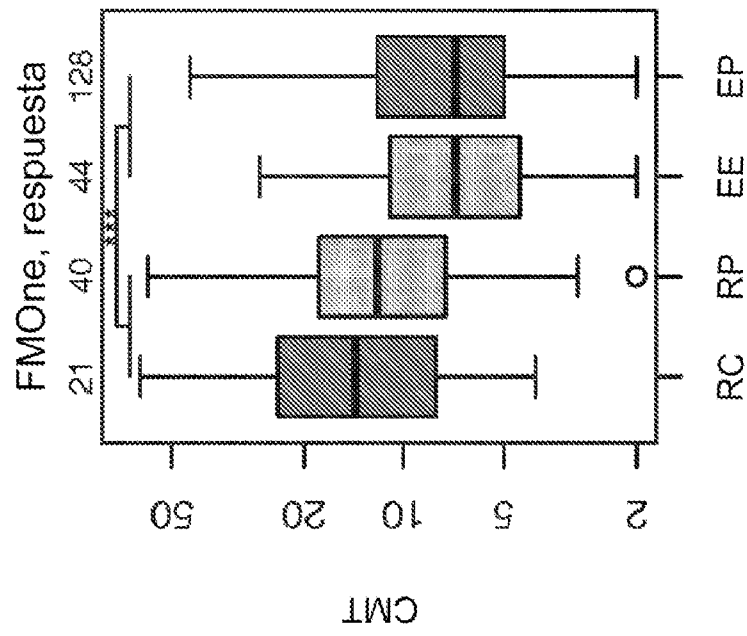


FIG. 1G

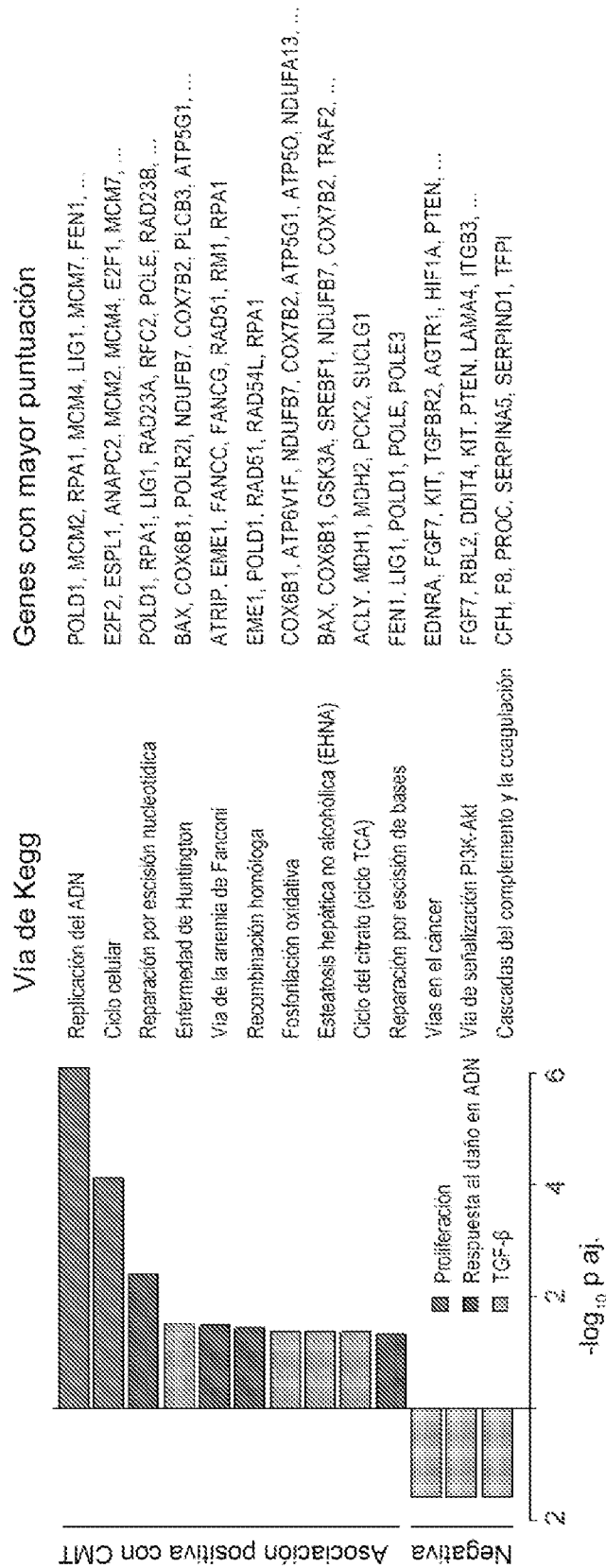




FIG. 1H

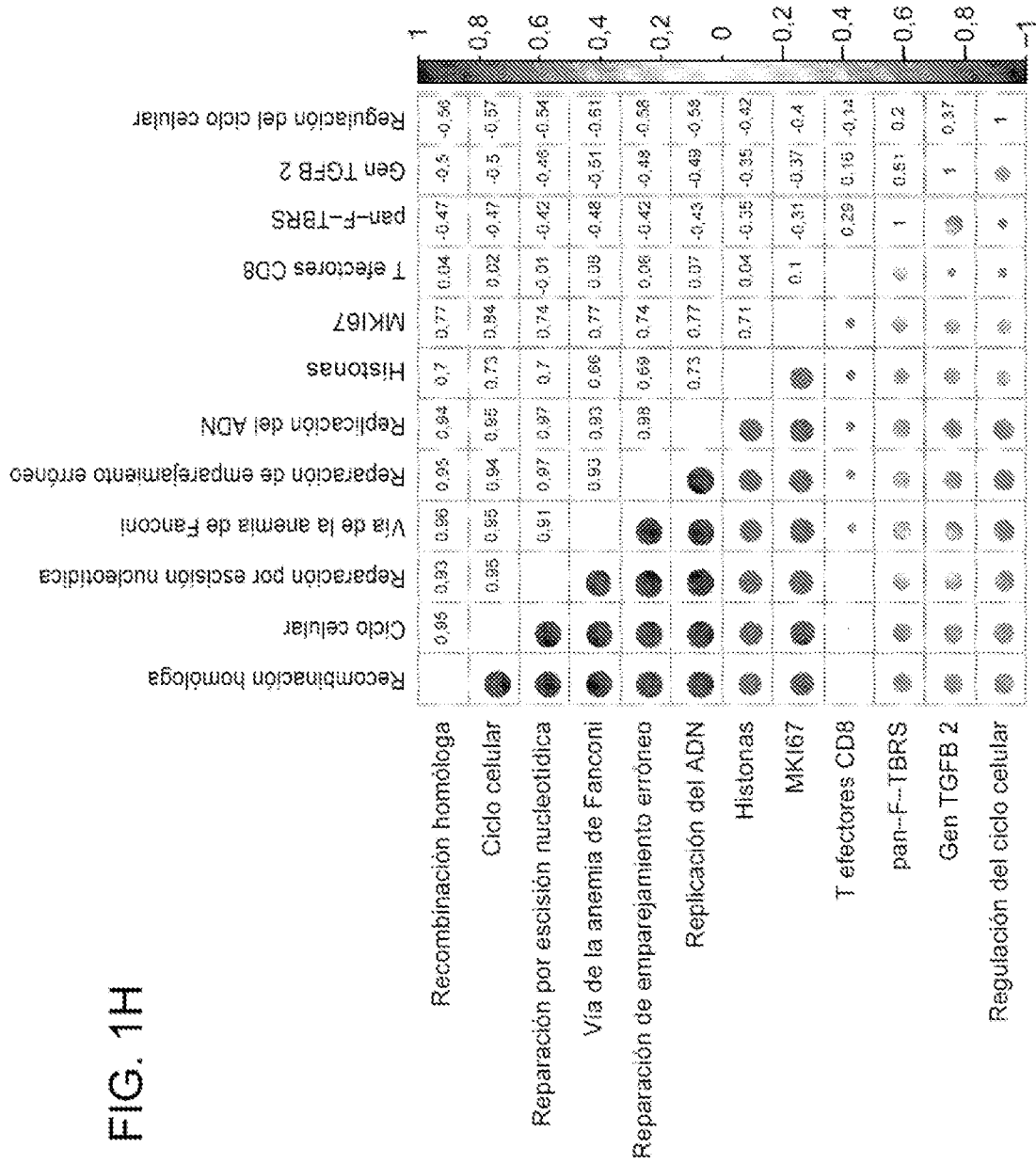


FIG. 1I

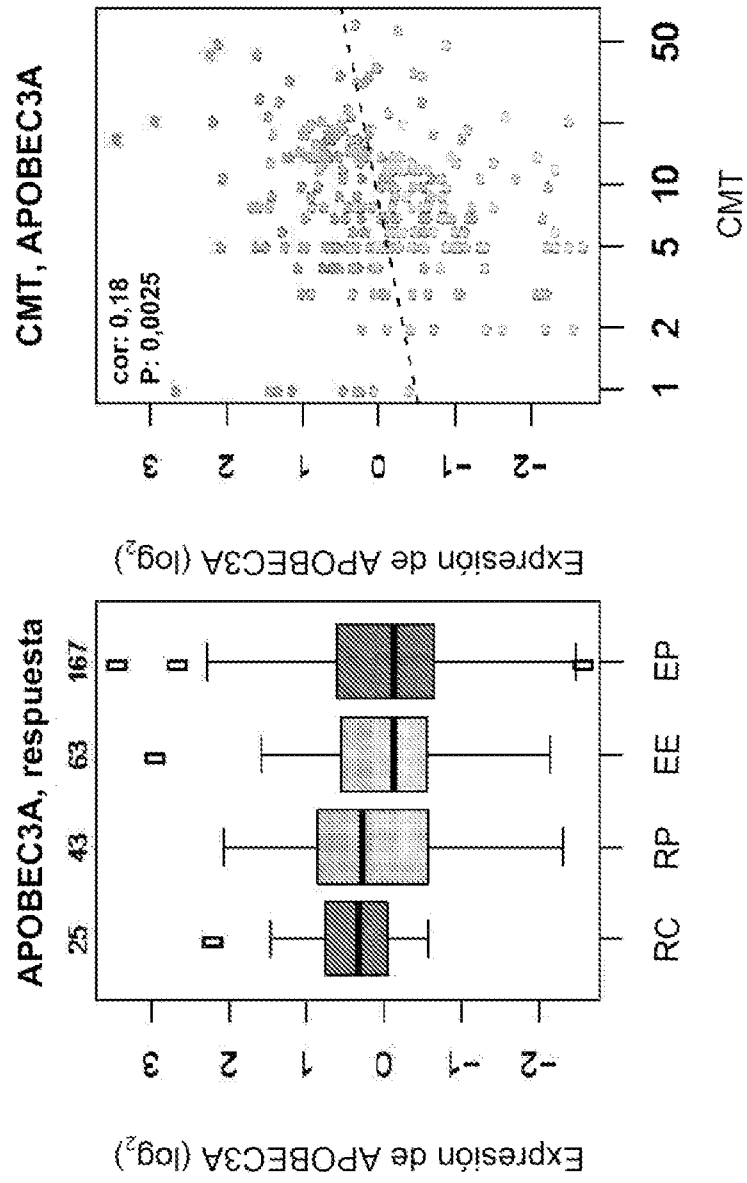


FIG. 1J

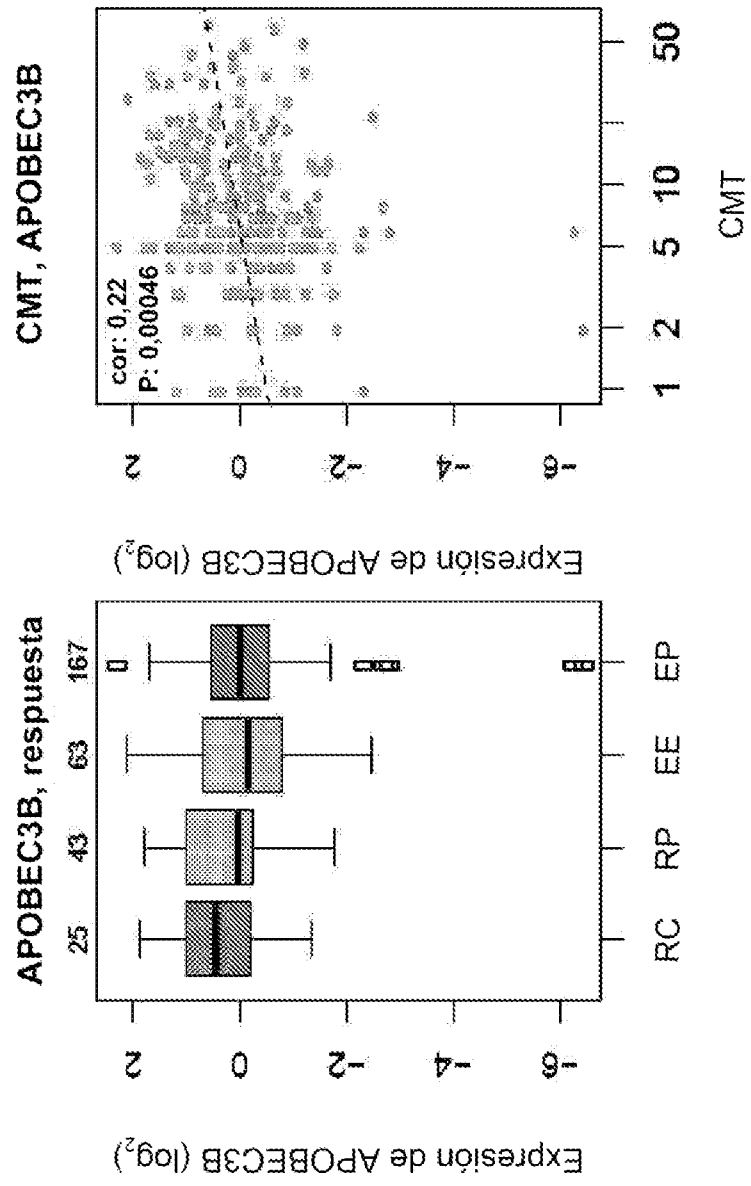


FIG. 1K

