

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 835 866**

(51) Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)  
**G01N 33/574** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**C12Q 1/6886** (2008.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 43/00** (2006.01)  
**A61P 11/00** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA  
TRAS OPOSICIÓN

T5

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.05.2016 PCT/US2016/032112**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2016 WO16183326**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2016 E 16724821 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **20.03.2024 EP 3294770**

---

(54) Título: **Procedimientos terapéuticos y de diagnóstico para el cáncer**

(30) Prioridad:

**12.05.2015 US 201562160561 P**  
**29.05.2015 US 201562168700 P**

(73) Titular/es:

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

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:  
**02.12.2024**

(72) Inventor/es:

**KOWANETZ, MARCIN**

(74) Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

## DESCRIPCIÓN

Procedimientos terapéuticos y de diagnóstico para el cáncer

**5 CAMPO DE LA INVENCIÓN**

En el presente documento se proporcionan procedimientos de diagnóstico y composiciones terapéuticas para el carcinoma de pulmón no microcítico.

**10 ANTECEDENTES**

El cáncer sigue siendo una de las amenazas más mortales para la salud humana. En los 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, representando aproximadamente 1 de cada 4 muertes. Por ejemplo, el cáncer de pulmón es la forma más común de 15 cáncer y la principal causa de muerte por cáncer entre las mujeres estadounidenses. También se predice que el cáncer puede superar a las cardiovasculopatías como la primera causa de muerte en cinco años. Los tumores sólidos son responsables de la mayoría de estas muertes. Aunque han existido avances significativos en el tratamiento médico de determinados cánceres, la tasa de supervivencia global a los 5 años para todos los cánceres ha mejorado solo en 20 aproximadamente un 10 % en los últimos 20 años. Los cánceres, o tumores malignos, metastatizan y crecen rápidamente de manera incontrolada, lo que hace que la detección y el tratamiento a tiempo sean extremadamente difíciles.

El ligando de muerte programada 1 (PD-L1) es una proteína que ha estado implicada en la supresión de las respuestas del sistema inmunitario durante infecciones crónicas, embarazo, aloinjertos de tejido, enfermedades autoinmunitarias 25 y cáncer. El PD-L1 regula la respuesta inmunitaria uniéndose a un receptor inhibidor, conocido como muerte programada 1 (PD-1), que se expresa en la superficie de los 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, dando como resultado la posterior regulación por disminución de la activación de los linfocitos T y la supresión de la actividad 30 inmunitaria antitumoral.

El documento WO 2014/151006 divulga que la expresión de PD-L1 es indicativa de una mayor probabilidad de respuesta de los pacientes de cáncer al tratamiento anti-eje PD-L1.

35 A pesar del avance significativo en el tratamiento del cáncer, todavía se buscan tratamientos y procedimientos de diagnóstico mejorados.

## SUMARIO DE LA INVENCIÓN

40 La presente invención proporciona procedimientos de diagnóstico y composiciones terapéuticas para el carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM).

En un aspecto, la invención presenta un antagonista de unión a PD-L1 para su uso en el tratamiento de un paciente 45 que padece un carcinoma de pulmón no microcítico, en el que se ha determinado que una muestra de tumor obtenida del paciente tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en un 50 % o más de las células tumorales en la muestra de tumor, en el que el antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo, en el que el anticuerpo es atezolizumab, y en el que el nivel de expresión de PD-L1 es un nivel de expresión de proteínas. En algunos modos de realización, la muestra de tumor obtenida del paciente tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprenden menos de un 10 % de la muestra.

50 En otro aspecto, la invención presenta un procedimiento para determinar si es probable que un paciente que padece un carcinoma de pulmón no microcítico responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión a PD-L1, comprendiendo el procedimiento: determinar el nivel de expresión de PD-L1 en células tumorales en una muestra de tumor obtenida del paciente, en el que un nivel de expresión detectable de PD-L1 en un 50 % o más de las células 55 tumorales en la muestra de tumor indica que es probable que el paciente responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión a PD-L1, en el que el antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo, en el que el anticuerpo es atezolizumab, y en el que el nivel de expresión de PD-L1 es un nivel de expresión de proteínas.

60 En otro aspecto, la invención presenta un procedimiento para predecir la reactividad de un paciente que padece un carcinoma de pulmón no microcítico al tratamiento que comprende un antagonista de unión a PD-L1, comprendiendo el procedimiento: determinar el nivel de expresión de PD-L1 en células tumorales en una muestra de tumor obtenida del paciente, en el que un nivel de expresión detectable de PD-L1 en un 50 % o más de las células tumorales en la muestra de tumor indica que es probable que el paciente responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión a PD-L1, en el que el antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo, en el que el anticuerpo es atezolizumab, 65 y en el que el nivel de expresión de PD-L1 es un nivel de expresión de proteínas.

En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además determinar el nivel de expresión de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor en la muestra de tumor obtenida del paciente. En algunos modos de realización, la muestra de tumor obtenida del paciente tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprenden menos de un 10 % de la muestra.

5 En algunos modos de realización de cualquiera de los aspectos precedentes, se ha determinado que la muestra de tumor obtenida del paciente tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprenden un 10 % o más de la muestra de tumor.

10 En otro aspecto, la invención presenta un procedimiento para seleccionar un tratamiento para un paciente que padece un carcinoma de pulmón no microcítico, comprendiendo el procedimiento: determinar el nivel de expresión de PD-L1 en células tumorales en una muestra de tumor obtenida del paciente, y seleccionar un tratamiento que comprende un antagonista de unión a PD-L1 para el paciente en base a un nivel de expresión detectable de PD-L1 en un 50 % o más de las células tumorales en la muestra de tumor, en el que el antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo, en el que el anticuerpo es atezolizumab, y en el que el nivel de expresión de PD-L1 es un nivel de expresión de proteínas. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además determinar el nivel de expresión de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor en la muestra de tumor obtenida del paciente. En algunos modos de realización, la muestra de tumor obtenida del paciente tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprenden menos de un 10 % de la muestra.

15 20 En algunos modos de realización de cualquiera de los aspectos precedentes, la muestra de tumor obtenida del paciente comprende una población de fibroblastos y/o miofibroblastos. En algunos modos de realización, la muestra de tumor obtenida del paciente comprende un estroma deficiente en células y/o colagenizado. En algunos modos de realización, la muestra de tumor tiene un nivel de expresión incrementado de colágeno, STAT1 o MEK en relación con una muestra de tumor de referencia.

25 30 35 El antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a uno o más de sus compañeros de unión a ligando. El antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1. El antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a B7-1. El antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 tanto a PD-1 como a B7-1. El anticuerpo es MPDL3280A (atezolizumab). El anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de HVR-H1 de SEQ ID NO:19, la secuencia de HVR-H2 de SEQ ID NO:20 y la secuencia de HVR-H3 de SEQ ID NO:21; y una cadena ligera que comprende la secuencia de HVR-L1 de SEQ ID NO:22, la secuencia de HVR-L2 de SEQ ID NO:23 y la secuencia de HVR-L3 de SEQ ID NO:24. El anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4.

40 45 En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos precedentes, el procedimiento comprende además administrar al paciente una cantidad eficaz de un segundo agente terapéutico. En algunos modos de realización, el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un agente citotóxico, un agente inhibidor del crecimiento, un agente radioterápico, un agente antiangiogénico y combinaciones de los mismos. En algunos modos de realización, el carcinoma de pulmón no microcítico es un carcinoma de pulmón no microcítico localmente avanzado o metastásico.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

50 55 60 En algunos modos de realización de cualquiera de los aspectos precedentes, la muestra de tumor es una muestra de tumor fijada con formol e incluida en parafina (FFPE), una muestra de tumor de archivo, una muestra de tumor en fresco o una muestra de tumor congelada. El nivel de expresión de PD-L1 es un nivel de expresión de proteínas. En algunos modos de realización, el nivel de expresión de proteínas de PD-L1 se determina usando un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en inmunohistoquímica (IHQ), inmunofluorescencia, citometría de flujo e inmunoelectrotransferencia. En algunos modos de realización, el nivel de expresión de proteínas de PD-L1 se determina usando IHQ. En algunos modos de realización, el nivel de expresión de proteínas de PD-L1 se detecta usando un anticuerpo anti-PD-L1.

65 70 75 La FIGURA 1A es una tabla que muestra que PD-L1 se expresa ampliamente en diversos cánceres humanos. La expresión de PD-L1 se evaluó por inmunohistoquímica (IHQ) en células inmunitarias infiltrantes de tumor ("CI") y en células tumorales ("CT"). CI2/3 indica una puntuación IHQ en CI de 2 o 3 (véase la tabla 2). CT2/3 indica una puntuación IHQ en CT de 2 o 3 (véase la tabla 3).

80 85 90 Las FIGURAS 1B-1D son imágenes que muestran cortes de muestras de tumor de carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM) representativos analizadas por IHQ para determinar la expresión de PD-L1. La figura 1B muestra una muestra que es positiva para PD-L1 en células tumorales, la figura 1C muestra una muestra que es positiva para PD-L1 en células tumorales y en células inmunitarias infiltrantes de tumor y la figura 1D muestra una muestra que es positiva para PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor.

95 La FIGURA 2A es una tabla que muestra que existió solapamiento mínimo de los criterios de diagnóstico de IHQ con

CI3 y CT3 (véanse la tabla 2 y la tabla 3, respectivamente) en muestras de tumor de CPNM como se determina en un ensayo clínico de fase II en curso. N=287.