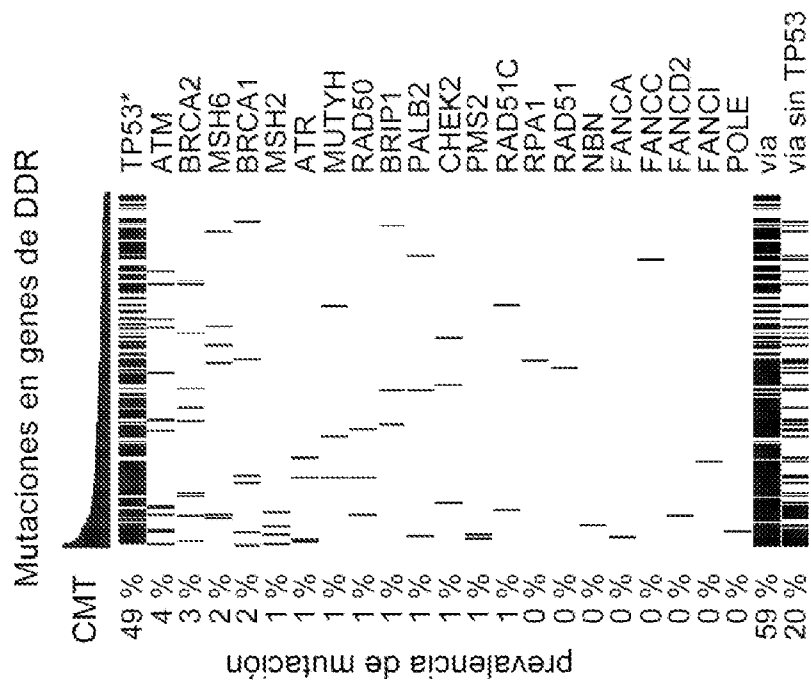


FIG. 1L

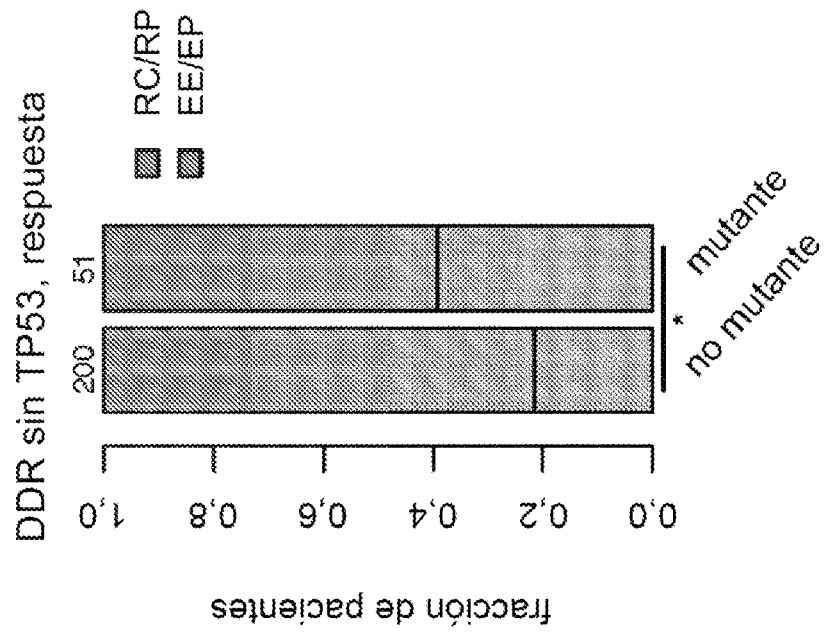


FIG. 1M

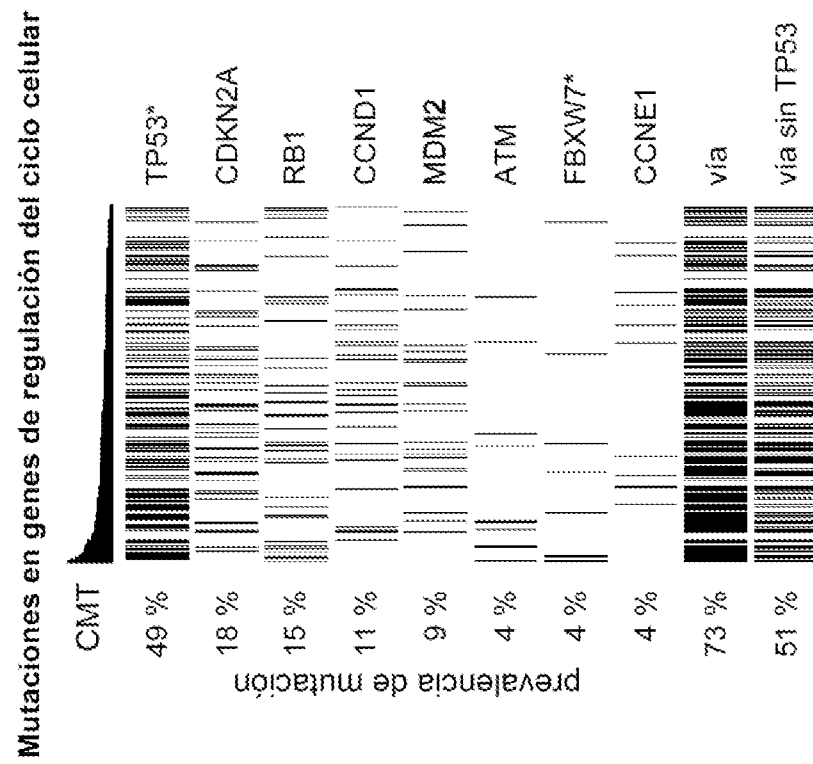


FIG. 1N

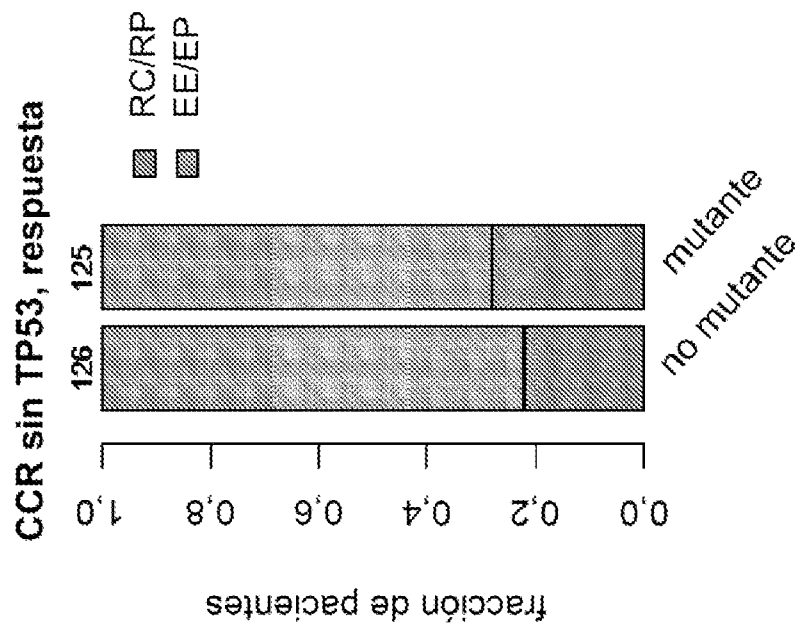


FIG. 10

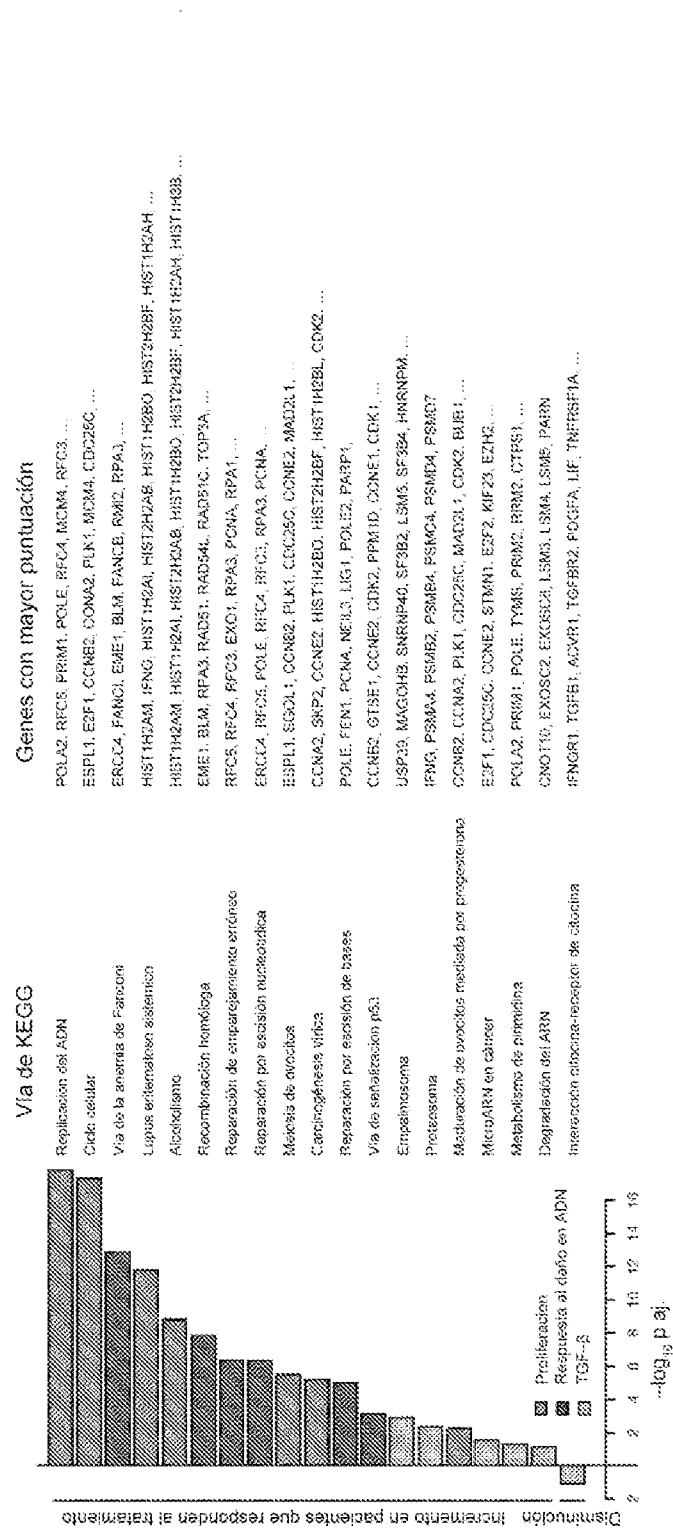


FIG. 1P

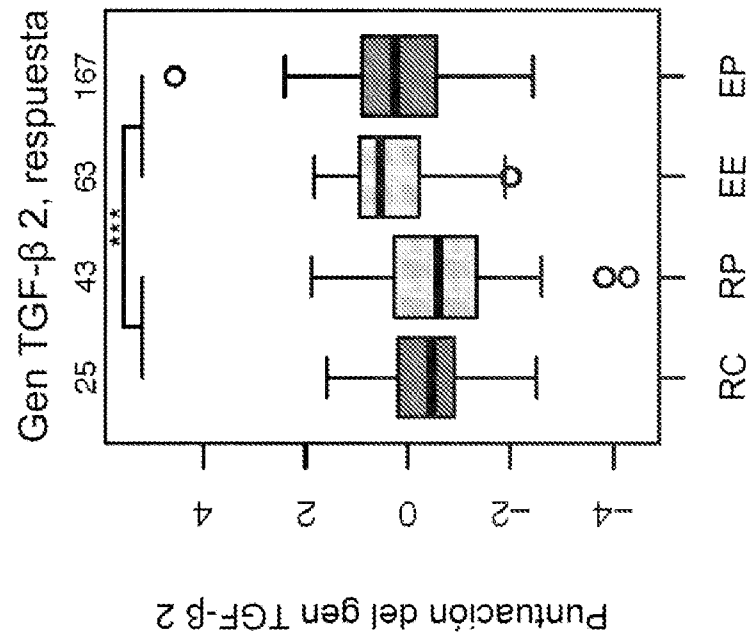