- 5 La FIGURA 2B es una serie de diagramas de Venn que muestran la prevalencia y solapamiento de los criterios de diagnóstico de IHQ en CI y CT en diferentes puntos de corte para muestras de tumor de CPNM en un ensayo de fase II (fase II-2) en curso. CI2/3 indica una puntuación IHQ en CI de 2 o 3 (véase la tabla 2). CT2/3 indica una puntuación IHQ en CT de 2 o 3 (véase la tabla 3). CI1/2/3 indica una puntuación IHQ en CI de 1, 2 o 3 (véase la tabla 2). CT1/2/3 indica una puntuación IHQ en CT de 1, 2 o 3 (véase la tabla 3).
- 10 La FIGURA 3A es una tabla que muestra que la expresión de PD-L1 (como se evalúa por IHQ usando un anticuerpo anti-PD-L1 de diagnóstico) en células inmunitarias infiltrantes de tumor o en células tumorales predijo independientemente los resultados del tratamiento con el anticuerpo anti-PD-L1 MPDL3280A en carcinoma de pulmón no microcítico en un ensayo clínico de fase II en curso. Se muestra la tasa de respuesta global (TRG) para pacientes que tienen la puntuación IHQ para PD-L1 indicada. "CI3" indica pacientes en los que sus tumores se puntuaron como CI3 y puede incluir cualquier valor para CT (es decir, CT0/1/2/3). "CT3" indica pacientes en los que sus tumores se puntuaron como CT3 y puede incluir cualquier valor para CI (es decir, CI0/1/2/3). "CT3 o CI3" indica pacientes en los que sus tumores se puntuaron como CT3 o bien CI3. La muestra de tumor de un paciente tenía tanto una puntuación CT3 como CI3.
- 15 La FIGURA 3B es una tabla que muestra los resultados de eficacia de un ensayo clínico de fase II (fase II-1) en curso como se determina por RECISTm. Se muestran la TRG confirmada, duración de la respuesta (DR) y supervivencia sin progresión (SSP) a los 6 meses para las cohortes indicadas. <sup>a</sup>Dos pacientes tenían un estado CI/CT desconocido. <sup>b</sup>A menos que se indique, aún no se ha alcanzado la mediana.
- 20 La FIGURA 3C es una tabla que muestra los resultados de eficacia de un ensayo clínico de fase II (fase II-1) en curso como se determina por RECIST v1.1. Se muestran la TRG confirmada, duración de la respuesta (DR) y supervivencia sin progresión (SSP) a los 6 meses para las cohortes indicadas. <sup>a</sup>Dos pacientes tenían un estado CI/CT desconocido. <sup>b</sup>Aún no se han alcanzado las medianas. Mets., metástasis.
- 25 La FIGURA 3D es una tabla que muestra que la expresión de PD-L1 (como se evalúa por IHQ usando un anticuerpo anti-PD-L1 de diagnóstico) en células inmunitarias infiltrantes de tumor o en células tumorales predijo una supervivencia global mejorada en pacientes con CPNM tratados con atezolizumab (MDPL3280A) en un ensayo clínico de fase II (fase II-2) en curso. IT, intención de tratar.
- 30 La FIGURA 3E es una tabla que muestra que la expresión de PD-L1 (como se evalúa por IHQ usando un anticuerpo anti-PD-L1 de diagnóstico) en células inmunitarias infiltrantes de tumor o en células tumorales predijo una supervivencia sin progresión mejorada en pacientes con CPNM tratados con atezolizumab (MPDL3280A). Se muestra una comparación con los pacientes con CPNM en el ensayo que se trajeron con docetaxel.
- 35 La FIGURA 3F es una tabla que muestra que la expresión de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor o en células tumorales en muestras de tumor de pacientes con CPNM predijo la respuesta (como se evalúa por la TRG) de pacientes con CPNM al tratamiento con el anticuerpo anti-PD-L1 MPDL3280A en un ensayo clínico de fase II (fase II-2) en curso.
- 40 La FIGURA 4 es un gráfico que muestra que la presencia de células inmunitarias infiltrantes de tumor es necesaria, pero no suficiente, para reflejar la positividad para PD-L1 en los criterios de diagnóstico de IHQ en CI.
- 45 La FIGURA 5A es un gráfico que muestra que el infiltrado inmunitario está presente en pacientes con CT3 pero, en gran medida, es negativo para PD-L1 por IHQ. El gráfico muestra el porcentaje de infiltrado de células inmunitarias total por masa tumoral. La imagen a la izquierda es un corte representativo que se puntuó como CT3, mientras que la imagen a la derecha del gráfico es un corte representativo que se puntuó como CI3.
- 50 Las FIGURAS 5B-5C son gráficos que muestran el nivel de expresión de ARNm de CD68 (figura 5B) y CD8 (figura 5C) en pacientes con CPNM incluidos en un ensayo clínico de fase II en curso y un ensayo clínico de fase 2 en curso. Neg., negativo para PD-L1.
- 55 Las FIGURAS 6A-6B son gráficos que muestran que los tumores de CPNM con CT3 y CI3 tenían distinta histopatología como se evalúa por tinción con hematoxilina y eosina (H y E). La figura 6A muestra la puntuación histopatológica para tumores con CT3, mientras que la figura 6B muestra la puntuación histopatológica para tumores con CI3. Los tumores con CT3 presentaron un microentorno tumoral desmoplásico con pocas células inmunitarias infiltrantes de tumor intraepiteliales y estromales, mientras que los tumores con CI3 presentaron la presencia de células inmunitarias infiltrantes de tumor intraepiteliales o estromales. La "actividad en la interfase de CI" indica los infiltrados de células inmunitarias inmunitarias en la interfase tumor/estroma. "CI intraepiteliales" indica la presencia de infiltrados de células inmunitarias intraepiteliales. "ELT de CI" indica la presencia de folículos linfáticos terciarios. "Otras CI estromales" indica la presencia de células inmunitarias en el estroma. "Desmoplasia" indica la presencia de una población de fibroblastos celulares y "activados" (miofibroblastos). "Reacción esclerótica" indica la presencia de un estroma deficiente en

células/colagenizado. "Vasos incrementados/cualitativos" indica la presencia de vasos sanguíneos puntuados cualitativamente. Las muestras procedían de un ensayo clínico de fase II en curso.

5 La FIGURA 7 es un gráfico que muestra que los tumores de CPNM con CT3 tuvieron mayor expresión de colágeno (*COL6A1*) en comparación con los tumores negativos para PD-L1 ("negativos"), tumores con CI3 o tumores con CT3 y CI3. Las imágenes debajo del gráfico son cortes representativos de muestras de tumor con CT3 para PD-L1.

10 La FIGURA 8 es una matriz cromática que muestra el agrupamiento jerárquico de la expresión de conjuntos de genes inmunitarios en los subtipos CT/CI para PD-L1.

10 Las FIGURAS 9A-9B son una serie de gráficos que muestran niveles de expresión de ARNm incrementados de *CD8* (figura 9A) y *CXCL9* (figura 9B) en tumores de CPNM con CI3 en comparación con tumores con CT3 y tumores negativos para PD-L1 (CT0 y CI0).

15 Las FIGURAS 10A-10B son una serie de gráficos que muestran niveles de expresión incrementados de STAT1 y MEK en tumores con CT3 en comparación con tumores negativos para PD-L1, tumores con CI3 y tumores con CT3 y CI3. Los datos proceden de pacientes incluidos en un ensayo clínico de fase Ia en curso y un ensayo clínico de fase II en curso.

20 La FIGURA 10C es un gráfico que muestra que los niveles de expresión de JAK1 fueron mayores en los tumores positivos para PD-L1 en comparación con los tumores negativos para PD-L1.

25 La FIGURA 10D es una imagen de una inmunoelectrotransferencia que muestra que, a pesar de la señalización por STAT activa, algunas líneas de células tumorales no regularon por incremento PD-L1 en respuesta al interferón gamma (IFNy).

30 La FIGURA 11 es una tabla que muestra la prevalencia de los criterios de diagnóstico de IHQ para PD-L1 indicados (véanse la tabla 2 y tabla 3) en CPNM con adyuvante, 1L y 2L+. El diagrama de Venn debajo del gráfico muestra que los tumores con CT3 y CI3 representan distintas subpoblaciones en CPNM, con menos de un 1 % de solapamiento.

35 Las FIGURAS 12A-12B son gráficos que muestran que los tumores de CPNM con CI3 se caracterizaron por mayor expresión de firmas en linfocitos B (figura 12A) y firmas en linfocitos citolíticos naturales (NK) (figura 12B). Estos datos proceden de pacientes en un ensayo clínico de fase Ia en curso y en un ensayo clínico de fase II en curso.

40 Las FIGURAS 13A-13C son gráficos que muestran que los tumores de CPNM positivos para PD-L1 mostraron expresión incrementada de firmas génicas en linfocitos T efectores ( $T_{eff}$ ) en comparación con los tumores negativos para PD-L1.

45 La FIGURA 13D es un gráfico que muestra que los tumores de CPNM con CI3 se caracterizaron por expresión incrementada de la firma génica en  $T_{eff}$  como se determina por secuenciación de ARN. En este análisis, el subgrupo con CT3 excluyó a los tumores con CI2/3, mientras que el subgrupo con CI3 excluyó a los tumores con CT2/3.

50 Las FIGURAS 13E-13G son una serie de gráficos que muestran que los tumores de CPNM con CI3 se caracterizaron por expresión incrementada de *IFNG* (figura 13E), *GZMB* (figura 13F) y *CXCL9* (figura 13G) como se determina por secuenciación de ARN. En este análisis, el subgrupo con CT3 excluyó a los tumores con CI2/3, mientras que el subgrupo con CI3 excluyó a los tumores con CT2/3.

55 Las FIGURAS 14A-14B son gráficos que muestran que el tratamiento de pacientes con CPNM con el anticuerpo anti-PD-L1 MPDL3280A dio como resultado un nivel plasmático incrementado de los marcadores asociados a IFNy interleucina 18 (IL-18) (figura 14A) e ITAC (figura 14B). Los gráficos muestran el factor de cambio como  $\log_2$  en relación con la predosis de C1D1. C indica ciclo y D indica día.