FIG. 1Q

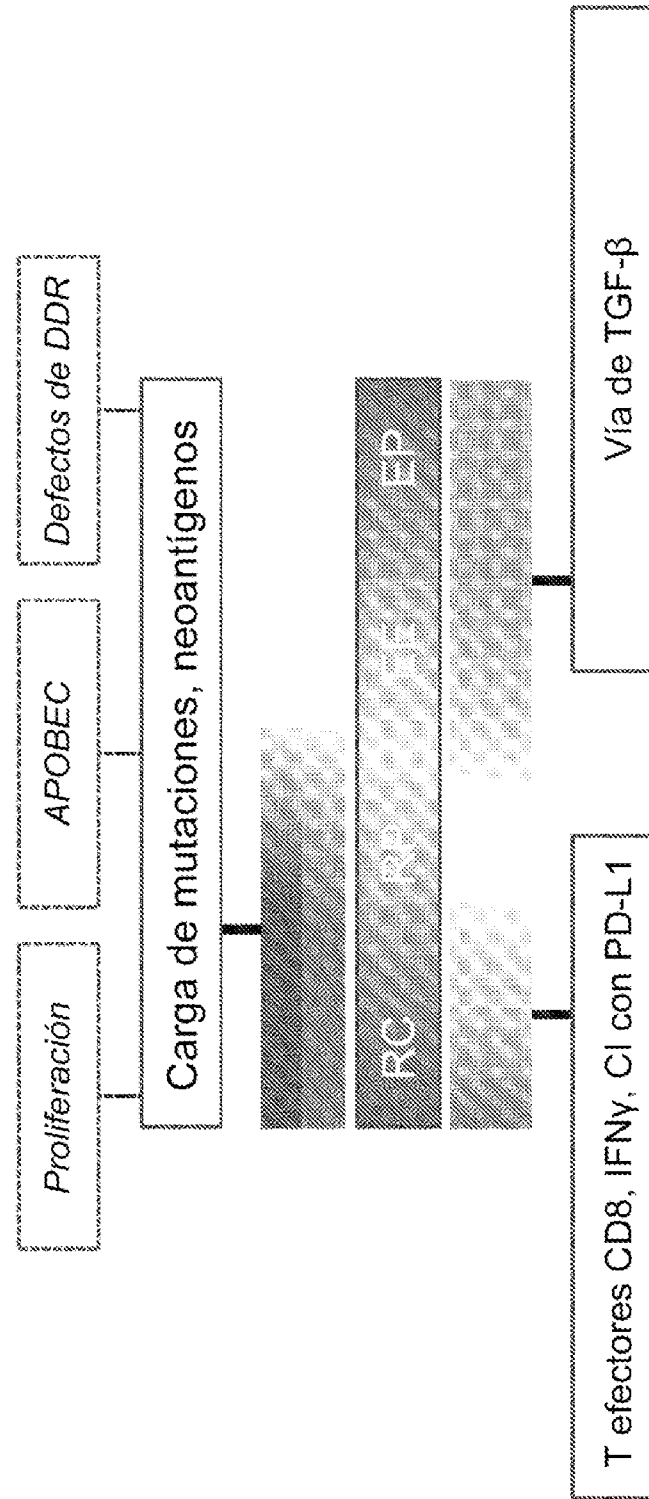




FIG. 1S

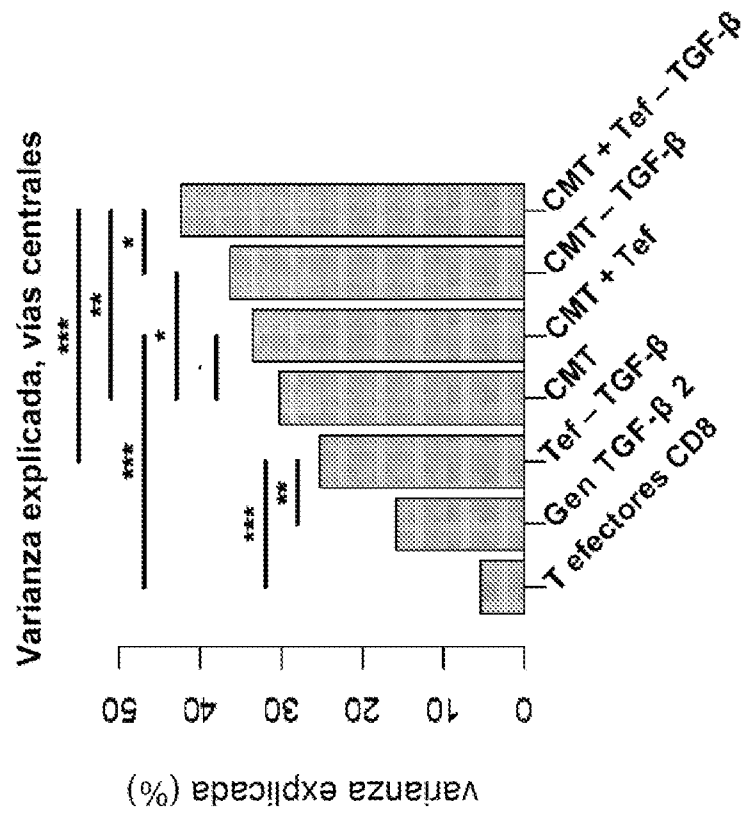


FIG. 1R

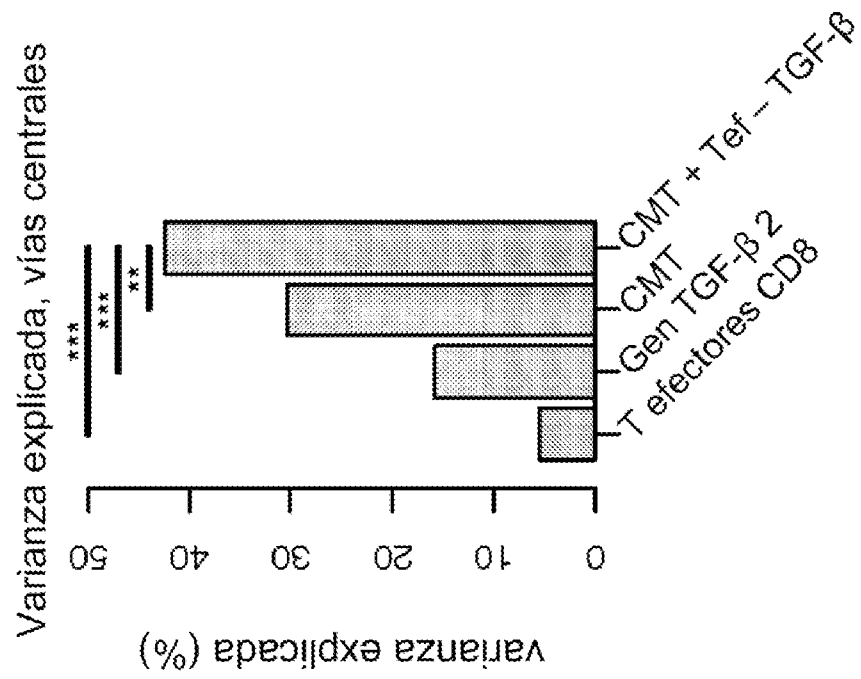


FIG. 1T

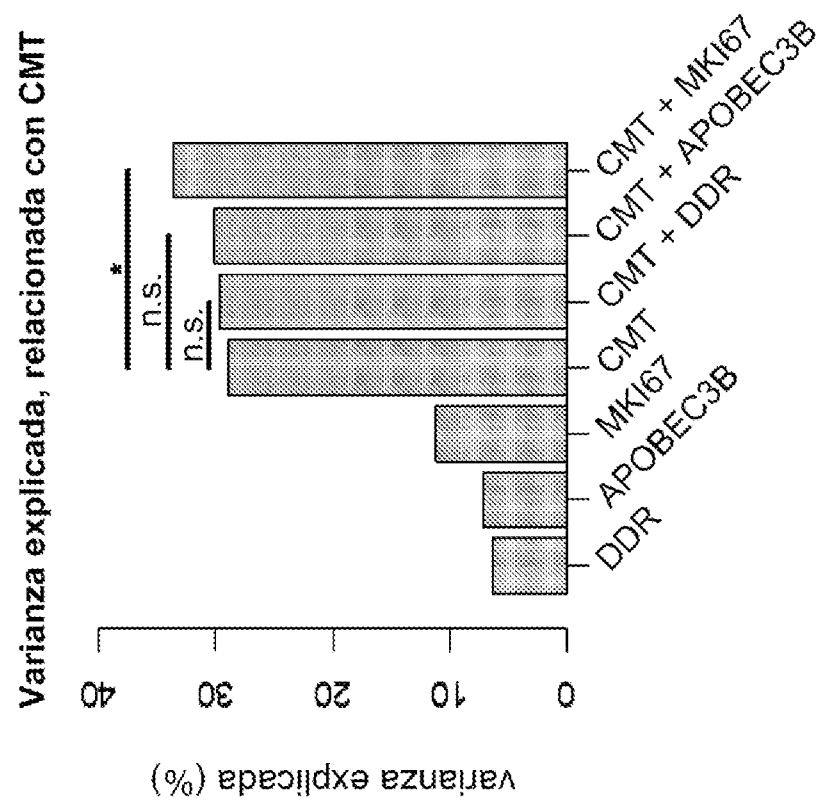


FIG. 1U

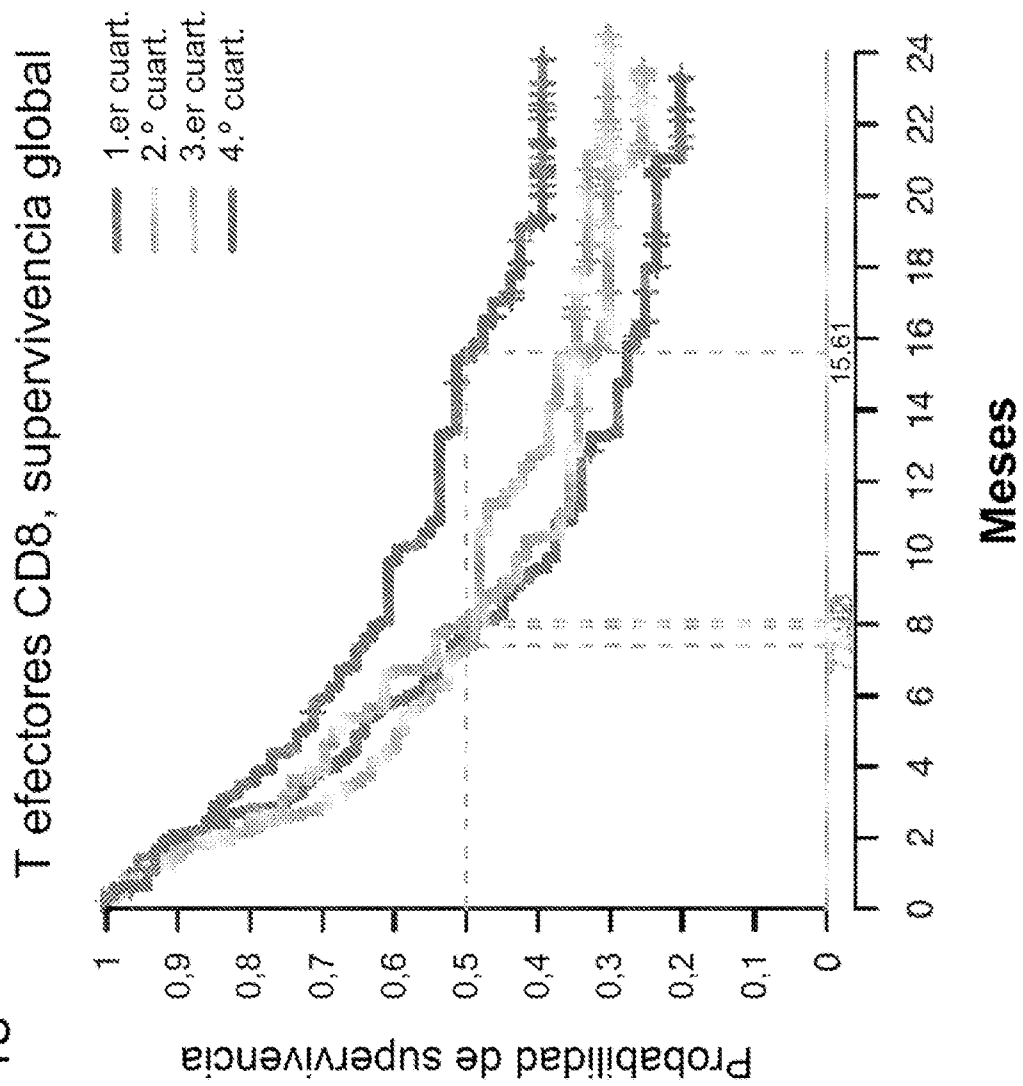


FIG. 1V

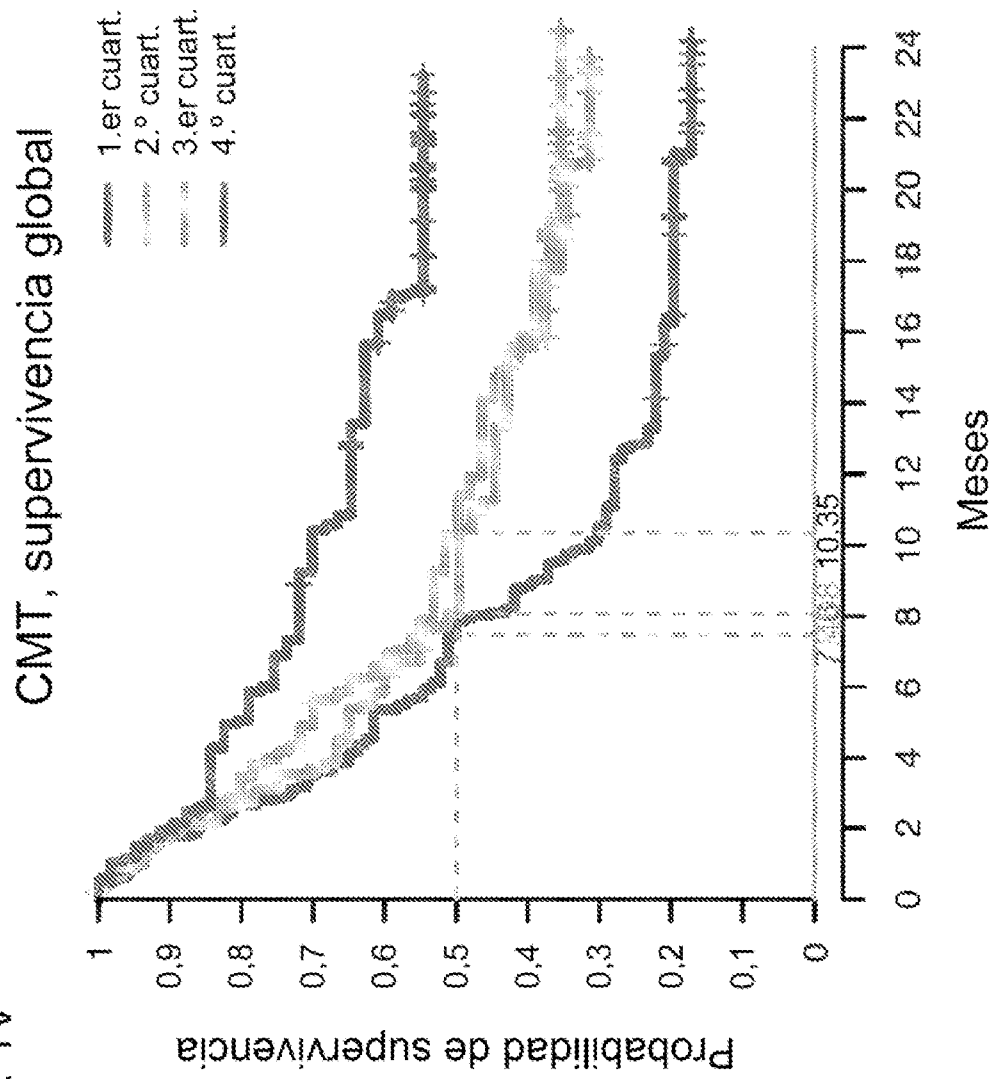


FIG. 1W

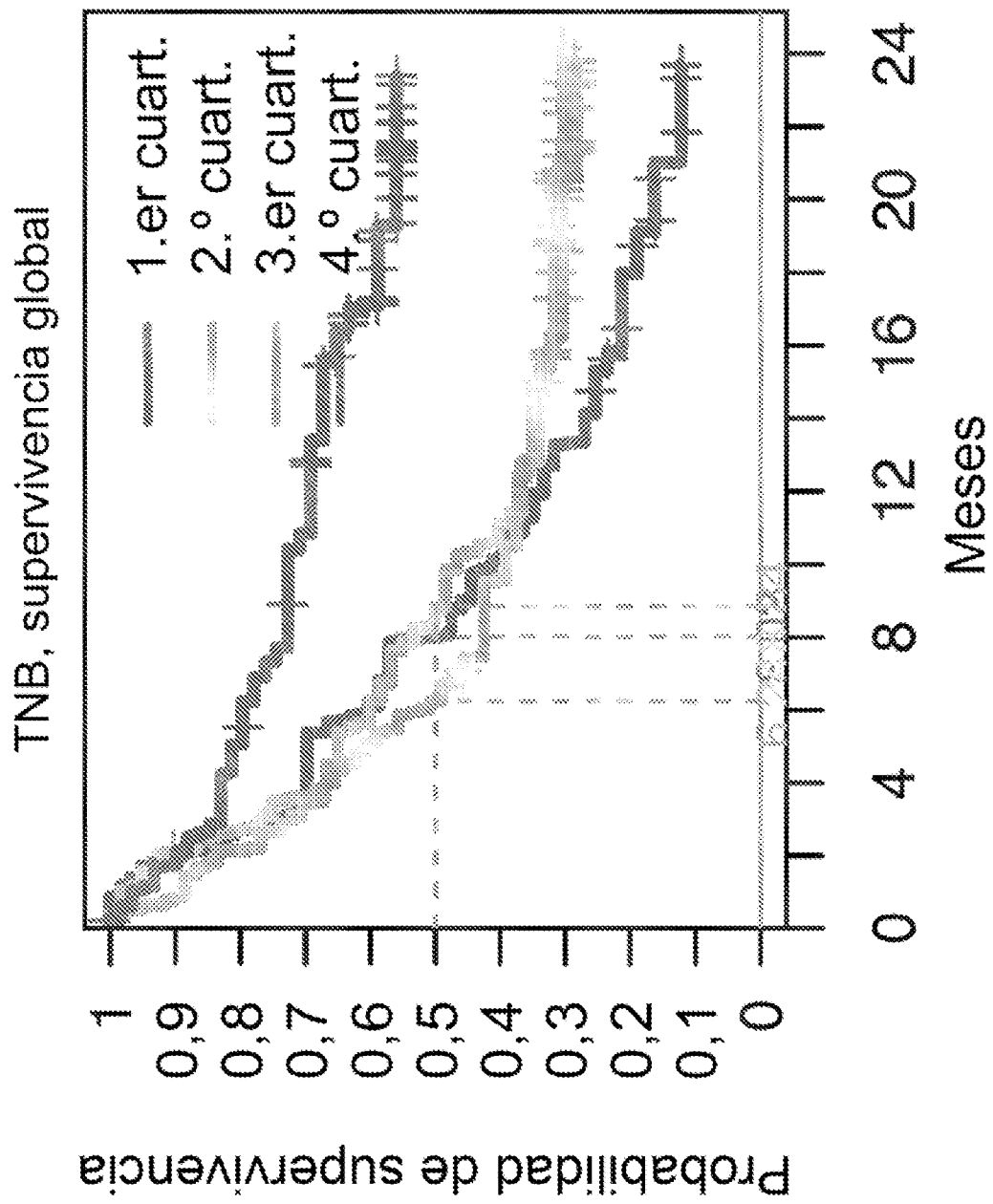


FIG. 1X

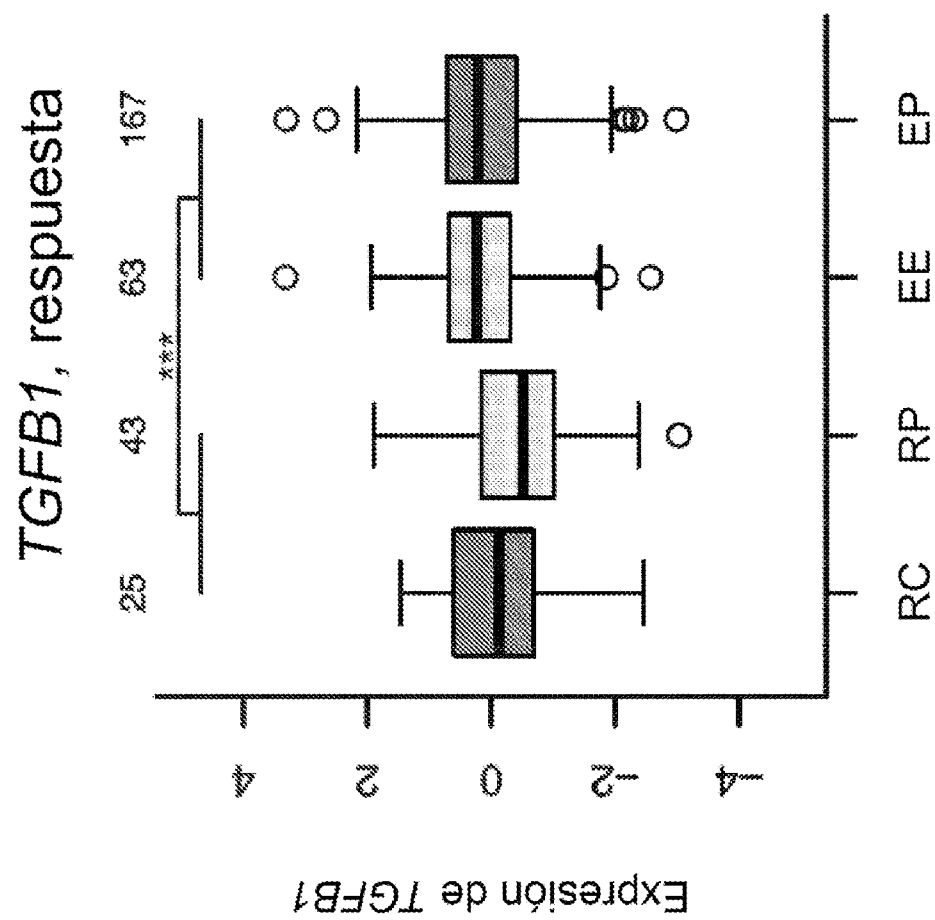


FIG. 1Y

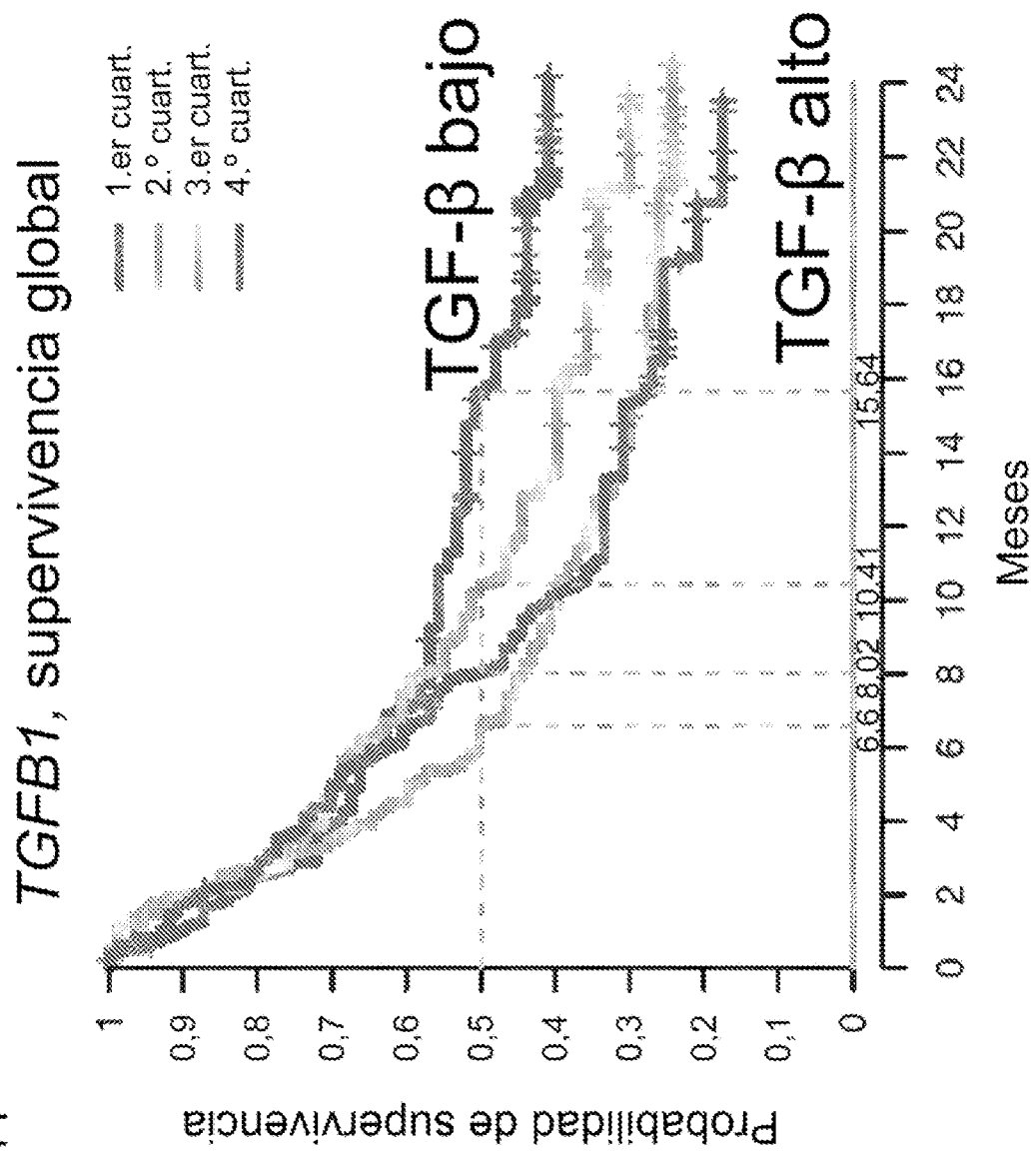


FIG. 1Z

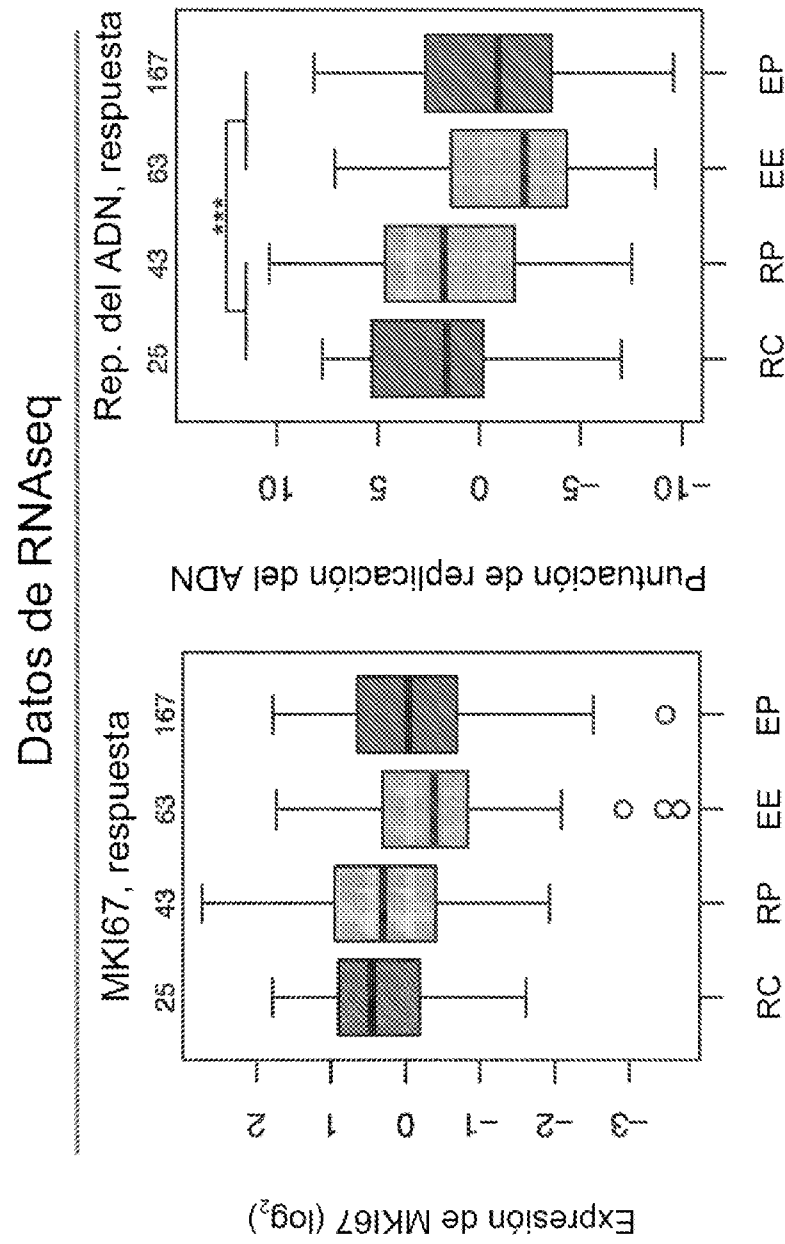
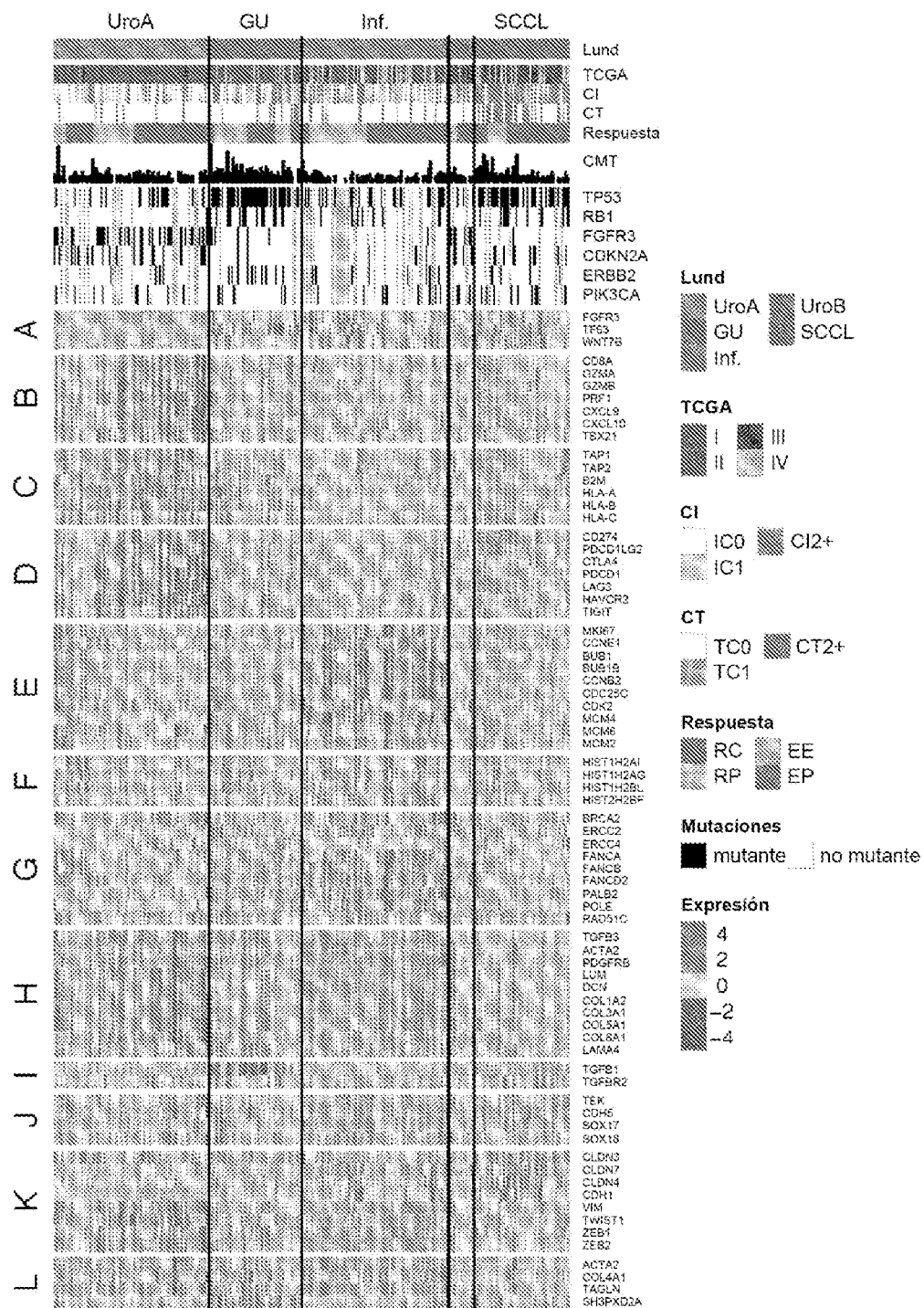