60 Las FIGURAS 15A-15C son gráficos que muestran una comparación entre los niveles de expresión de ARNm de PD-L1 (figura 15A), PD-L2 (figura 15B) y PD-1 (figura 15C) de referencia incrementados (como se determina usando un ensayo de NanoString) en leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PMBC) y la respuesta de los pacientes con CPNM al tratamiento con el anticuerpo anti-PD-L1 MPDL3280A.

65 Las FIGURAS 16A-16B son gráficos que muestran que los niveles de expresión de ARNm de referencia de genes de firmas en linfocitos NK (figura 16A) y células mielógenas (figura 16B) en PBMC se asociaron con la respuesta de pacientes con CPNM al tratamiento con el anticuerpo anti-PD-L1 MPDL3280A. Los niveles de expresión incrementados de firmas génicas en células mielógenas inmunodepresoras se asociaron con la progresión, mientras que los niveles de expresión incrementados de linfocitos NK citotóxicos se asociaron con la respuesta a MPDL3280A.

65 Las FIGURAS 17A-17B son gráficos que muestran la expresión de PD-L1 (figura 17A) y PD-L2 (figura 17B) en muestras de tumor de CPNM en pacientes con tumores con CT0 y CI0, tumores con CI3 y en tumores con CT3 como se determina por secuenciación de ARN. Los pacientes procedían del ensayo de fase II-2 y una cohorte no

perteneciente al ensayo (N=162). RPKM, lecturas por kilobase por millón de lecturas cartografiadas.

Las FIGURAS 18A-18B son gráficos que muestran que los tumores con CT3 expresan altos niveles de marcadores moleculares de estroma desmoplásico/esclerótico como se determina por secuenciación de ARN. La figura 18A muestra expresión incrementada del gen de colágeno COL6A1 en tumores con CT3 en comparación con tumores con CI3 y tumores con CT0 y CI0. La figura 18B muestra expresión incrementada del gen de colágeno COL6A2 en tumores con CT3 en comparación con tumores con CI3 y tumores con CT0 y CI0. En este análisis, el subgrupo con CT3 excluyó a los tumores con CI2/3, mientras que el subgrupo con CI3 excluyó a los tumores con CT2/3.

## 10 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCIÓN

### I. Introducción

### II. Definiciones

15 La presente invención proporciona procedimientos de diagnóstico y composiciones terapéuticas para el carcinoma de pulmón no microcítico. La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que la determinación de los niveles de expresión de los biomarcadores de la invención, por ejemplo, PD-L1, en muestras obtenidas de un paciente (por ejemplo, en células tumorales y en células inmunitarias infiltrantes de tumor en una muestra de tumor obtenida del paciente) es útil en el tratamiento de un paciente que padece cáncer, para el diagnóstico de un paciente que padece cáncer, para la determinación de si es probable que un paciente que tiene un cáncer responda al tratamiento con un tratamiento antineoplásico que incluye un antagonista de unión al eje PD-L1 que es el anticuerpo anti-PD-L1 MPDL3280A, para la optimización de la eficacia terapéutica de un tratamiento antineoplásico que incluye un antagonista de unión al eje PD-L1 que es el anticuerpo anti-PD-L1 MPDL3280A, y/o para la selección de pacientes para un tratamiento antineoplásico que comprende un antagonista de unión al eje PD-L1 que es el anticuerpo anti-PD-L1 MPDL3280A.

20 Se debe entender que los aspectos y modos de realización de la invención descrita en el presente documento incluyen "que comprende", "que consiste en" y "que consiste 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.

25 El término "aproximadamente" como se usa en el presente documento se refiere al intervalo de error normal para el valor respectivo fácilmente conocido por el experto en la técnica en este campo técnico. La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) modos de realización que se dirigen a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, la descripción que hace referencia a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X".

30 El término "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 PD-1, siendo un resultado una función de los linfocitos T restaurada o potenciada. 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).

35 45 El término "disfunción", en el contexto de la disfunción inmunitaria, se refiere a un estado de reactividad inmunitaria reducida a la estimulación antigénica. El término incluye los elementos comunes de tanto "agotamiento" y/o "anergia" en los que se puede producir el reconocimiento de antígeno, pero la respuesta inmunitaria consiguiente es ineficaz para controlar la infección o el crecimiento tumoral.

50 55 El término "disfuncional", como se usa en el presente documento, también incluye resistente o insensible al reconocimiento de antígeno, específicamente, la capacidad alterada de traducir el reconocimiento de antígeno en funciones efectoras de linfocitos T en dirección 3', tales como proliferación, producción de citocinas (por ejemplo, IL-2) y/o destrucción de células diana.

60 65 El término "anergia" se refiere al estado de falta de reactividad a la estimulación antigénica resultante de señales incompletas o insuficientes emitidas a través del receptor de linfocitos T (por ejemplo, incremento de Ca<sup>2+</sup> intracelular en ausencia de activación de Ras). La anergia de linfocitos T también puede dar como resultado, tras la estimulación con antígeno, la ausencia de coestimulación, dando como resultado que la célula se vuelva resistente a la activación posterior por el antígeno, incluso en el contexto de coestimulación. El estado insensible a menudo se puede anular por la presencia de interleucina 2. Los linfocitos T anárgicos no se someten a expansión clonal y/o adquieren funciones efectoras.

70 75 El término "agotamiento" se refiere al agotamiento de linfocitos T como un estado de disfunción de linfocitos T que surge de la señalización por TCR mantenida que se produce durante muchas infecciones crónicas y cáncer. Se distingue de la anergia en que no surge a través de una señalización incompleta o insuficiente, sino de una señalización

- mantenida. Se define por una función efectora deficiente, expresión mantenida de receptores inhibidores y un estado transcripcional distinto del de los linfocitos T efectores o de memoria funcionales. El agotamiento evita el control óptimo de la infección y los tumores. El agotamiento puede resultar de tanto las vías reguladoras negativas extrínsecas (por ejemplo, citocinas inmunorreguladoras), así como de las vías reguladoras (coestimuladoras) negativas intrínsecas celulares (PD-1, B7-H3, B7-H4, etc.).
- "Potenciación de la función de los linfocitos T" quiere decir inducir, provocar o estimular que un linfocito T tenga una función biológica mantenida o amplificada, o renovar o reactivar los linfocitos T agotados o inactivos. Los ejemplos de potenciación de la función de los linfocitos T incluyen: secreción incrementada de interferón y de los linfocitos T CD8+, proliferación incrementada, reactividad antigenica incrementada (por ejemplo, eliminación vírica, patógena o tumoral) en relación con dichos niveles antes de la intervención. En una divulgación, el nivel de potenciación es de al menos un 50 %, de forma alternativa, una potenciación de un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 120 %, 150 % o 200 %. La manera de medir esta potenciación es conocida por un experto en la técnica.
- 15 "Inmunidad tumoral" se refiere al proceso en el que los tumores evaden el reconocimiento y la eliminación inmunitarios. Por tanto, como concepto terapéutico, la inmunidad tumoral se "trata" cuando se atenúa dicha evasión y los tumores se reconocen y atacan por el sistema inmunitario. Los ejemplos de reconocimiento tumoral incluyen unión tumoral, reducción tumoral y eliminación tumoral.
- 20 "Inmunogenicidad" se refiere a la capacidad de una sustancia particular de provocar una respuesta inmunitaria. Los tumores son inmunógenos y la potenciación de la inmunogenicidad tumoral ayuda a la eliminación de las células tumorales por la respuesta inmunitaria. Los ejemplos de potenciación de la inmunogenicidad tumoral incluyen el tratamiento con un antagonista de unión al eje PD-L1.
- 25 Como se usa en el presente documento, un "antagonista de unión a PD-L1" es 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 sus compañeros de unión, tales como PD-1 y/o B7-1. En algunas divulgaciones, un antagonista de unión a PD-L1 es una molécula que inhibe la unión de PD-L1 a sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1 y/o B7-1. En algunas divulgaciones, los antagonistas de unión a PD-L1 incluyen anticuerpos anti-PD-L1 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos, antagonistas de molécula pequeña, antagonistas de polinucleótido y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L1 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-1 y/o B7-1. En una divulgación, un antagonista de unión a PD-L1 reduce la señal negativa mediada por o a través de proteínas de superficie celular expresadas en linfocitos T, y otras células, la señalización mediada a través de PD-L1 o PD-1 para hacer que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional. En el presente documento, el antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1 y el anticuerpo anti-PD-L1 es MPDL3280A (atezolizumab).
- 35 Los términos "ligando 1 de muerte programada" y "PD-L1" se refieren en el presente documento a un polipéptido PD-L1 de secuencia natural, variantes de polipéptido y fragmentos de un polipéptido de secuencia natural y variantes de 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.
- 40 45 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.
- 50 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 de polipéptido 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 de aminoácido 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 respecto a una secuencia de polipéptido PD-L1 de secuencia natural como se divulga en el presente documento. Habitualmente, los polipéptidos variantes 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 PD-L1 no tendrán más de una sustitución aminoacídica conservadora en comparación con una secuencia de polipéptido 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 de polipéptido PD-L1 natural.
- 60 65 "Polinucleótido" o "ácido nucleico", como se usa de manera intercambiable en el presente documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser

desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se pueda 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 bicanterio, ADN que incluye regiones mono- y bicanterias, ARN mono- y bicanterio y ARN que incluye regiones mono- y bicanterias, 5 moléculas hibridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarios o, más típicamente, bicanterios, o incluir regiones mono- y bicanterias. 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 10 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 15 están presentes, se puede conferir una modificación en la estructura de nucleótido 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 20 modificaciones incluyen, por ejemplo, "caperuzas", sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con 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 intercaladores (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 anoméricos), así como formas no modificadas del/de los 25 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 30 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 desoxiribosa que, en general, son conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-acido-ribosa, análogos de glúcidos carbocíclicos, glúcidos α-anoméricos, glúcidos epiméricos, tales como arabinosa, xilosas o lixosas, glúcidos de piranosa, glúcidos de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos nucleosídicos abásicos, tales como 35 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, divulgaciones en las 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 (C 1-20) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo 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 40 documento, incluyendo ARN y ADN.