FIG. 2A



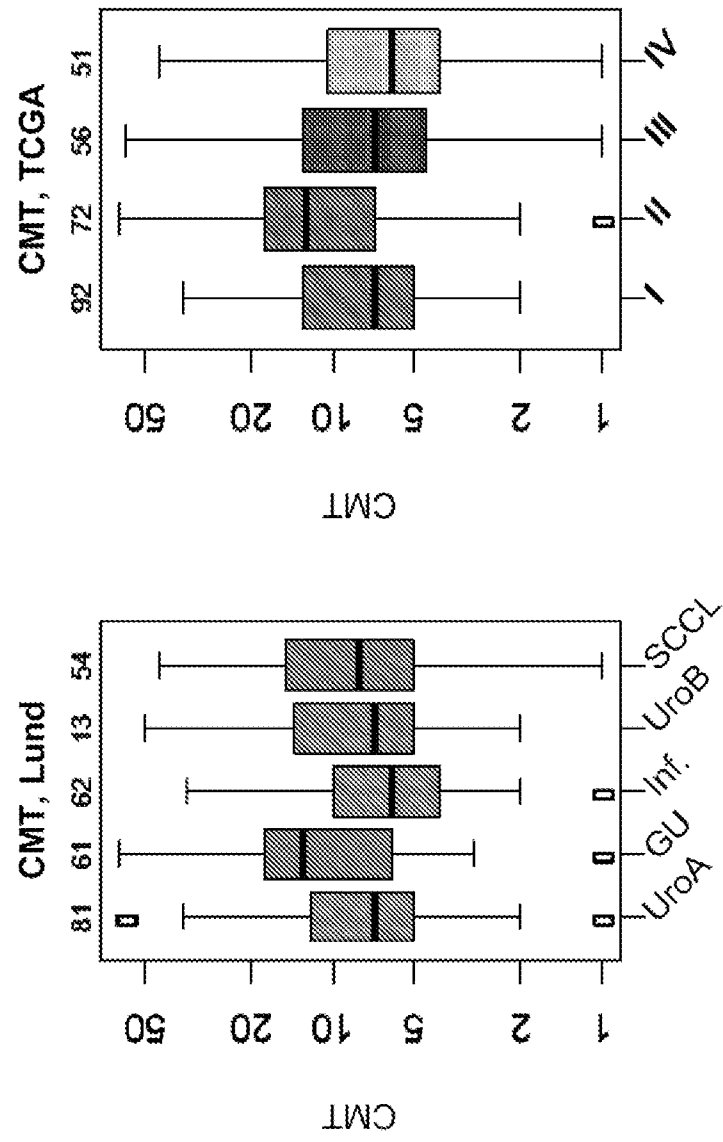


FIG. 2B

FIG. 2C

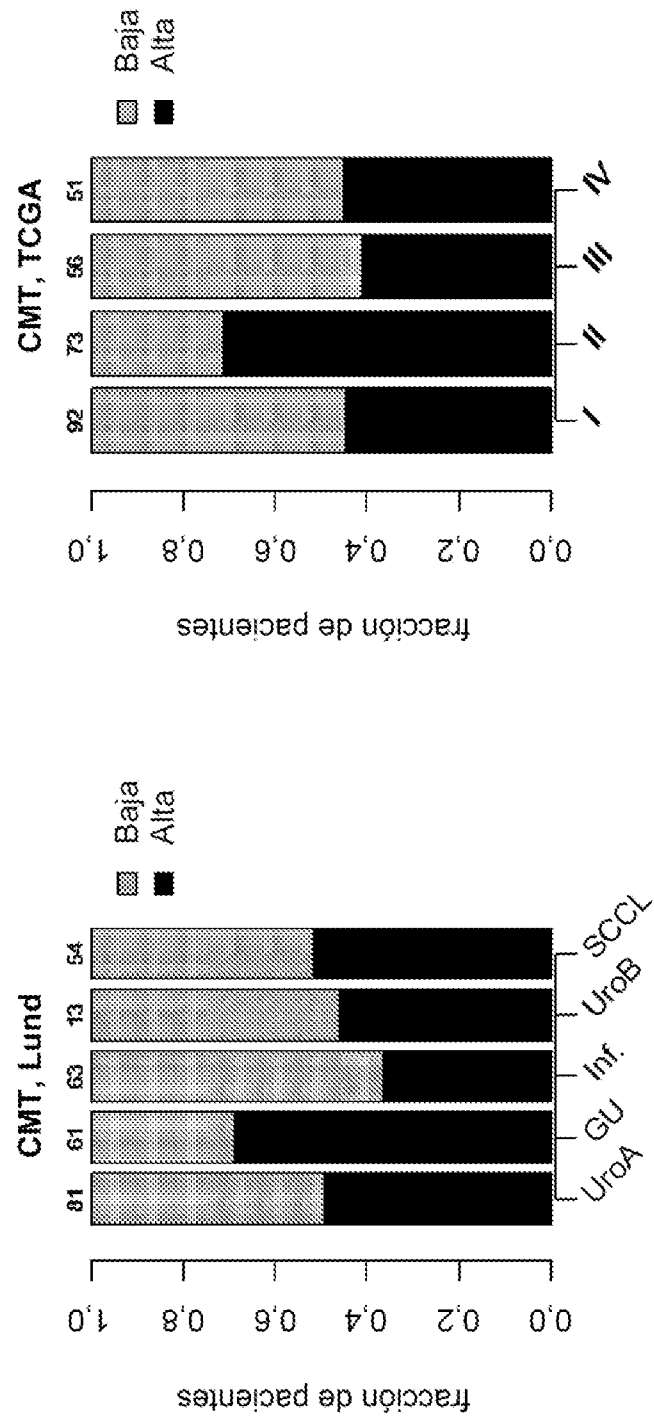


FIG. 2E

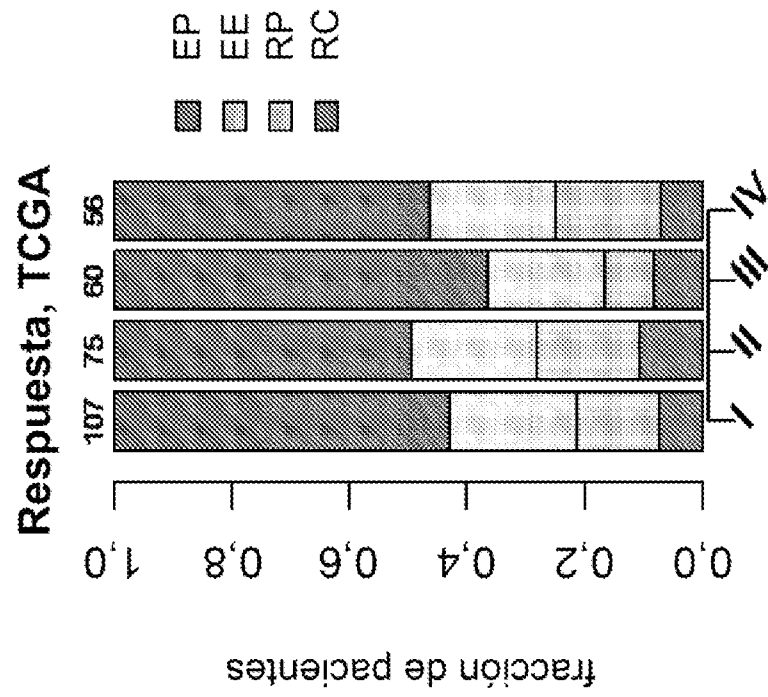


FIG. 2D

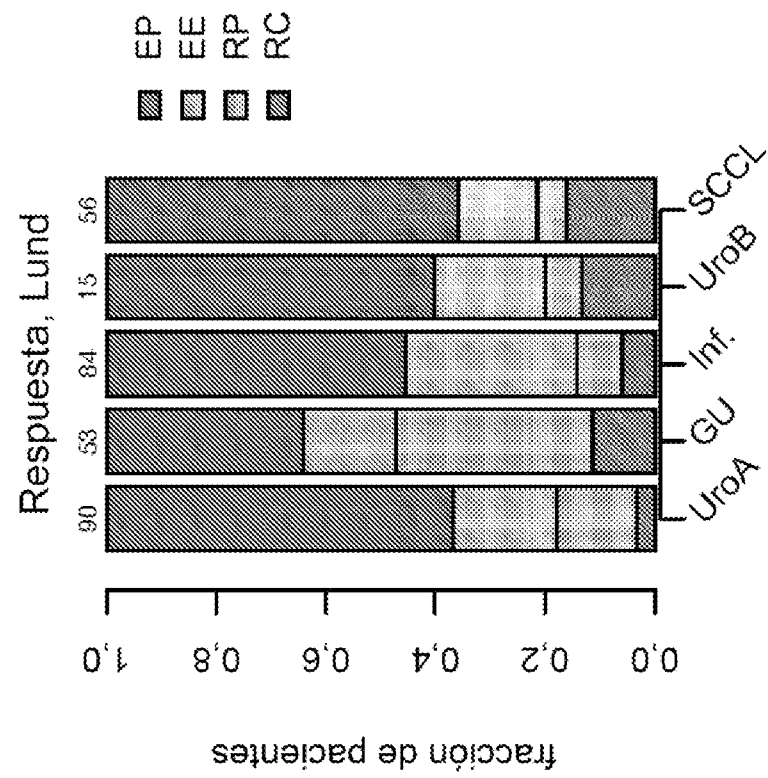


FIG. 2F

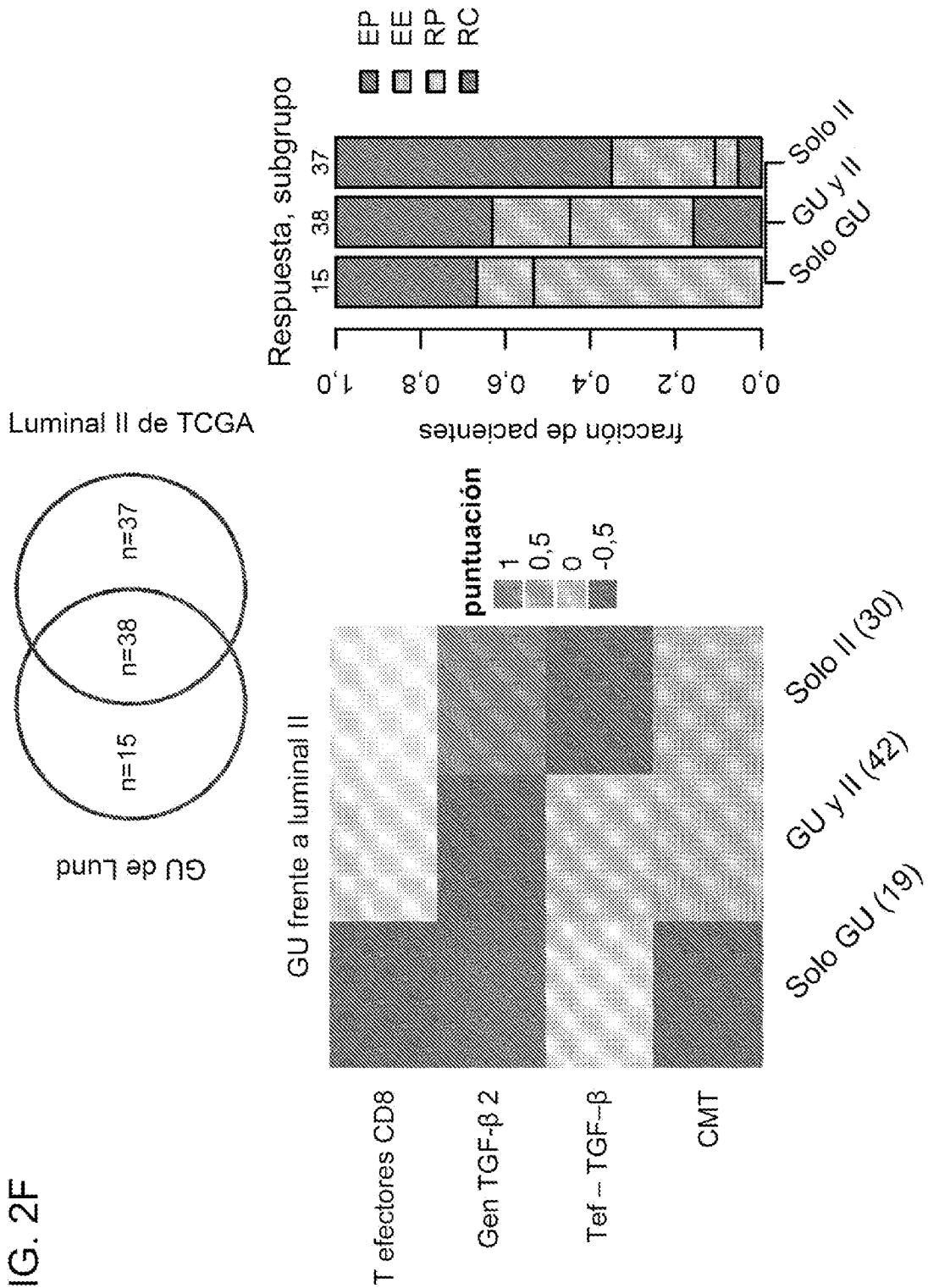


FIG. 2G

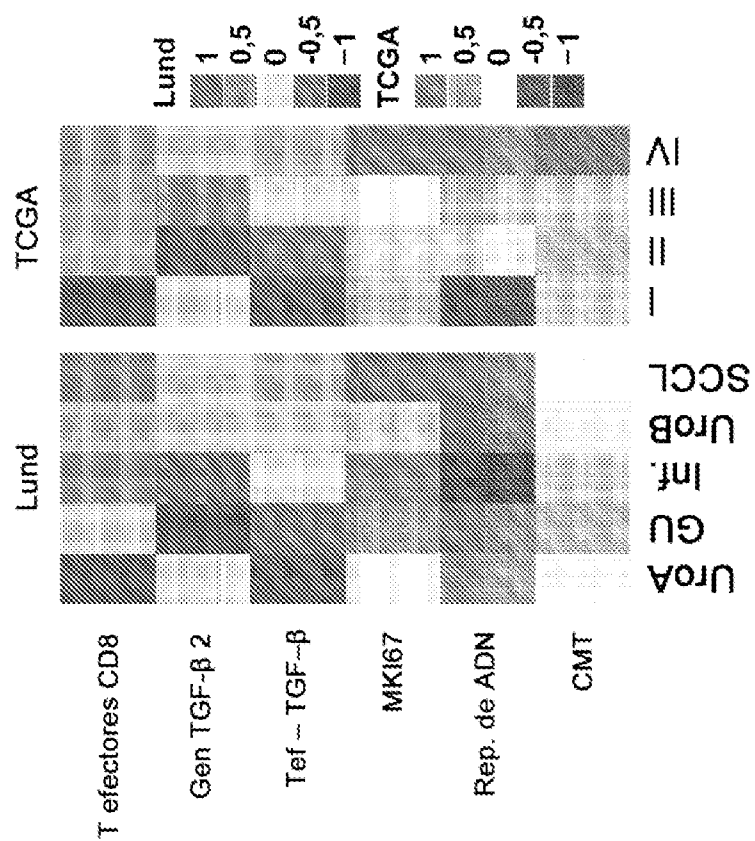


FIG. 2H

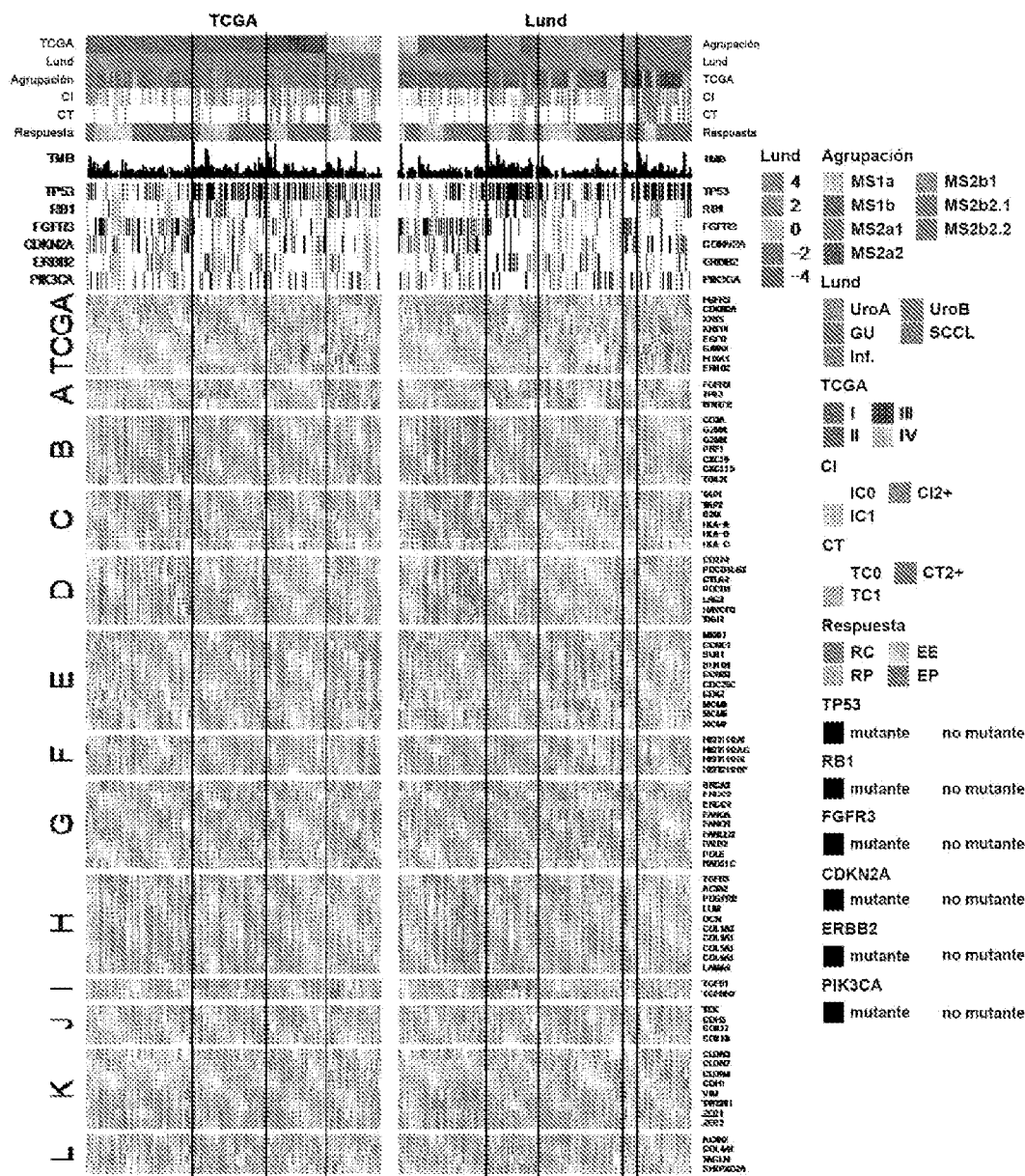


FIG. 3A

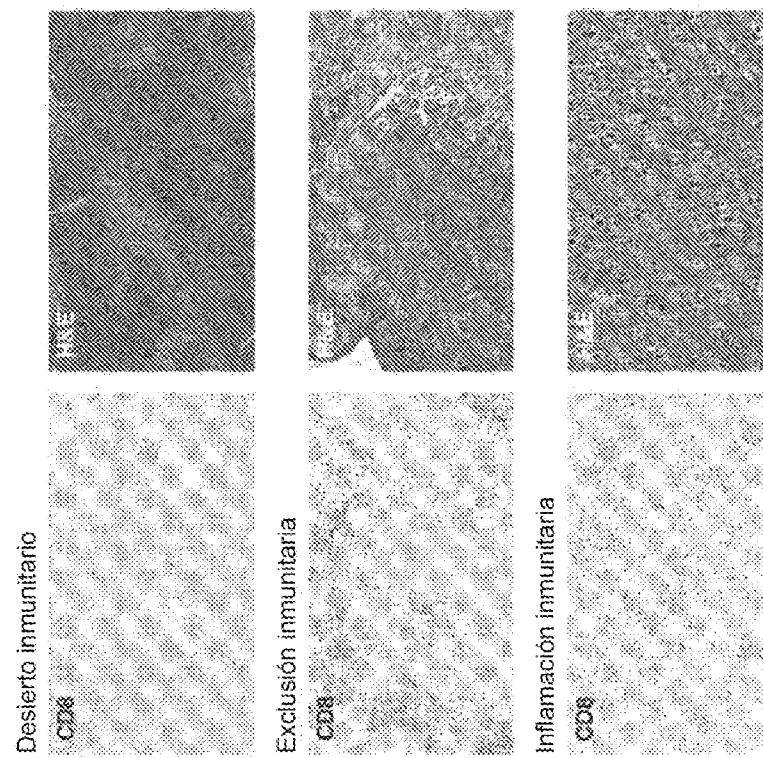


FIG. 3B

Exclusión inmunitaria (CD8/tinción tricrómica)

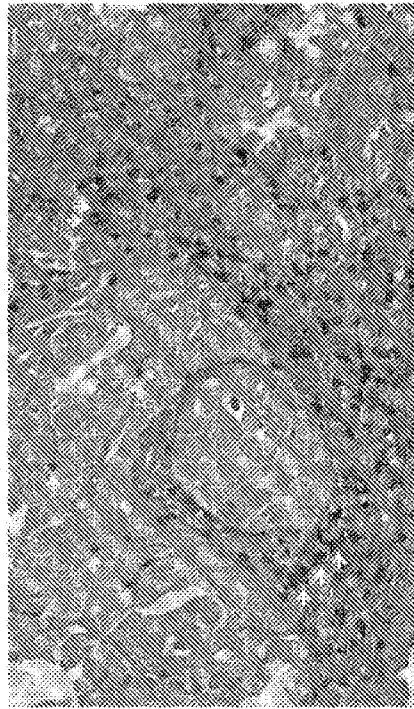




FIG. 3C

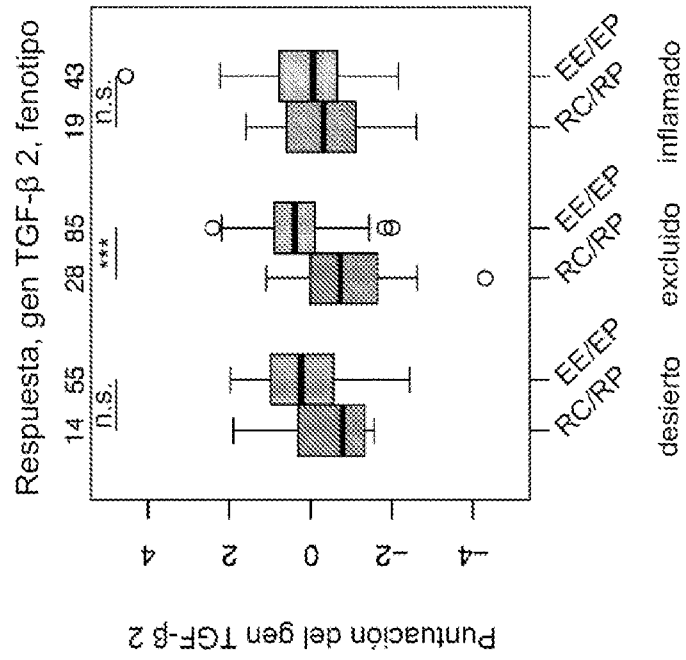


FIG. 3D

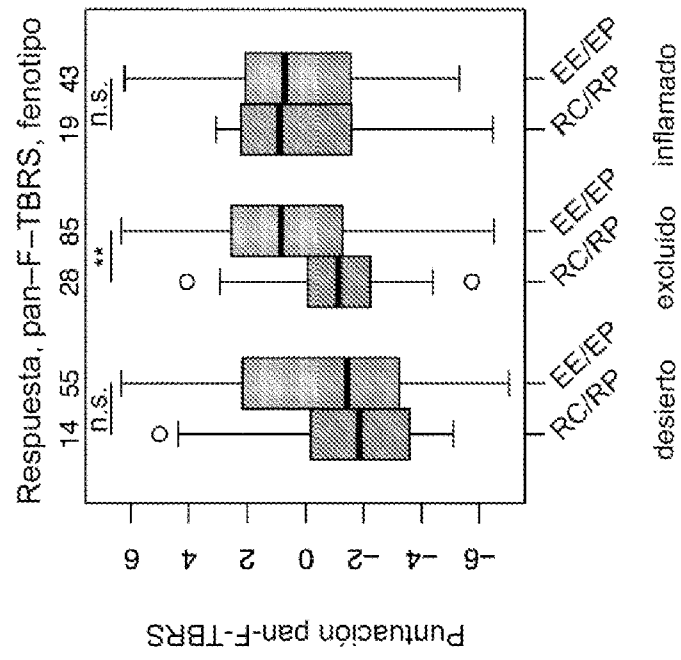


FIG. 3E

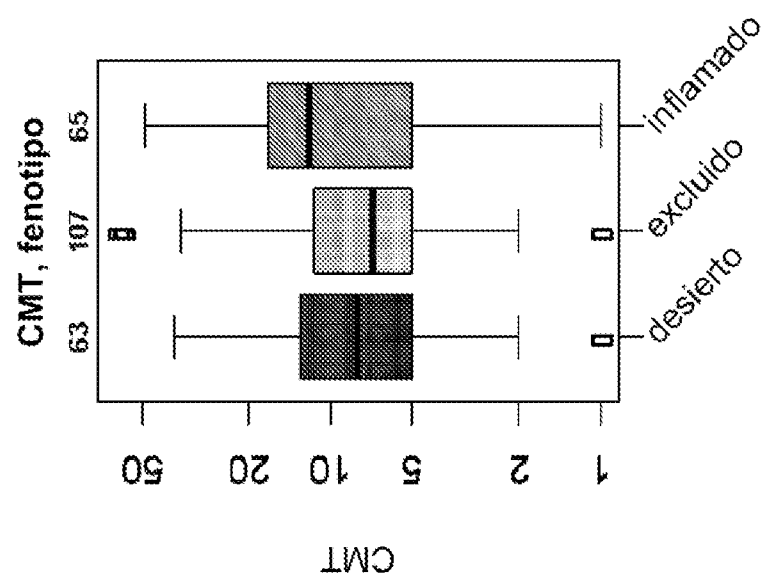


FIG. 4A

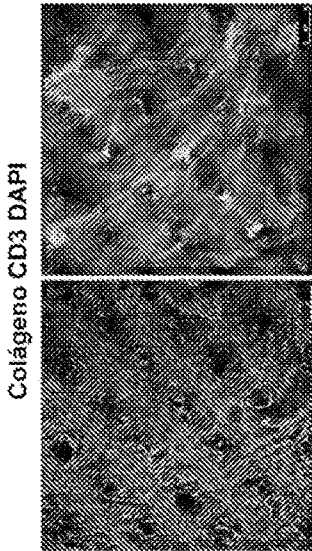


FIG. 4B

ARN de TGF- $\beta$  y PD-L1

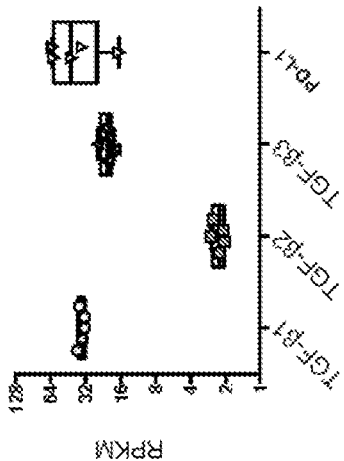


FIG. 4C

Proteína TGF- $\beta$

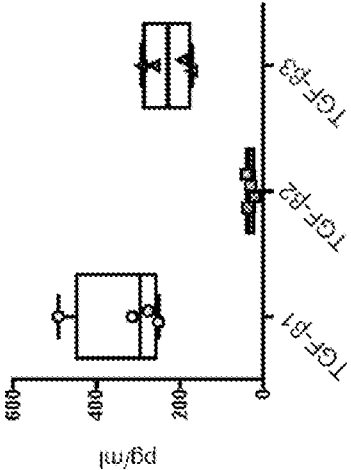


FIG. 4D

Regresiones completas

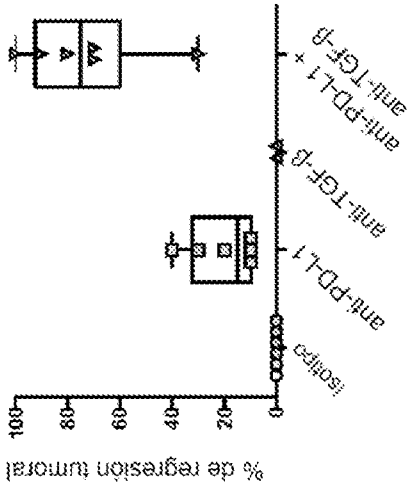


FIG. 4E

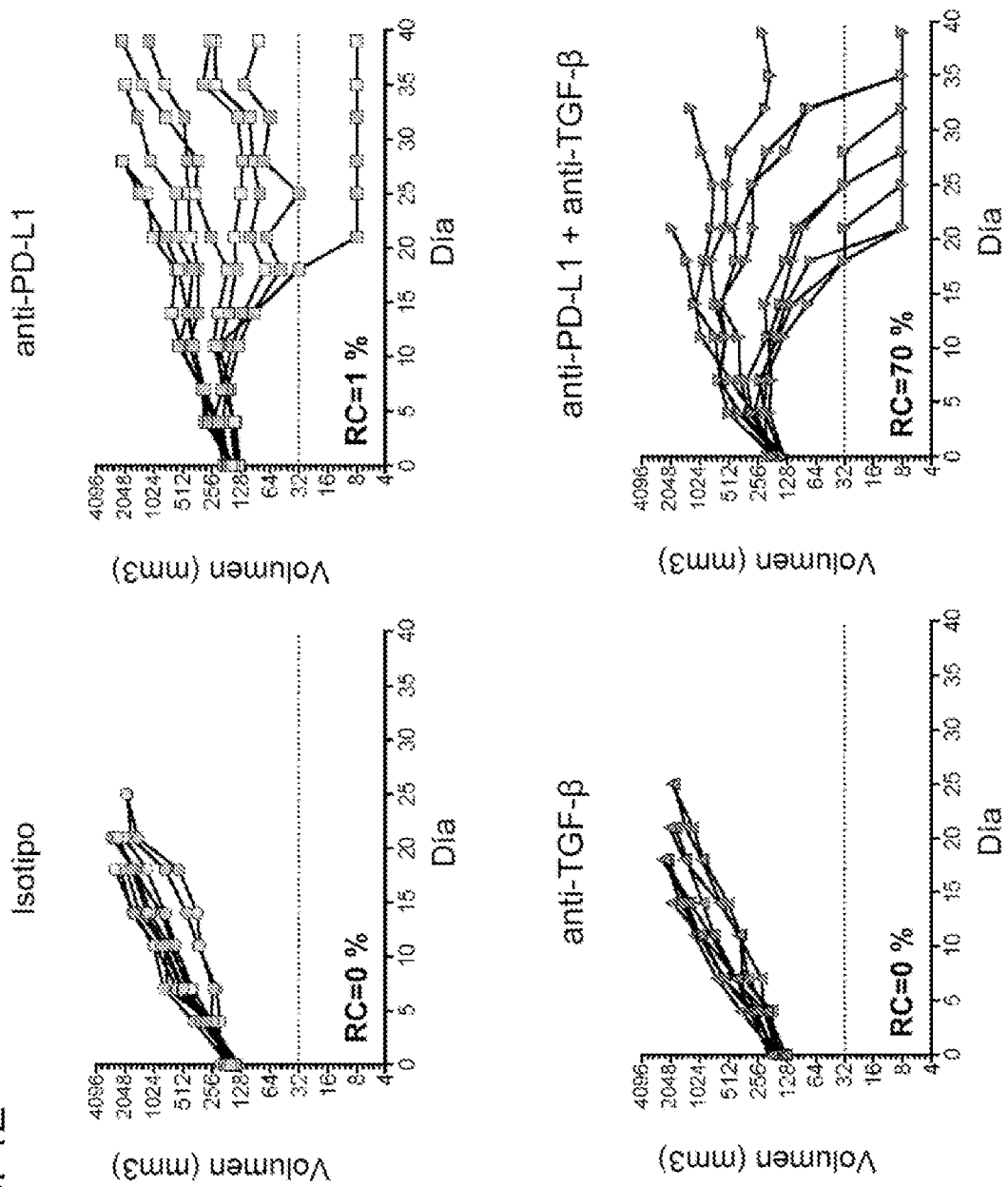


FIG. 4F

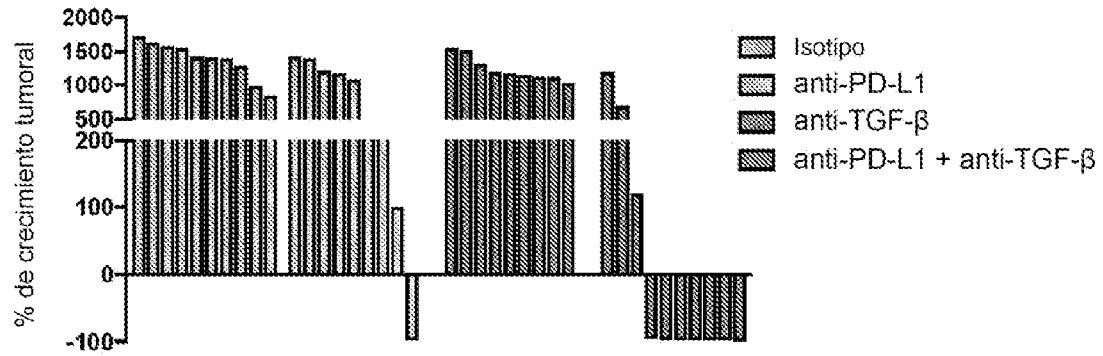


FIG. 4G

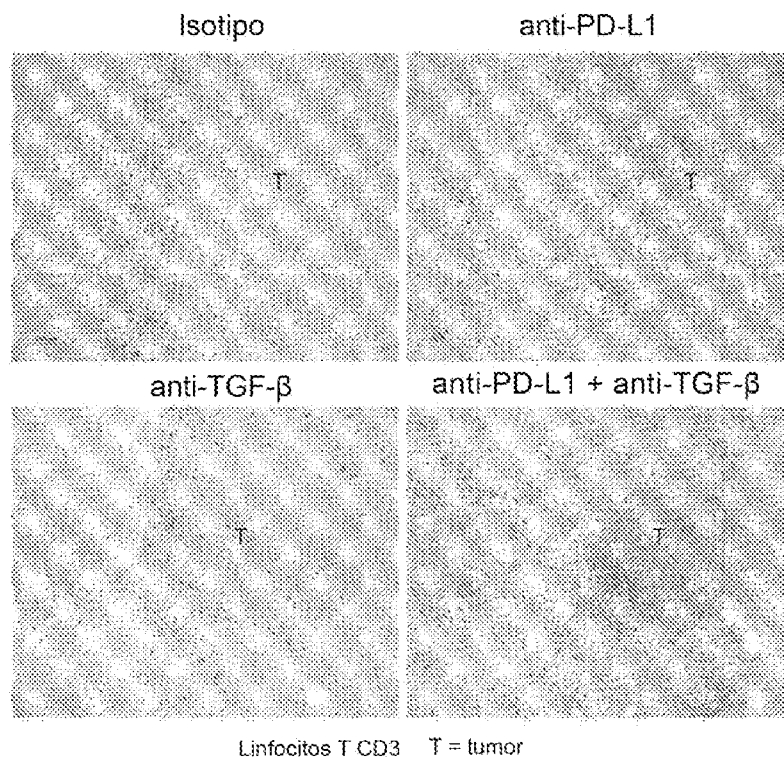


FIG. 4I