40 "Oligonucleótido", como se usa en el presente documento, se refiere, en general, 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 completamente aplicable a oligonucleótidos.

45 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.

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

55 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 pases. La descendencia puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula original, pero puede 60 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.

60 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 enlanzan de forma funcional. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

65 Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su

entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que contienen habitualmente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente de forma extracromosómica o en una localización cromosómica que sea diferente de su localización cromosómica natural.

- 5 El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada.
- 10 Un anticuerpo "aislado" es uno 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 los usos de investigación, de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En algunas divulgaciones, un anticuerpo se purifica (1) hasta más de un 95 % en peso de anticuerpo como se determina, por ejemplo, por el procedimiento de Lowry, y en algunas divulgaciones, hasta más de un 99 % en peso; (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N terminal o interna por el uso, por ejemplo, de un secuenciador de vaso giratorio o (3) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando, por ejemplo, tinción con azul de Coomassie o plata. Un anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las 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.

25 Los "anticuerpos naturales" normalmente son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, 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 diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. 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 de aminoácido particulares forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada.

30 35 Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de mamífero se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa ("κ") y lambda ("λ"), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

40 El término "dominio constante" se refiere a la porción de una molécula de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos más conservada con respecto a 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.

45 50 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.

55 60 El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas porciones de los dominios variables difieren extensamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente por todos los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables (HVR), tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se llaman regiones estructurales (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan, en gran medida, una configuración de lámina beta, conectadas por tres HVR, que forman bucles que conectan, y, en algunos casos, forman parte de, la estructura de lámina beta. Las HVR en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad por las regiones FR y, con las HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)). 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 toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

65 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 hipervariables en secuencia 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 los 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 refinada 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 solo consisten en una cadena pesada son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera. Véanse, por ejemplo, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff *et al.*, *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

- 5 Una serie de delineaciones 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)). En cambio, Chothia se refiere 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 señalan a continuación.
- 10

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

- 15 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 enumeran de acuerdo con Kabat *et al.*, *supra*, para cada una de estas definiciones.

- 20 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.

- 25 El término "numeración de residuos del dominio variable como en Kabat" o "numeración de la posición aminoacídica como en Kabat", y variaciones del mismo, se refiere al sistema de numeración usado para los dominios variables de la cadena pesada o dominios variables de la cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, *supra*. Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o 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 un único inserto de aminoácido (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 residuos se puede determinar para un anticuerpo dado por alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada por Kabat "estándar".

- 35 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 EU IgG1 humano.

- 40 Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no 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.

- 45 Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que comprende preferentemente la región de unión a antígeno del mismo. En algunas divulgaciones, el fragmento de anticuerpo descrito en el presente documento es un fragmento de unión a antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

- 50 La digestión con papaina de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados 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.

"Fv" es el mínimo fragmento de anticuerpo que contiene un sitio de unión a antígeno completo. En una divulgación, 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) se pueden enlazar covalentemente 5 un dominio variable de la cadena pesada y uno de la ligera por un conector peptídico flexible, de modo que las cadenas ligera y pesada se puedan asociar en una estructura "dímérica" 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 10 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 solo comprenda tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una menor afinidad que todo el sitio de unión.

El fragmento Fab contiene los dominios variables de la cadena pesada y ligera y también contiene el dominio constante 15 de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en 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 de 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 portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas 20 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 25 que estos dominios están presentes en una única cadena de polipéptido. En general, el polipéptido scFv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL que posibilita que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de scFv, véase, por ejemplo, Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, eds. Rosenburg y Moore, (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo los 30 fragmentos un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptido (VH-VL). Usando un conector que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a que los dominios se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen 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: 35 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 que posee su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir además 40 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 llaman  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , respectivamente.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido 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 sin importancia. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como 45 que no es una mezcla de anticuerpos discretos. En determinadas divulgaciones, dicho anticuerpo monoclonal típicamente incluye un anticuerpo que comprende una secuencia de polipéptido que se une a una diana, en el que la secuencia de polipéptido de unión a diana se obtuvo por un procedimiento que incluye la selección de una única secuencia de polipéptido de unión a diana de una pluralidad de secuencias de polipéptido. Por ejemplo, el procedimiento de selección puede ser la selección de un único clon de una pluralidad de clones, tal como una agrupación 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 50 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. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos frente a diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige frente a un único determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas en tanto que típicamente no están contaminadas por otras inmunoglobulinas.

El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe 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 60 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 65

- ejemplo, la pat. de EE. UU. n.º 4.816.567), tecnologías de presentación en fagos (véanse, 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
- 5 humanos o similares a humanos en animales que tienen partes o todos los locus o genes de inmunoglobulina humana 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).
- 10 Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "químéricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica 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 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 (véanse, 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 químéricos incluyen anticuerpos PRIMATIZED® en los que la región de unión a antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido, por ejemplo, inmunizando macacos con el antígeno de interés.
- 15 Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se 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 a un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.
- 20 Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo químérico que comprende residuos de aminoácido de HVR no humanas y residuos de aminoácido de regiones estructurales (FR) humanas. En determinadas divulgaciones, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, las CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización.
- 25 Los términos "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 afinidad suficiente, de modo que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico al seleccionar como diana PD-L1. En una divulgación, el grado de unión de un anticuerpo anti-PD-L1 a una proteína distinta de PD-L1 no relacionada es de menos de aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo a PD-L1 como se mide, por ejemplo, por un radioinmunoanálisis (RIA). En determinadas divulgaciones, un anticuerpo anti-PD-L1 se une a un epítopo de PD-L1 que está conservado entre PD-L1 de diferentes especies.
- 30 Los términos "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 afinidad suficiente, de modo que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico al seleccionar como diana PD-1. En una divulgación, el grado de unión de un anticuerpo anti-PD-1 a una proteína distinta de PD-1 no relacionada es de menos de aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo a PD-1 como se mide, por ejemplo, por un radioinmunoanálisis (RIA). En determinadas divulgaciones, un anticuerpo anti-PD-1 se une a un epítopo de PD-1 que está conservado entre PD-1 de diferentes especies.
- 35 Un anticuerpo "bloqueante" o un anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Los anticuerpos bloqueantes o anticuerpos antagonistas preferentes inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno.
- 40 "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). Se puede medir la afinidad por procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. En lo que sigue, se describen divulgaciones ilustrativas y ejemplares específicas para medir la afinidad de unión.
- 45 Como se usa en el presente documento, el término "se une", "se une específicamente a" o es "específico para" se refiere a las interacciones medibles y reproducibles, tal como la unión entre una diana y un anticuerpo, lo que es
- 50
- 55
- 60
- 65

determinante de la presencia de la diana en presencia de una población heterogénea de moléculas, incluyendo moléculas biológicas. Por ejemplo, un anticuerpo que se une a o se une específicamente a una diana (que puede ser un epítopo) es un anticuerpo que se une a esta diana con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración de lo que se une a otras dianas. En una divulgación, el grado de unión de un anticuerpo a una diana no relacionada es de menos de aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo a la diana como se mide, por ejemplo, por un radioinmunoanálisis (RIA). En determinadas divulgaciones, un anticuerpo que se une específicamente a una diana tiene una constante de disociación ( $K_d$ ) de  $\leq 1 \mu\text{M}$ ,  $\leq 100 \text{nM}$ ,  $\leq 10 \text{nM}$ ,  $\leq 1 \text{nM}$  o  $\leq 0,1 \text{nM}$ . En determinadas divulgaciones, un anticuerpo se une específicamente a un epítopo en una proteína que está conservada entre las proteínas de diferentes especies. En otra divulgación, la unión específica puede incluir, pero no requiere, una unión exclusiva.

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 epítopo" 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. En el presente documento se proporciona un ensayo de competencia ejemplar.

Un "inmunoconjulado" es un anticuerpo conjugado a una o más moléculas heterólogas, incluyendo pero sin limitarse a un agente citotóxico.

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 de 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 típicamente es una secuencia de aminoácidos contiguos que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia de dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina se puede obtener 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 una divulgación, 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, las inmunoadhesinas útiles como medicamentos útiles para el tratamiento en el presente documento incluyen polipéptidos que comprenden las porciones del dominio extracelular (ECD) o de unión a PD-1 de PD-L1 o PD-L2, o las porciones extracelulares o de unión a PD-L1 o PD-L2 de PD-1, fusionadas a un dominio constante de una secuencia de inmunoglobulina, tales como una ECD de PD-L1-Fc, una ECD de PD-L2-Fc y una ECD de PD-1-Fc, respectivamente. Las combinaciones de inmunoadhesina de Fc de Ig y ECD de receptores de superficie celular a veces se denominan receptores solubles.

Una "proteína de fusión" y un "polipéptido de fusión" se refieren a un polipéptido que tiene dos porciones enlazadas covalentemente entre sí, 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.

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias de polipéptido identificadas en el presente documento se define como el porcentaje de residuos de aminoácido en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácido en el polipéptido que se compara, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es 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 con propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de diversos modos 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 los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la máxima alineación 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 se ha registrado con el n.º de registro de derecho de autor de EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California. Se debe compilar el programa ALIGN-2 para su uso en un sistema operativo UNIX,

preferentemente UNIX V4.0D digital. Se establecen todos los parámetros de comparación de secuencias por el programa ALIGN-2 y no varían.

5 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 A dada con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada (que, de forma alternativa, se puede parafrasear como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula como sigue:

10 100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de residuos de aminoácido 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 de aminoácido 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 indique 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 inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

20 El término "detección" incluye cualquier medio de detección, incluyendo detección directa e indirecta.

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 algunas divulgaciones, 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 polinucleótido (por ejemplo, números de copias de ADN), polipéptidos, modificaciones polipeptídicas y polinucleotídicas (por ejemplo, modificaciones postraduccionales), carbohidratos y/o marcadores moleculares basados en glucolípidos.