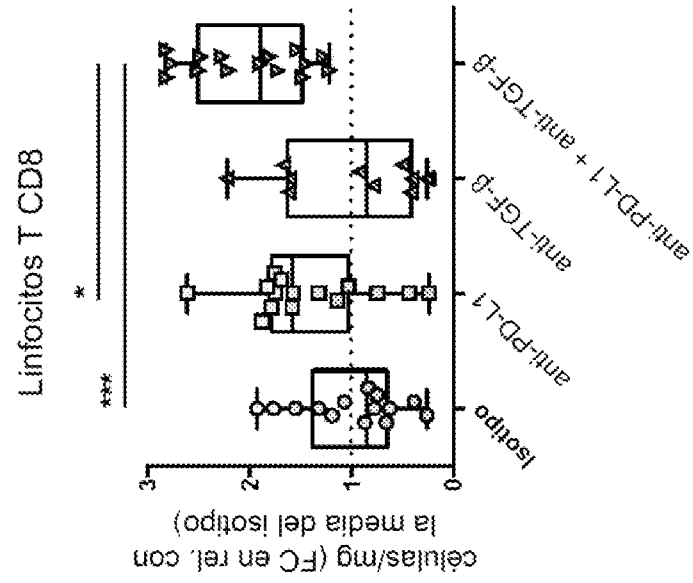


FIG. 4H

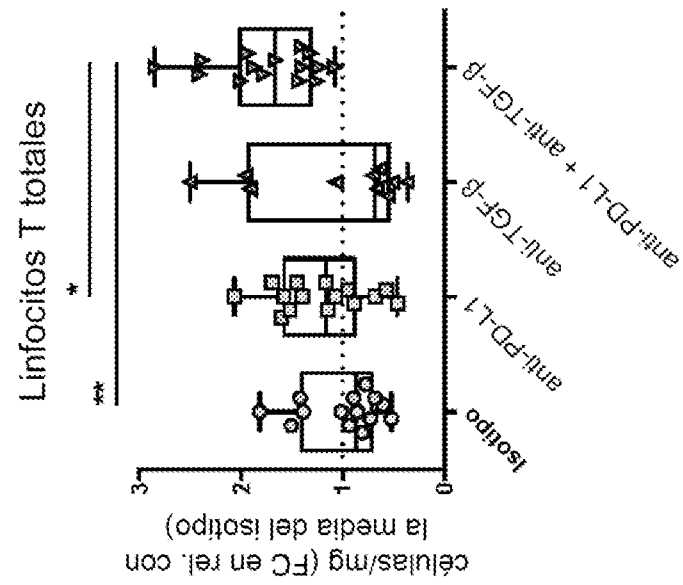


FIG. 4J

IFM de granzima B/linfocito T CD8

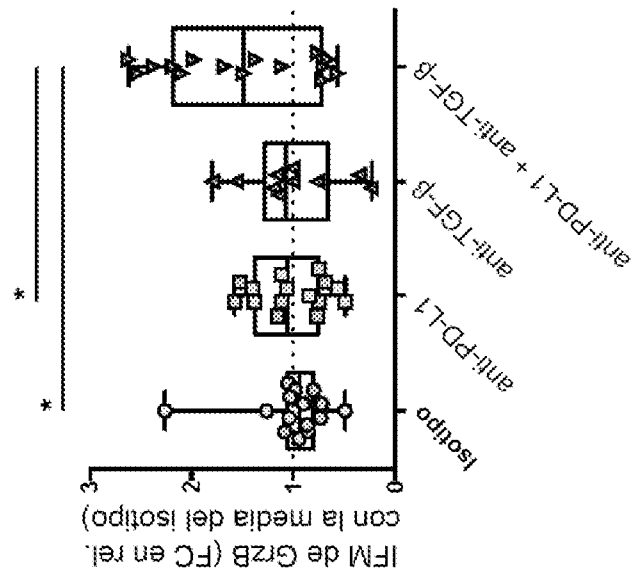


FIG. 4K

Localización de linfocitos T

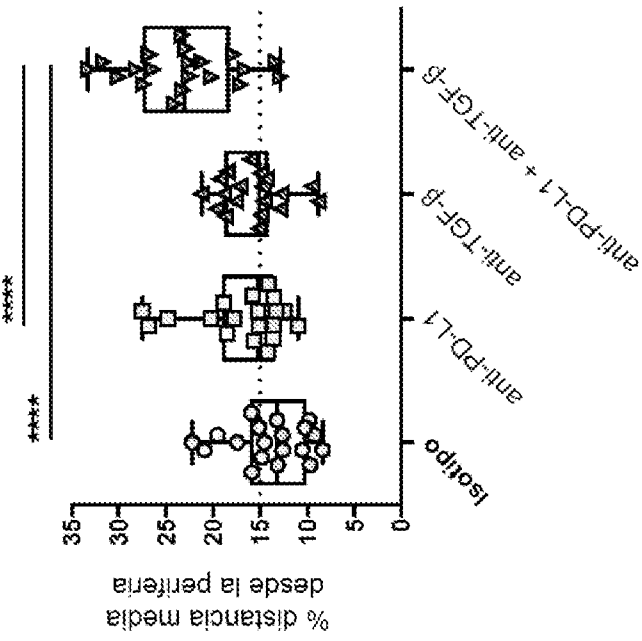


FIG. 4L

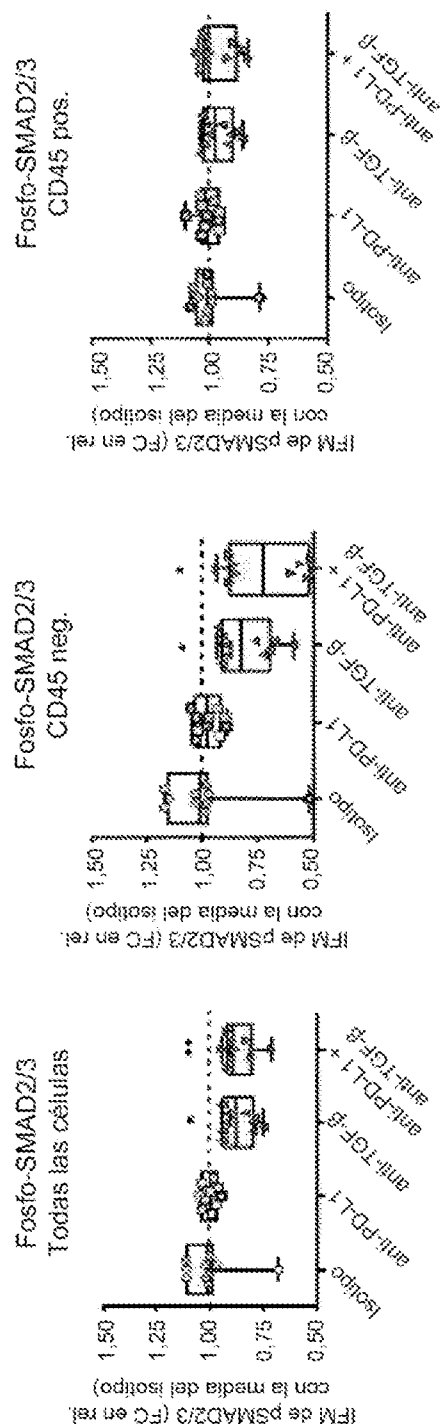


FIG. 4M

VEGfa plasmático

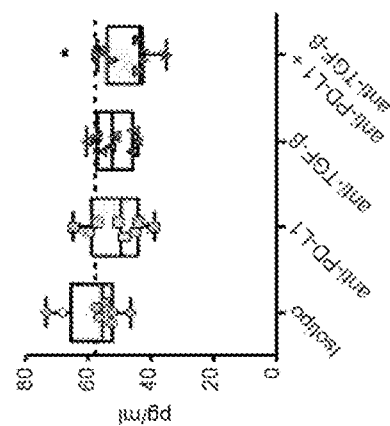


FIG. 4N

Granzima B+ linfocitos T CD8

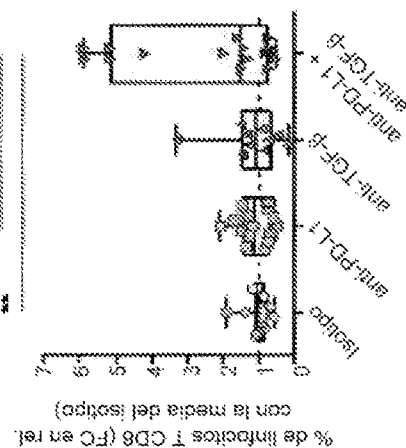




FIG. 40

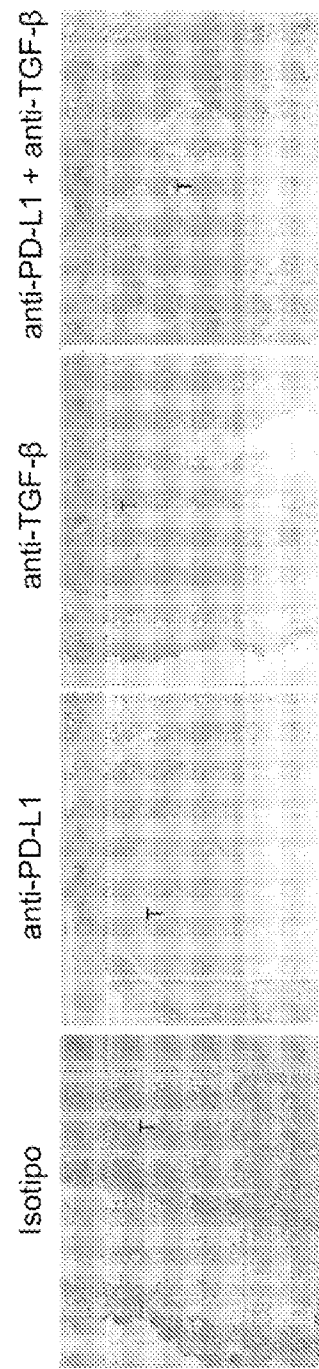


FIG. 4Q

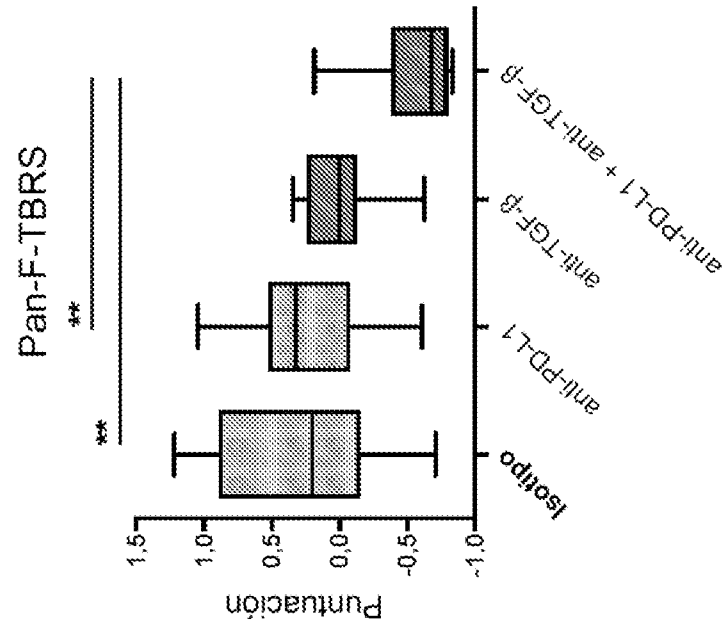


FIG. 4P

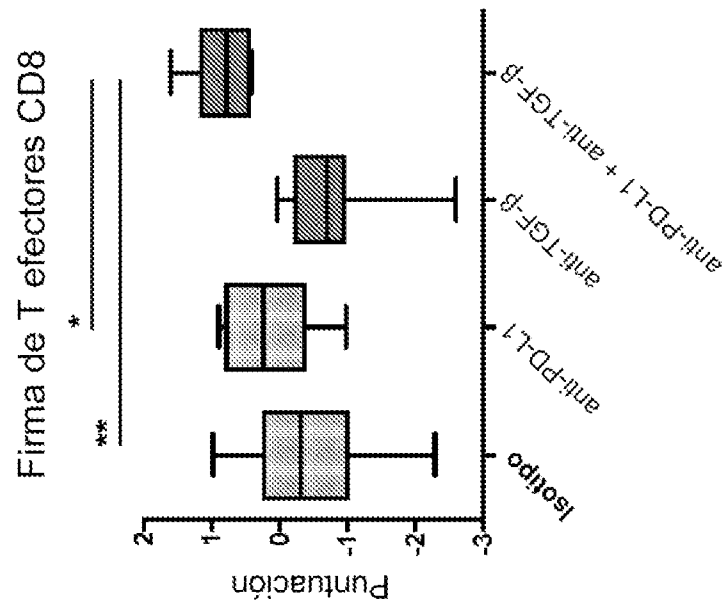


FIG. 4R

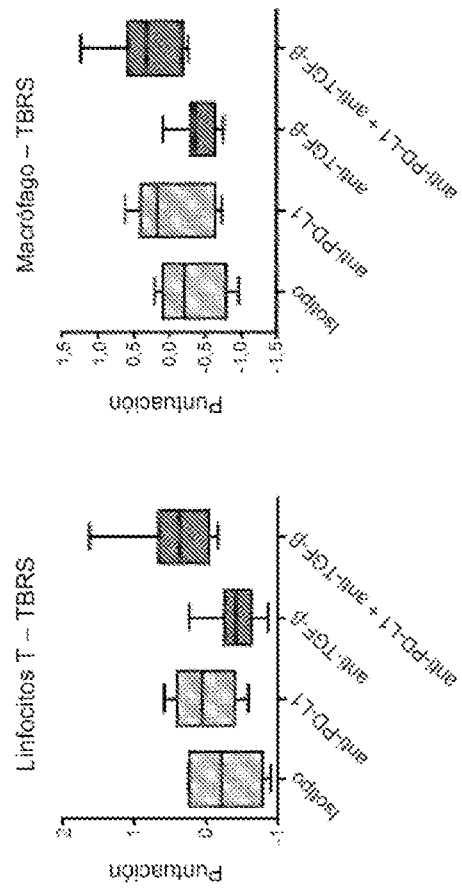


FIG. 4S