30 Los términos "firma de biomarcadores", "firma", "firma de expresión de biomarcadores" o "firma de expresión" se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a uno o una combinación de biomarcadores en los que su expresión es un indicador, por ejemplo, predictivo, diagnóstico y/o pronóstico. La firma de biomarcadores 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 algunas divulgaciones, la firma de biomarcadores 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 en los que su expresión es un indicador, por ejemplo, predictivo, diagnóstico y/o pronóstico. En algunas divulgaciones, la firma de biomarcadores es una "firma proteica". El término "firma proteica" se usa de manera intercambiable con "firma de expresión de proteínas" y se refiere a uno o una combinación de polipéptidos en los que su expresión es un indicador, por ejemplo, predictivo, diagnóstico y/o pronóstico.

45 La "cantidad" o "nivel" de un biomarcador asociado con un beneficio clínico incrementado para un individuo es un nivel detectable en una muestra biológica. Estos se pueden medir por procedimientos conocidos por un experto en la técnica y también divulgados en el presente documento. El nivel de expresión o cantidad de biomarcador evaluado se puede usar para determinar la respuesta al tratamiento.

50 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 funcionan en la célula. Por lo tanto, como se usa en el presente documento "expresión" se puede referir a la transcripción en un polinucleótido, traducción en un polipéptido, o incluso modificaciones polinucleotídicas y/o polipeptídicas (por ejemplo, modificación postraduccional de un polipéptido). Los fragmentos del polinucleótido transcrito, el polipéptido traducido, o modificaciones polinucleotídicas y/o polipeptídicas (por ejemplo, la modificación postraduccional de un polipéptido) también se considerarán expresados si se originan de un transcripto generado por empalme alternativo o un transcripto degradado, o de un procesamiento postraduccional del polipéptido, por ejemplo, por proteólisis. "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).

60 "Expresión elevada", "niveles de expresión elevados" o "niveles elevados" se refiere a una expresión incrementada o niveles incrementados de un biomarcador en un individuo en relación con un control, tal como un individuo o individuos que no padecen la enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) o un control interno (por ejemplo, un biomarcador constitutivo).

65 "Expresión reducida", "niveles de expresión reducidos" o "niveles reducidos" se refiere a una expresión disminuida o niveles disminuidos de un biomarcador en un individuo en relación con un control, tal como un individuo o individuos

que no padecen la enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) o un control interno (por ejemplo, un biomarcador constitutivo). En algunas divulgaciones, la expresión reducida es poca o ninguna expresión.

- 5 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 algunas divulgaciones, 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 en las que sus actividades son esenciales para el mantenimiento de la función celular y que típicamente están presentes de forma similar en todos los tipos de células.
- 10 10 "Amplificación" como se usa en el presente documento se refiere, en general, al procedimiento 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 de nucleótidos, 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.
- 15 20 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.
- 25 30 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 pequeñas cantidades 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, la información de secuencia de los extremos de la región de interés o más allá necesita estar 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 terminales en 5' 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 transcrita a partir de secuencias de ARN celular total, bacteriófago o plásmido, etc. Véanse, en general, Mullis *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263 (1987) y ed. Erlich, *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 con ácido nucleico polimerasa para amplificar una muestra de prueba de ácido nucleico, que comprende el uso de un ácido nucleico (ADN o ARN) conocido 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.
- 35 40 "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).
- 45 50 El término "micromatriz" se refiere a una disposición ordenada de elementos de matriz hibridables, preferentemente sondas polinucleotídicas, en un sustrato.
- 55 60 El término "diagnóstico" se usa en el presente documento para referirse a la identificación o clasificación de un estado, enfermedad o afección molecular o patológico (por ejemplo, cáncer). Por ejemplo, "diagnóstico" se puede referir a la identificación de un tipo particular de cáncer. "Diagnóstico" también se puede referir a la clasificación de un subtipo particular de cáncer, por ejemplo, por criterios histopatológicos o por rasgos característicos moleculares (por ejemplo, un subtipo caracterizado por la expresión de un biomarcador o de una combinación de biomarcadores (por ejemplo, genes particulares o proteínas codificadas por dichos genes)).
- 65 65 El término "ayuda al diagnóstico" se usa en el presente documento para referirse a procedimientos que contribuyen a realizar una determinación clínica con respecto a la presencia, o naturaleza, de un tipo particular de síntoma o afección de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer). Por ejemplo, un procedimiento de ayuda al diagnóstico de una enfermedad o afección (por ejemplo, cáncer) puede comprender medir determinados biomarcadores (por ejemplo, PD-L1) en una muestra biológica de un individuo.
- 70 75 El término "muestra" como se usa en el presente documento se refiere a una composición que se obtiene o deriva de un sujeto y/o individuo de interés que contiene una entidad celular y/u otra entidad molecular que se va a caracterizar y/o identificar, por ejemplo, en base a características físicas, bioquímicas, químicas y/o fisiológicas. Por ejemplo, la frase "muestra de enfermedad" y variaciones de la misma se refiere a cualquier muestra obtenida de un sujeto de interés que se esperaría o se sabe que contiene la entidad celular y/o molecular que se va a caracterizar. Las muestras incluyen, pero no se limitan a, muestras tisulares, células primarias o cultivadas o líneas celulares, 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.

- 5 Por "muestra tisular" o "muestra celular" se quiere decir una obtención de células similares obtenidas de un tejido de un sujeto o individuo. La fuente de la muestra tisular o celular puede ser un tejido sólido como de un órgano, muestra tisular, biopsia y/o aspirado en fresco, congelado y/o conservado; sangre o cualquier constituyente de la sangre, tal como plasma; líquidos corporales, tales como líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, líquido peritoneal o líquido intersticial; células de cualquier momento de la gestación o desarrollo del sujeto. La muestra tisular también puede ser células primarias o cultivadas o líneas celulares. Opcionalmente, la muestra tisular o celular se obtiene de un tejido/órgano de enfermedad. Por ejemplo, una "muestra de tumor" es una muestra tisular obtenida de un tumor u otro tejido canceroso. La muestra tisular puede contener compuestos que no se mezclen de forma natural con el tejido en la naturaleza, tales como conservantes, anticoagulantes, tampones, fijadores, nutrientes, antibióticos o similares.
- 10 15 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 del estroma tumoral (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+ y/o linfocitos T CD4+), linfocitos B u otras células de linaje de médula ósea, incluyendo granulocitos (por ejemplo, neutrófilos, eosinófilos y basófilos), monocitos, macrófagos, células dendríticas (por ejemplo, células dendríticas interdigitantes), histiocitos y linfocitos citolíticos naturales.
- 20 25 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.
- 30 35 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, patrón o nivel que se usa con propósitos de comparación. En una divulgación, 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 sujeto o individuo. Por ejemplo, la muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control pueden ser células o tejido sano y/o no enfermo contiguo a células o tejido enfermo (por ejemplo, células o tejido contiguo a un tumor). En otra divulgación, se obtiene una muestra de referencia de un tejido y/o célula no tratados del cuerpo del mismo sujeto o individuo. Aún en otra divulgación, 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 sujeto o individuo. Incluso en otra divulgación, 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 sujeto o individuo.
- 40 Para los propósitos en el presente documento, un "corte" de una muestra tisular quiere decir una única parte o porción de una muestra tisular, por ejemplo, un corte delgado de tejido o células cortadas de una muestra tisular (por ejemplo, una muestra de tumor). Se debe entender que se pueden tomar múltiples cortes de muestras tisulares y someterlos a análisis, siempre que se entienda que el mismo corte de muestra tisular se pueda analizar tanto a nivel morfológico como molecular, o analizar con respecto a polipéptidos (por ejemplo, por inmunohistoquímica) y/o polinucleótidos (por ejemplo, por hibridación *in situ*).
- 45 50 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 en la realización de 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 a la divulgación del análisis o protocolo polipeptídico, se pueden usar los resultados del análisis o protocolo de expresión de polipéptidos para determinar si se debe realizar una pauta terapéutica específica. Con respecto a la divulgación del análisis o protocolo polinucleotídico, se pueden usar los resultados del análisis o protocolo de expresión de polinucleótido para determinar si se debe realizar una pauta terapéutica específica.
- 55 60 La "respuesta individual" o "respuesta" se puede evaluar usando cualquier criterio de valoración que indique un beneficio para el individuo, incluyendo, sin limitación, (1) inhibición, en cierto grado, de la progresión de la enfermedad (por ejemplo, progresión del cáncer), incluyendo ralentización e interrupción completa; (2) una reducción del 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 metástasis; (5) alivio, en cierto grado, de uno o más síntomas asociados con la enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer); (6) incremento o extensión de la duración de la supervivencia, incluyendo supervivencia global y supervivencia sin progresión; y/o (9) mortalidad disminuida en un punto de tiempo dado después del tratamiento.
- 65

- Una "respuesta eficaz" de un paciente o "reactividad" de un paciente al tratamiento con un medicamento y redacción similar se refiere al beneficio clínico o terapéutico conferido a un paciente con riesgo de, o que padece, una enfermedad o trastorno, tal como cáncer. En una divulgación, dicho beneficio incluye uno cualquiera o más de: extender la supervivencia (incluyendo supervivencia global y supervivencia sin progresión); dar como resultado una respuesta objetiva (incluyendo una respuesta completa o una respuesta parcial); o mejorar los signos o síntomas de cáncer. En una divulgación, se usa el biomarcador (por ejemplo, la expresión de PD-L1, por ejemplo, como se determina usando IHQ) para identificar al paciente que se predice que tiene una probabilidad incrementada de ser sensible al tratamiento con un medicamento (por ejemplo, un tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje PD-L1, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1), en relación con un paciente que no expresa el biomarcador. En una divulgación, se usa el biomarcador (por ejemplo, la expresión de PD-L1, por ejemplo, como se determina usando IHQ) para identificar al paciente que se predice que tiene una probabilidad incrementada de ser sensible al tratamiento con un medicamento (por ejemplo, anticuerpo anti-PD-L1), en relación con un paciente que no expresa el biomarcador al mismo nivel. En una divulgación, se usa la presencia del biomarcador para identificar a un paciente que es más probable que responda al tratamiento con un medicamento, en relación con un paciente que no tiene la presencia del biomarcador. En otra divulgación, se usa la presencia del biomarcador para determinar que un paciente tendrá una probabilidad incrementada de beneficiarse del tratamiento con un medicamento, en relación con un paciente que no tiene la presencia del biomarcador.
- Una "respuesta objetiva" se refiere a una respuesta medible, incluyendo respuesta completa (RC) o respuesta parcial (RP). En algunas divulgaciones, la "tasa de respuesta objetiva" (TRO) se refiere a la suma de la tasa de respuesta completa (RC) y 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 se haya curado el cáncer.
- "Respuesta mantenida" se refiere al efecto mantenido sobre la reducción del crecimiento tumoral después del cese 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 algunas divulgaciones, 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 más.
- Como se usa en el presente documento, "reducir o inhibir la recaída del cáncer" quiere decir reducir o inhibir la recaída del tumor o cáncer o progresión del tumor o cáncer. Como se divulga en el presente documento, la recaída del cáncer y/o progresión del cáncer incluyen, sin limitación, la metástasis del cáncer.
- Como se usa en el presente documento, "respuesta parcial" o "RP" se refiere a una disminución del tamaño de uno o más tumores o lesiones, o del grado del cáncer en el cuerpo, en respuesta al tratamiento. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, RP se refiere a al menos una disminución de un 30 % de la suma de los diámetros más largos (SDML) de las lesiones diana, tomando como referencia la SDML de referencia.
- Como se usa en el presente documento, "enfermedad estable" o "EE" no se refiere ni a una reducción suficiente de las lesiones diana para considerar que haya RP ni a un incremento suficiente para considerar que haya EP, tomando como referencia la SDML más pequeña desde que comenzó 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 comenzó 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" (SSP) se refiere a la cantidad de tiempo durante y después del tratamiento durante la que la enfermedad que se trata (por ejemplo, cáncer) no empeora. La supervivencia sin progresión puede incluir la cantidad de tiempo en el que los pacientes han experimentado una respuesta completa o una respuesta parcial, así como la cantidad de tiempo en el que los pacientes han experimentado una enfermedad estable.
- Como se usa en el presente documento, "supervivencia global" (SG) se refiere al porcentaje de individuos de un grupo que probablemente estén vivos después de una cantidad de tiempo particular.
- Por "extender la supervivencia" se quiere decir incrementar 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 al nivel designado y/o en relación con un paciente tratado con un agente antitumoral aprobado.
- El término "sustancialmente el mismo", como se usa en el presente documento, indica un grado suficientemente alto

de similitud entre dos valores numéricos, de modo que un experto en la técnica considerara que la diferencia entre los dos valores fuera de poca o ninguna significación biológica y/o estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de Kd o niveles de expresión). La diferencia entre dichos dos valores, por ejemplo, es de menos de aproximadamente un 50 %, menos de aproximadamente un 40 %, menos de aproximadamente un 30 %, menos de aproximadamente un 20 % y/o menos de aproximadamente un 10 %, como una función del valor de referencia/comparación.

La frase "sustancialmente diferente", como se usa en el presente documento, indica un grado suficientemente alto de diferencia entre dos valores numéricos, de modo que un experto en la técnica considerara que la diferencia entre los dos valores fuera de significación estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de Kd o niveles de expresión). La diferencia entre dichos dos valores, por ejemplo, es de más de aproximadamente un 10 %, más de aproximadamente un 20 %, más de aproximadamente un 30 %, más de aproximadamente un 40 % y/o más de aproximadamente un 50 % como una función del valor para la molécula de referencia/comparación.

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 a un reactivo tal como una sonda polinucleotídica o un anticuerpo y facilita la detección del reactivo al 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. Se pretende que el término englobe el marcado directo de una sonda o anticuerpo acoplando (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.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un agente terapéutico para tratar o evitar una enfermedad o trastorno 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 el grado en el 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, tiempo hasta la progresión (THP) de la enfermedad, tasas de respuesta (por ejemplo, RC y RP), duración de la respuesta y/o calidad de vida.

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

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. En esta definición se incluyen los cánceres benignos y malignos. Por "cáncer en fase precoz" o "tumor en fase precoz" se quiere decir un cáncer que no es invasivo ni metastásico o se clasifica como un cáncer en estadio 0, I o II. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, 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. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen carcinoma de células escamosas (por ejemplo, carcinoma de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón, incluyendo carcinoma de pulmón microcítico (CPM), carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM), adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama (incluyendo cáncer de mama metastásico), cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o de útero, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, cáncer de células de Merkel, micosis fungoide, cáncer testicular, cáncer esofágico, tumores de las vías biliares, así como cáncer de cabeza y cuello y neoplasias hemáticas. En algunas divulgaciones, el cáncer es cáncer de mama metastásico triple negativo, incluyendo cualquier adenocarcinoma de mama triple negativo (ER-, PR-, HER2-) confirmado histológicamente con enfermedad recidivante localmente o metastásica (donde la enfermedad recidivante localmente no es susceptible de resección con intención curativa). En algunas divulgaciones, el cáncer es CPNM, incluyendo CPNM escamoso y CPNM no escamoso.

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" y "tumor" no son mutuamente excluyentes como se hace referencia en el presente documento.

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 sujeto al que se le administraría la formulación.

- 5 Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.
- 10 Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y las 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 trata, y que se puede realizar para su profilaxis o bien durante la evolución de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de metástasis, disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o atenuación del estado de la enfermedad y remisión o mejora del pronóstico. En algunas divulgaciones, se usan los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti-PD-L1 y/o anticuerpos anti-PD-1) para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.
- 15
- 20 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, por ejemplo, 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 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) BCMA, TRAIL/Apo2, otros agentes químicos bioactivos y orgánicos y similares. Las combinaciones de los mismos también se incluyen en la divulgación.
- 25
- 30 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. Se pretende que el término incluya 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> e isótopos radioactivos de Lu); agentes quimioterápicos, por ejemplo, metotrexato, Adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes de intercalación, enzimas y fragmentos de las mismas, tales como 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. Otros agentes citotóxicos se describen a continuación. Un agente tumoricida provoca la destrucción de células tumorales.
- 35
- 40 Un "agente quimioterápico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclosfosfamida CYTOXAN®; sulfonatos de alquilo, tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas, tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacin y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colquicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán) (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamtotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptofincinas (en particular, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas nitrogenadas, tales como clorambucilo, clornafacina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, clormetina, clorhidrato de óxido de clormetina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, uramustina; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos enodiinos (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina y1l y calicheamicina w1l (véase, por ejemplo, Nicolaou *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33:183-186 (1994)); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como el cromóforo neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos enodiinos de cromoproteínas relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolinodoxorrubicina, cianomorfolinodoxorrubicina, 2-pirrolinodoxorrubicina y desoxiodoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potifromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azaauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromoestanolona, epitiostanol,
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

5 mepitiostano, testolactona; antisuprarrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedor de ácido fólico, tal como ácido frolinico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; ionidainina; maitansinoïdes, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidracida; procarcabina; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente, toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbacina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, 10 por ejemplo, taxanos incluyendo paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), formulación de paclitaxel en nanopartículas genomanipuladas con albúmina libres de Cremophor ABRAXANE™ (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois) y docetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptoperura; metotrexato; análogos de platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina 15 (ONCOVIN®); oxaliplatinio; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico; capecitabina (XELODA®); sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores, tales como CHOP, una abreviatura para un tratamiento combinado de ciclofosfamida, doxorrbucina, vincristina y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para 20 una pauta de tratamiento con oxaliplatinio (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y ácido folínico. Los agentes quimioterápicos adicionales incluyen los agentes citotóxicos útiles como conjugados anticuerpo-fármaco, tales como maitansinoïdes (DM1, por ejemplo) y las auristatinas MMAE y MMAF, por ejemplo.

25 Los "agentes quimioterápicos" también incluyen "agentes antihormonales" o "tratamientos endocrinos" que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer, y a menudo están en forma de tratamiento sistémico o del organismo al completo. Pueden ser hormonas por sí mismos. Los ejemplos incluyen antiestrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno EVISTA®, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, 30 trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON®; antiprogesteronas; reguladores por disminución del receptor de estrógenos (ERD); agentes que funcionan para suprimir o apagar los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) tales como acetato de leuprorrelina LUPRON® y ELIGARD®, acetato de goserelina, acetato de buserelina y triptereolina; otros antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e 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, acetato de 35 megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIL®, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDEX®. Además, dicha definición de agentes quimioterápicos incluye bisfosfonatos, tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato DIDROCAL®, NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato ZOMETA®, alendronato FOSAMAX®, pamidronato AREDIA®, tiludronato SKELID® o risedronato ACTONEL®, así como troxacicatina (un análogo de 1,3-dioxolano nucleósido citosina); oligonucleótidos antisentido, en particular, los 40 que inhiben la expresión de genes en las vías de señalización implicadas en la proliferación celular anómala, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); vacunas, tales como vacuna THERATOPE® y vacunas para el tratamiento génico, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rrRH ABARELIX®; ditosilato de lapatinib (un inhibidor de molécula pequeña de tirosina cinasa doble para ErbB-2 y EGFR, también conocido como GW572016); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

45 Los agentes quimioterápicos también incluyen anticuerpos, tales como alemtuzumab (Campath), bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); cetuximab (ERBITUX®, Imclone); panitumumab (VECTIBIX®, Amgen), rituximab (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idee), pertuzumab (OMNITARG®, 2C4, Genentech), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), tositumomab (Bexxar, Corixia), 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 divulgación incluyen: apolizumab, aselizumab, atlizumab, bapineuzumab, bivatuzumab mertansina, cantuzumab mertansina, cedelizumab, certolizumab pegol, cidfusitzumab, 50 cidezumab, 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, pecfusitzumab, pectuzumab, pexelizumab, ralivizumab, ranibizumab, reslivizumab, 55 reslizumab, resyvizumab, rovelizumab, ruplizumab, sibrotuzumab, siplizumab, sontuzumab, tacatuzumab tetraxetano, tadocizumab, talizumab, tefibazumab, tocilizumab, toralizumab, tucotuzumab celmoleucina, tucusituzumab, umavizumab, urtoxazumab, ustekinumab, visilizumab, y el anti-interleucina 12 (ABT-874/J695, Wyeth Research and Abbott Laboratories), que es un anticuerpo IgG1 λ de longitud completa exclusivamente de secuencia humana recombinante genéticamente modificada para reconocer la proteína p40 de interleucina 12.