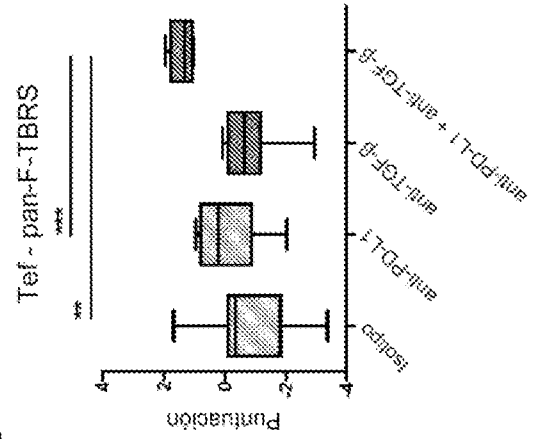


FIG. 4T

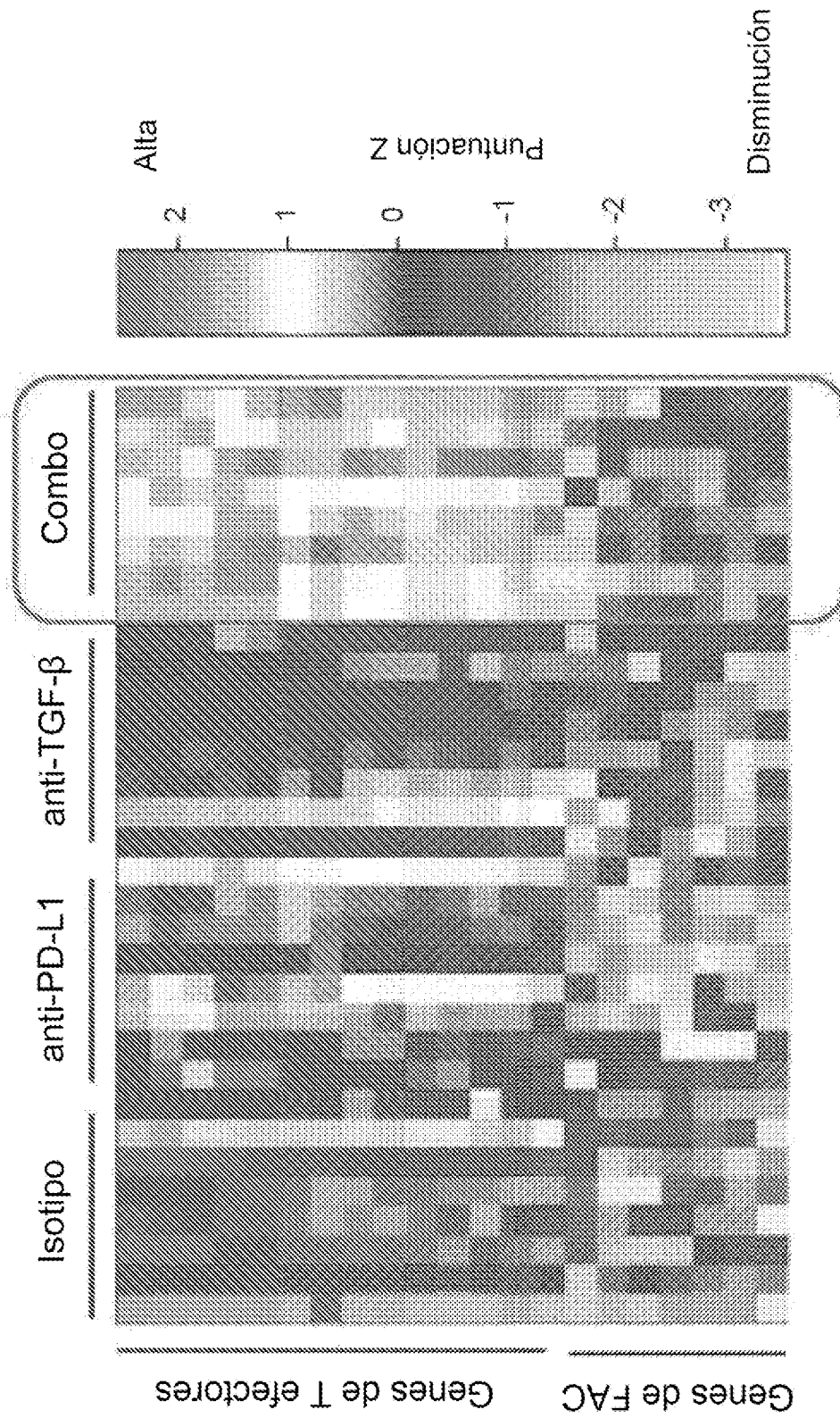


FIG. 4U

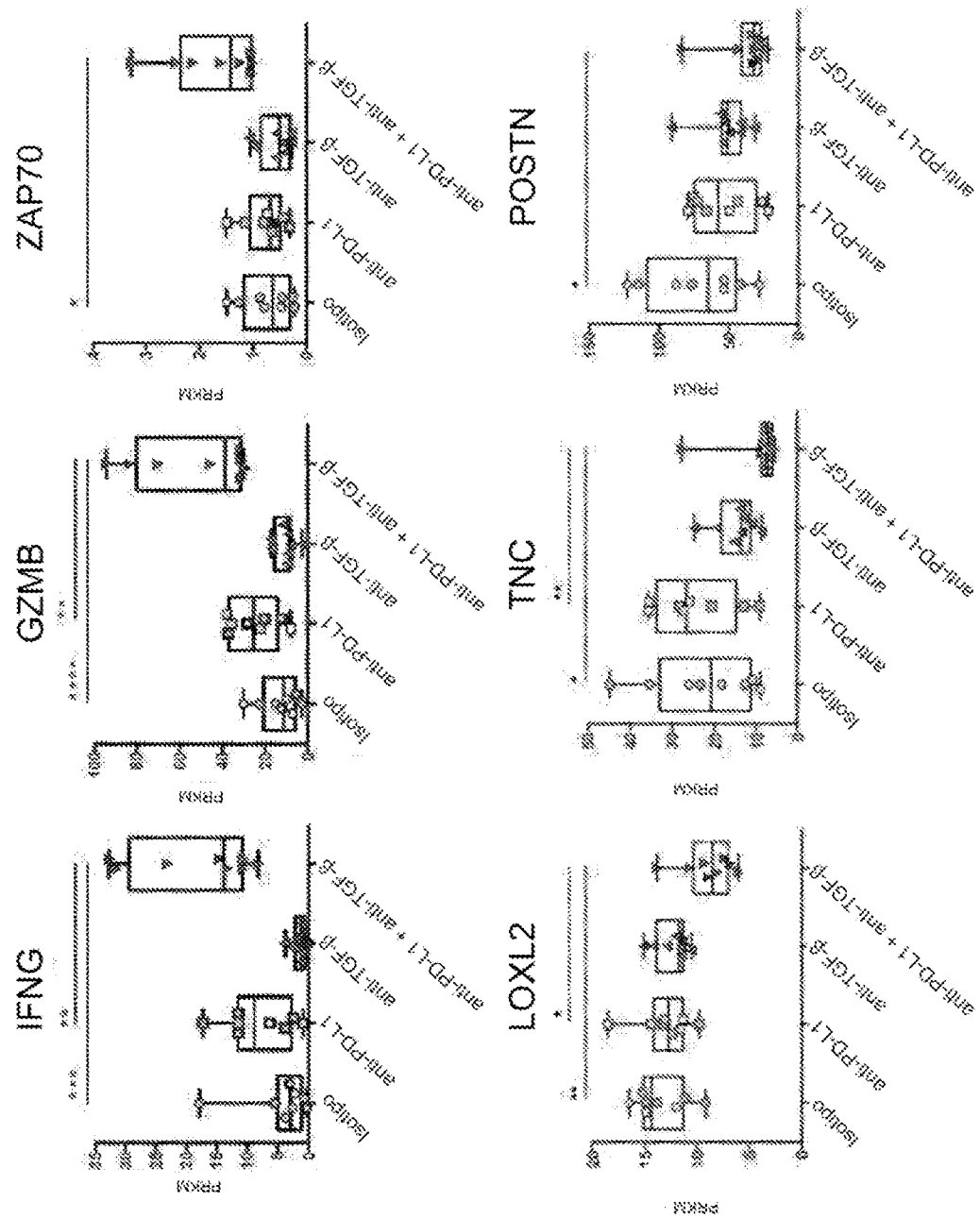


FIG. 5

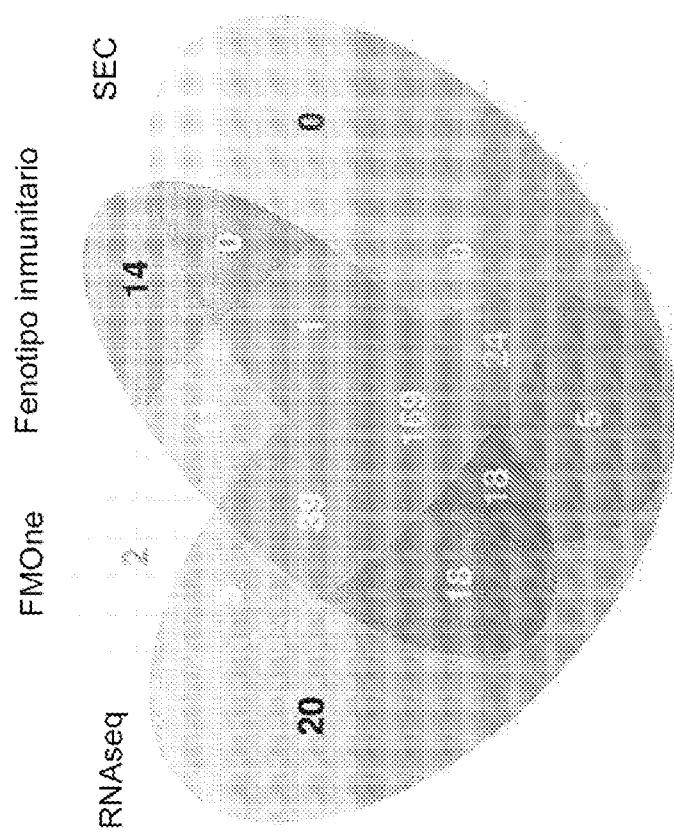


FIG. 6A

CaCR (TCGA)

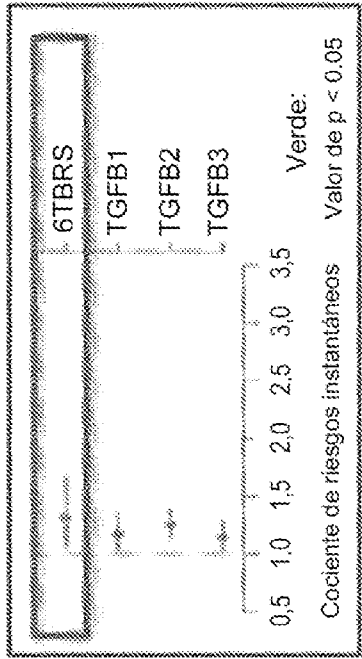


FIG. 6B

UBC de IMVigor

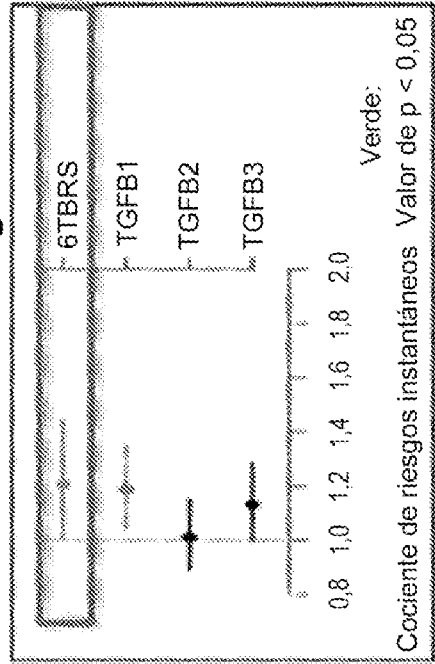


FIG. 6C

CPNM de POPLAR

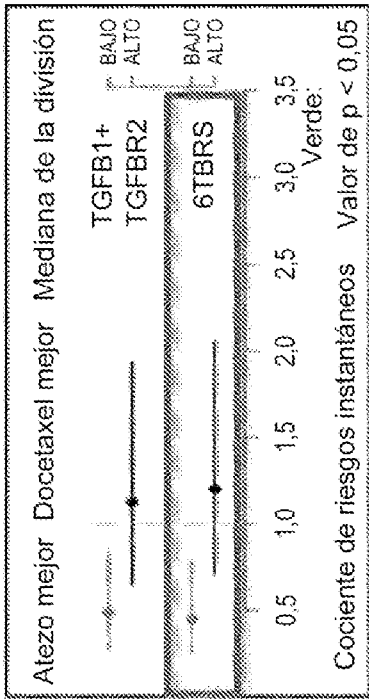


FIG. 7A

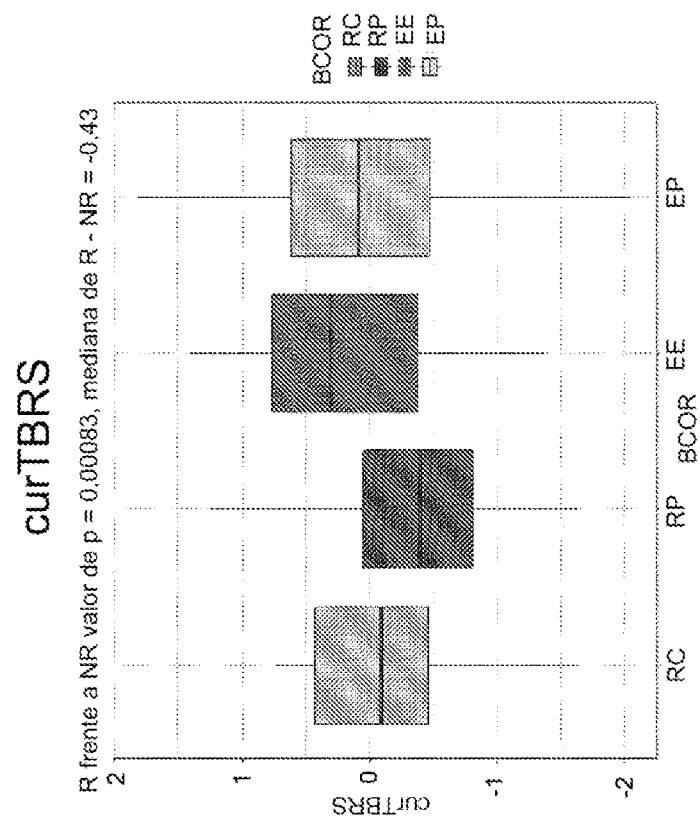


FIG. 7B

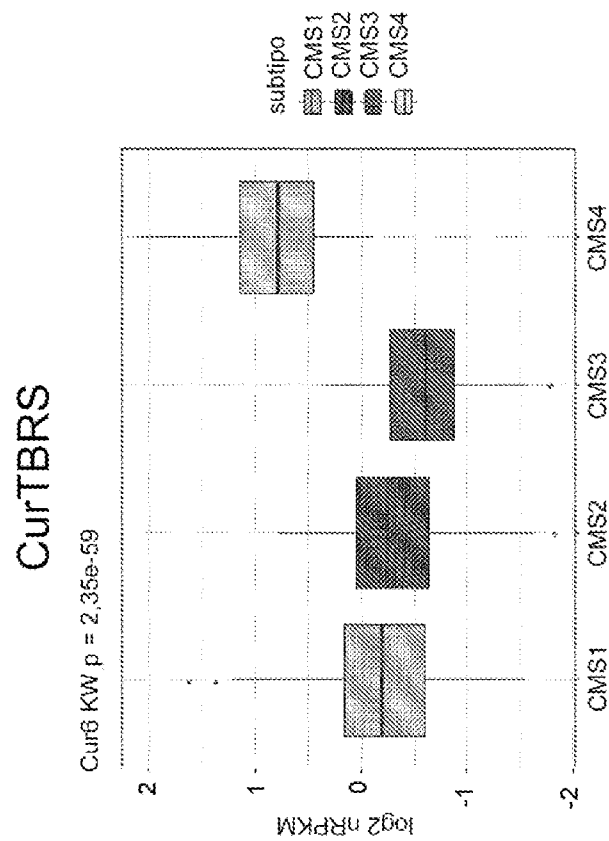




FIG. 8A

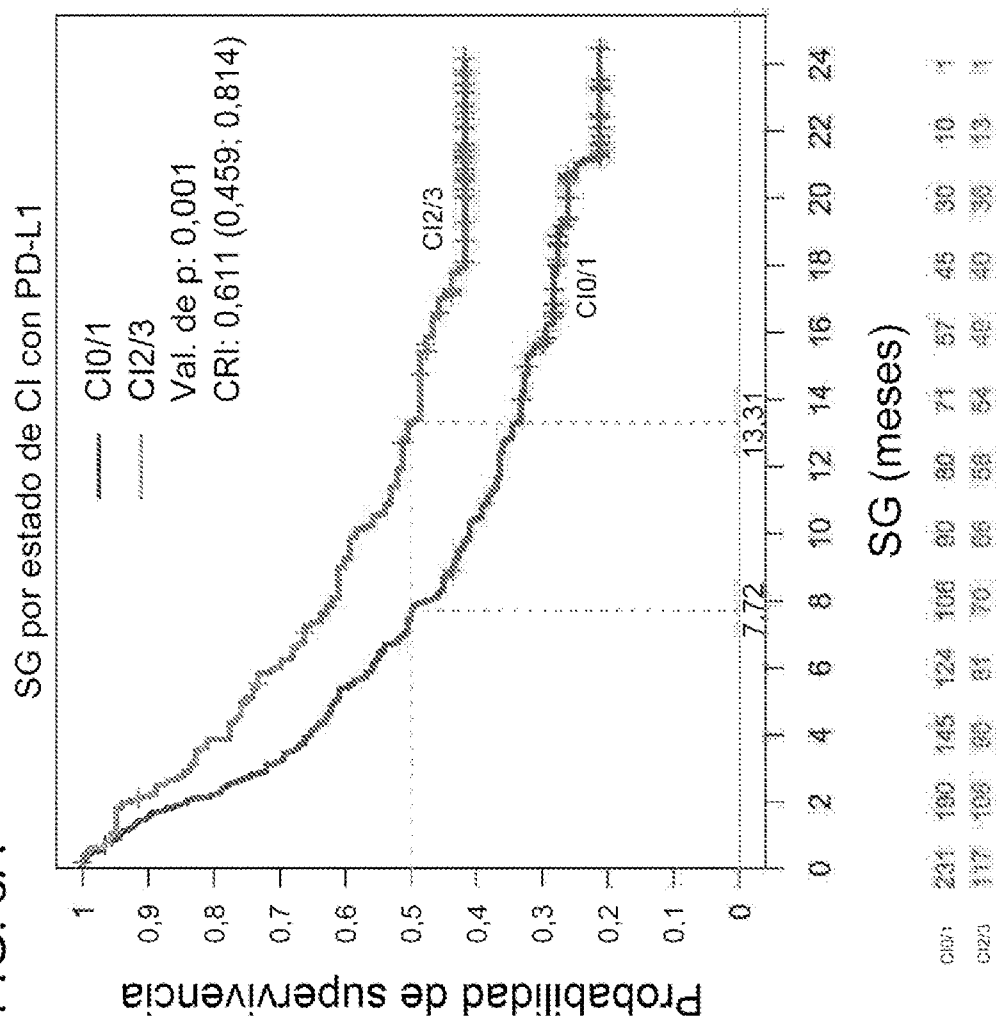


FIG. 8B

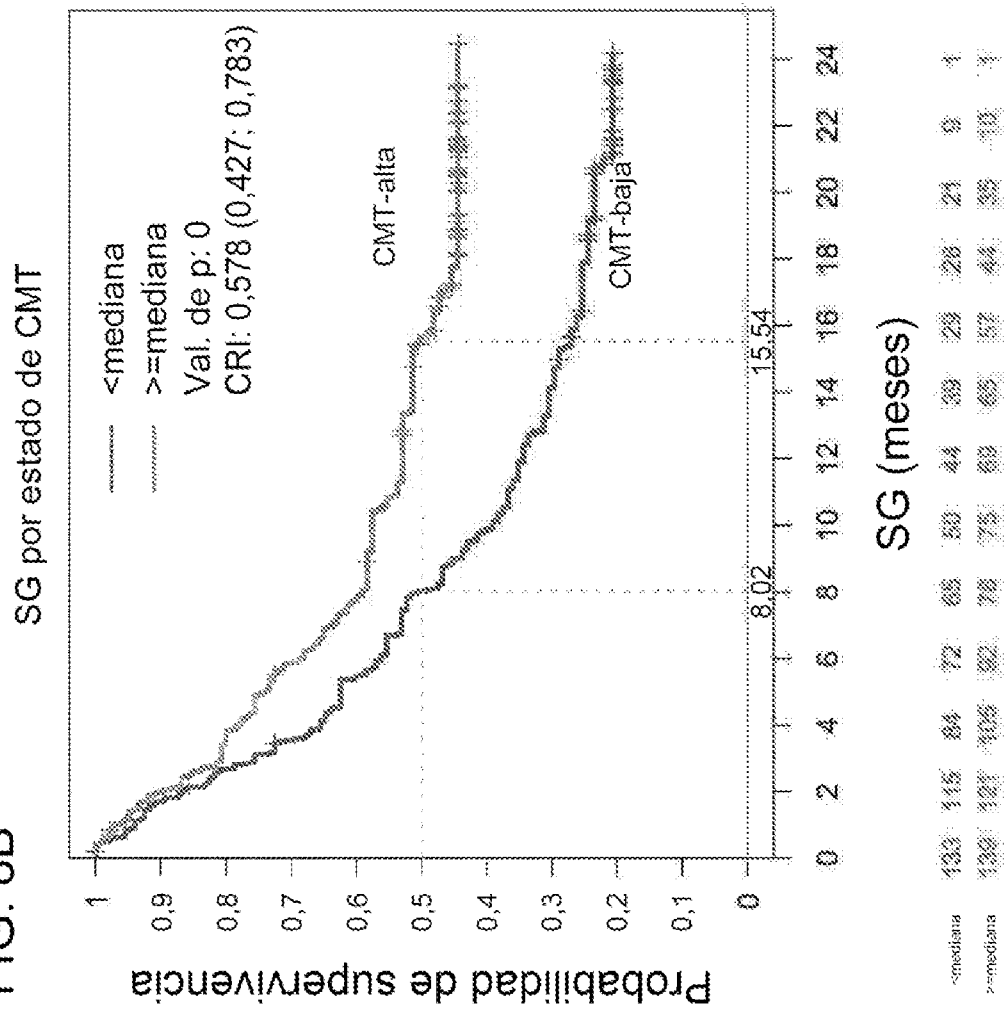


FIG. 8C SG por estado de CI con PD-L1 y CMT combinadas