60 Los agentes quimioterápicos también incluyen "inhibidores de EGFR", que se refieren a compuestos que se unen a o de otro modo interactúan directamente con EGFR y evitan o reducen su actividad de señalización, y se denominan de forma alternativa "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 WO96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, 5 un anticuerpo que selecciona como diana EGFR completamente humano (Imclone); anticuerpos que se unen a EGFR mutante de tipo II (patente de EE. UU. n.º 5.212.290); anticuerpos humanizados y químéricos 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 frente a 10 EGFR que compite tanto con EGF como con TGF-alfa por la unión a EGFR (EMD/Merck); anticuerpo frente a EGFR humano, HuMax-EGFR (GenMab); anticuerpos completamente 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 15 conjugar con un agente citotóxico, generando así un inmunoconjungado (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: documentos WO98/14451, WO98/50038, WO99/09016 y WO99/24037. Los antagonistas de EGFR de molécula 20 pequeña particulares incluyen OSI-774 (CP-358774, erlotinib, TARCEVA® Genentech/OSI Pharmaceuticals); PD 183805 (CI 1033, diclorhidrato de N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[3-(4-morfolinil)propoxi]-6-quinazolinil]2-propenamida, 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)-pirimidilo[5,4-d]pirimidin-2,8-diamina, Boehringer Ingelheim); PKI-166 ((R)-4-[4-[(1-feniletil)amino]-1H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-6-il]-fenol); (R)-6-(4-hidroxifenil)-4-[(1-feniletil)amino]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina); CL-387785 (N-[4-[(3-bromofenil)amino]-6-quinazolinil]-2-butinamida); 25 EKB-569 (N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-3-ciano-7-etoxy-6-quinolil]-4-(dimetilamino)-2-butenamida) (Wyeth); AG1478 (Pfizer); AG1571 (SU 5271; Pfizer); inhibidores de tirosina cinasa dobles para EGFR/HER2, tales como lapatinib (TYKERB®, GSK572016 o N-[3-cloro-4-[(3 fluorofenil)metoxi]fenil]-6[5[[2metilsulfonil]etil]amino]metil]-2-furanil]-4-quinazolinamina).

Los agentes quimioterápicos también incluyen "inhibidores de tirosina cinasa", incluyendo los fármacos que seleccionan como diana EGFR señalados 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 del receptor 35 tirosina cinasa ErbB2 (Pfizer y OSI); inhibidores de HER dobles, tales como EKB-569 (disponible de Wyeth), que se une preferentemente a EGFR, pero inhibe tanto las células que sobreexpresan 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; 40 inhibidores de TK que no seleccionan como diana HER, tales como mesilato de imatinib (GLEEVEC®, disponible de Glaxo SmithKline); inhibidores de tirosina cinasa con múltiples dianas, tales como sunitinib (SUTENT®, disponible de Pfizer); inhibidores de tirosina cinasa para los receptores de VEGF, tales como vatalanib (PTK787/ZK222584, disponible de Novartis/Schering AG); inhibidor de cinasas reguladas extracelularmente I de MAPK CI-1040 (disponible de Pharmacia); quinazolinas, tales como PD 153035, 4-(3-cloroanilino)quinazolina; piridopirimidinas; 45 pirimidopirimidinas; pirrolopirimidinas, tales como CGP 59326, CGP 60261 y CGP 62706; pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidinas; curcumina (diferuloilmetano, 4,5-bis(4-fluoroanilino)ftalimida); tifostinas que contienen restos nitrotiofeno; PD-0183805 (Warner-Lamber); moléculas antisentido (por ejemplo, las que se unen a ácido nucleico que codifica HER); quinoxalinas (patente de EE. UU. n.º 5.804.396); trifostinas (patente de EE. UU. n.º 5.804.396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); inhibidores de pan-HER, tales como 50 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 (sírolimus, RAPAMUNE®); o como se describe en cualquiera de las siguientes publicaciones de patente: patente de EE. UU. n.º 5.804.396; documentos WO 1999/09016 (American Cyanamid); WO 1998/43960 (American Cyanamid); WO 1997/38983 (Warner Lambert); WO 1999/06378 (Warner 55 Lambert); WO 1999/06396 (Warner Lambert); WO 1996/30347 (Pfizer, Inc); WO 1996/33978 (Zeneca); WO 1996/3397 (Zeneca) y WO 1996/33980 (Zeneca).

Los agentes quimioterápicos también incluyen dexametasona, interferones, colquicina, metoprina, ciclosporina, anfotericina, metronidazol, alemtuzumab, alitretinoína, alopurinol, amifostina, trióxido de arsénico, asparaginasa, BCG 60 viva, bevacizimab, bexaroteno, cladribina, clofarabina, darbepoetina alfa, denileucina, dexrazoxano, epoetina alfa, elotinib, filgrastim, acetato de histrelina, ibritumomab, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, lenalidomida, levamisol, mesna, metoxaleno, nandrolona, nelarabina, nefetumomab, oprelvecina, palifermina, pamidronato, pegademasa, pegaspargasa, pegfilgrastim, pemetrexed disódico, plicamicina, porfímero sódico, mepacrina, rasburicasa, sargramostim, temozolomida, VM-26, 6-TG, toremifeno, tretinoína, ATRA, valrubicina, zoledronato y ácido zoledrónico 65 y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Los agentes quimioterápicos también incluyen hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, acetato de cortisona, pivalato de tixocortol, acetónido de triamcinolona, alcohol de triamcinolona, mometasona, amcinónida, budesónida, desónida, fluocinónida, acetónido de fluocinolona, betametasona, fosfato sódico de betametasona, dexametasona, fosfato sódico de dexametasona, fluocortolona, 17-butirato de hidrocortisona, 17-valerato de hidrocortisona, dipropionato de aclometasona, valerato de betametasona, dipropionato de betametasona, prednicarbato, 17-butirato de clobetasona, 17-propionato de clobetasol, caproato de fluocortolona, pivalato de fluocortolona y acetato de fluprednideno; péptidos antiinflamatorios selectivos inmunitarios (AISI), tales como fenilalanina-glutamina-glicina (FEG) y su forma D-isomérica (feG) (IMULAN BioTherapeutics, LLC); fármacos antirreumáticos, tales como azatioprina, ciclosporina (ciclosporina A), D-penicilamina, sales de oro, hidroxicloroquina, leflunomidemociclina, sulfasalazina, bloqueantes del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), tales como etanercept (ENBREL $\circledR$ ), infliximab (REMICADE $\circledR$ ), adalimumab (HUMIRA $\circledR$ ), certolizumab pegol (CIMZIA $\circledR$ ), golimumab (SIMPONI $\circledR$ ), bloqueantes de interleucina 1 (IL-1), tales como anakinra (KINERET $\circledR$ ), bloqueantes de la coestimulación de linfocitos T, tales como abatacept (ORENCIA $\circledR$ ), bloqueantes de interleucina 6 (IL-6), tales como tocilizumab (ACTEMERA $\circledR$ ); bloqueantes de interleucina 13 (IL-13), tales como lebrikizumab; bloqueantes de interferón (IFN) alfa, tales como rontalizumab; bloqueantes de integrinas beta 7, tales como rhuMAb Beta7; bloqueantes de la vía de IgE, tales como anti-M1 prima; bloqueantes de LT $\alpha$ 3 homotrimérica y heterotímero LT $\alpha$ 1/β2 unido a membrana secretados, tales como anti-linfotoxina alfa (LT $\alpha$ ); diversos agentes en investigación, tales como tioplatino, PS-341, fenilbutirato, ET-18-OCH<sub>3</sub>, o inhibidores de farnesiltransferasa (L-739749, L-744832); polifenoles, tales como quercetina, resveratrol, piceatannol, galato de epigallocatequina, teaflavinas, flavanoles, procianidinas, ácido betulínico y derivados de los mismos; inhibidores de la autofagia, tales como cloroquina; delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL $\circledR$ ); beta-lapachona; lapachol; colquicinas, ácido betulínico; acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina; podofilotoxina; tegafur (UFTORAL $\circledR$ ); bexaroteno (TARGRETIN $\circledR$ ); bisfosfonatos, tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS $\circledR$  u OSTAC $\circledR$ ), etidronato (DIDROCAL $\circledR$ ), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA $\circledR$ ), alendronato (FOSAMAX $\circledR$ ), pamidronato (AREDIA $\circledR$ ), tiludronato (SKELID $\circledR$ ) o risedronato (ACTONEL $\circledR$ ); y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas, tales como la vacuna THERATOPPE $\circledR$ ; perifosina, inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib o etoricoxib), inhibidor de proteosoma (por ejemplo, PS341); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inhibidor de Bcl-2, tal como oblimersen sódico (GENASENSE $\circledR$ ); pixantrona; inhibidores de farnesiltransferasa, tales como Ionafarnib (SCH 6636, SARASAR $^{\text{TM}}$ ); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores.

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 las 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, 615.<sup>o</sup> congreso, Belfast (1986) y Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery" *Directed Drug Delivery*, Borchardt *et al.*, (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de la presente divulgación 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 β-lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 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 divulgación 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 en la que su crecimiento es dependiente de la expresión de PD-L1) *in vitro* o bien *in vivo*. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduzca 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 interrupción de G1 y la interrupción de la fase M. Los bloqueantes de la fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de topoisomerasa II, tales como el antibiótico de antraciclina doxorubicina ((8S-cis)-10-[3-amino-2,3,6-tridesoxi-α-L-lico-hexapiranosil]oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenodiona), epirrubicina, daunorrubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que interrumpen la G1 también afectan a la interrupción de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbacin, clormetina, cisplatino, metotrexato, 5-fluoruracilo y citarabina. Se puede encontrar otra información en "The Molecular Basis of Cancer", eds. Mendelsohn e Israel, capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami *et al.* (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos antineoplásicos derivados del árbol del tejo. Docetaxel (TAXOTERE $\circledR$ , Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL $\circledR$ , Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos evitando la despolimerización, lo que da como resultado la inhibición de la mitosis en las 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 existirán muchos modos conocidos en la técnica para determinar la dosificación y duración del tratamiento. Los

tratamientos típicos se dan como una administración de una vez y las dosificaciones típicas varían de 10 a 200 unidades (grays) por día.

5 Como se usa en el presente documento, los términos "paciente" o "sujeto" se usan de manera intercambiable y se refieren a cualquier animal individual, más preferentemente un mamífero (incluyendo dichos animales no humanos como, por ejemplo, perros, gatos, caballos, conejos, animales de zoológico, vacas, cerdos, ovejas y primates no humanos) para los que se desea el tratamiento. En algunas divulgaciones, el paciente en el presente documento es un ser humano.

10 Como se usa en el presente documento, "administración" quiere decir un procedimiento de dar una dosificación de un compuesto (por ejemplo, un antagonista) o una composición farmacéutica (por ejemplo, una composición farmacéutica que incluye un antagonista) a un sujeto (por ejemplo, un paciente). La administración puede ser por cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea, para el tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen, por ejemplo, administración intramuscular, intravenosa, intrarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo, en parte, de si la administración es breve o prolongada. En el presente documento se contemplan diversos programas de dosificación que incluyen, pero sin limitarse a, administraciones únicas o múltiples durante diversos puntos de tiempo, administración por inyección intravenosa rápida e infusión pulsada.

20 25 El término "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 solapa 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.

30 35 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 trata, la presencia o tamaño de las metástasis o el tamaño del tumor primario.

40 45 El término "prospecto del envase" se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los 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.

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

55 Un "artículo de fabricación" es cualquier elemento de 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 (por ejemplo, PD-L1) descrito en el presente documento. En determinadas divulgaciones, la fabricación o kit se promociona, distribuye o vende como una unidad para realizar los procedimientos descritos en el presente documento.

60 La frase "basado en" 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/promocional, etc.

### **III. Procedimientos**

#### **A. Procedimientos de diagnóstico**

65 En el presente documento se proporcionan procedimientos para determinar si es probable que un paciente que padece un cáncer (por ejemplo, un carcinoma de pulmón no microcítico) responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje PD-L1. En el presente documento también se proporcionan procedimientos para predecir la reactividad de un paciente que padece un cáncer (por ejemplo, un carcinoma de pulmón no microcítico) al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje PD-L1. En el presente documento se proporcionan además procedimientos para seleccionar un tratamiento para un paciente que padece un cáncer (por ejemplo, un carcinoma de pulmón no microcítico). Cualquiera de los procedimientos precedentes se puede basar en el nivel de expresión de un biomarcador proporcionado en el presente documento, por ejemplo, la expresión de PD-L1 en una muestra de tumor, por ejemplo, en células inmunitarias infiltrantes de tumor y/o en células tumorales. Cualquiera de los procedimientos puede incluir además administrar al paciente un antagonista de unión al eje PD-L1 (por ejemplo, como se describe en la sección C, "Antagonistas de unión al eje PD-L1" a continuación) al paciente. Cualquiera de los procedimientos puede incluir además administrar una cantidad eficaz de un segundo agente terapéutico al paciente.

70 La divulgación proporciona un procedimiento para determinar si es probable que un paciente que padece un carcinoma de pulmón no microcítico responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje PD-L1, comprendiendo el procedimiento: determinar el nivel de expresión de proteínas de PD-L1 en células tumorales en una

muestra de tumor obtenida del paciente, en el que un nivel de expresión detectable de PD-L1 en un 50 % o más, aproximadamente un 55 % o más, aproximadamente un 60 % o más, aproximadamente un 65 % o más, aproximadamente un 70 % o más, aproximadamente un 80 % o más, aproximadamente un 85 % o más, aproximadamente un 90 % o más, aproximadamente un 95 % o más, o aproximadamente un 99 % o más de las células tumorales en la muestra de tumor indica que es probable que el paciente responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje PD-L1, en el que el antagonista de unión al eje PD-L1 es un anticuerpo, en el que el anticuerpo es atezolizumab. Un nivel de expresión detectable de PD-L1 en un 50 % o más de las células tumorales en la muestra de tumor indica que es probable que el paciente responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje PD-L1, en el que el antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo, en el que el anticuerpo es atezolizumab.

La divulgación también proporciona un procedimiento para predecir la reactividad de un paciente que padece un carcinoma de pulmón no microcítico al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje PD-L1, comprendiendo el procedimiento: determinar el nivel de expresión de proteínas de PD-L1 en células tumorales en una muestra de tumor obtenida del paciente, en el que un nivel de expresión detectable de PD-L1 en un 50 % o más, aproximadamente un 55 % o más, aproximadamente un 60 % o más, aproximadamente un 65 % o más, aproximadamente un 70 % o más, aproximadamente un 80 % o más, aproximadamente un 85 % o más, aproximadamente un 90 % o más, aproximadamente un 95 % o más, o aproximadamente un 99 % o más de las células tumorales en la muestra de tumor indica que es probable que el paciente responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje PD-L1, en el que el antagonista de unión al eje PD-L1 es un anticuerpo, en el que el anticuerpo es atezolizumab. Un nivel de expresión detectable de PD-L1 en un 50 % o más de las células tumorales en la muestra de tumor indica que es probable que el paciente responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje PD-L1, en el que el antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo, en el que el anticuerpo es atezolizumab.

En algunas divulgaciones de cualquiera de los procedimientos precedentes, un nivel de expresión de proteínas detectable de PD-L1 en de un 50 % a un 99 %, de aproximadamente un 50 % a un 95 %, de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 90 %, de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 85 %, de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 80 %, de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 75 %, de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 70 %, de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 65 %, de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 60 % o de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 55 % de las células tumorales en la muestra de tumor indica que es probable que el paciente responda al tratamiento con un antagonista de unión a PD-L1, en el que el antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo, en el que el anticuerpo es atezolizumab.

La divulgación proporciona además un procedimiento para seleccionar un tratamiento para un paciente que padece un carcinoma de pulmón no microcítico, comprendiendo el procedimiento: determinar el nivel de expresión de PD-L1 en células tumorales en una muestra de tumor obtenida del paciente, y seleccionar un tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje PD-L1 para el paciente en base a un nivel de expresión de proteínas detectable de PD-L1 en un 50 % o más, aproximadamente un 55 % o más, aproximadamente un 60 % o más, aproximadamente un 65 % o más, aproximadamente un 70 % o más, aproximadamente un 80 % o más, aproximadamente un 85 % o más, aproximadamente un 90 % o más, aproximadamente un 95 % o más, o aproximadamente un 99 % o más de las células tumorales en la muestra de tumor, en el que el antagonista de unión al eje PD-L1 es un anticuerpo, en el que el anticuerpo es atezolizumab. El procedimiento incluye seleccionar un tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje PD-L1 para el paciente en base a un nivel de expresión detectable de PD-L1 en un 50 % o más de las células tumorales en la muestra de tumor, en el que el antagonista de unión al eje PD-L1 es un anticuerpo, en el que el anticuerpo es atezolizumab.

En cualquiera de los procedimientos precedentes, el procedimiento puede incluir además determinar el nivel de expresión de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor en la muestra de tumor obtenida del paciente. En algunas divulgaciones, la muestra de tumor obtenida del paciente tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprenden menos de un 10 % (por ejemplo, menos de un 10 %, menos de un 9 %, menos de un 8 %, menos de un 7 %, menos de un 6 %, menos de un 5 %, menos de un 4 %, menos de un 3 %, menos de un 2 % o menos de un 1 %) de la muestra de tumor. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, la muestra de tumor obtenida del paciente tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que cubren menos de un 10 % del área tumoral (por ejemplo, menos de un 10 % del área tumoral, menos de un 9 % del área tumoral, menos de un 8 % del área tumoral, menos de un 7 % del área tumoral, menos de un 6 % del área tumoral, menos de un 5 % del área tumoral, menos de un 4 % del área tumoral, menos de un 3 % del área tumoral, menos de un 2 % del área tumoral o menos de un 1 % del área tumoral) en un corte de la muestra de tumor, por ejemplo, como se determina por inmunohistoquímica usando un anticuerpo anti-PD-L1.

En cualquiera de los procedimientos precedentes, la muestra de tumor obtenida del paciente puede tener desmoplasia. Por ejemplo, en algunos casos, una muestra de tumor obtenida del paciente puede incluir una población de fibroblastos y/o miofibroblastos. En cualquiera de los procedimientos, la muestra de tumor obtenida del paciente puede tener una reacción esclerótica. En algunos casos, la muestra de tumor obtenida del paciente puede comprender un estroma deficiente en células y/o colagenizado. En cualquiera de los procedimientos precedentes, la muestra de tumor puede

comprender un nivel de expresión incrementado de colágeno, STAT1 y/o MEK en relación con una muestra de tumor de referencia.

- 5 En cualquiera de los procedimientos precedentes, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden cubrir aproximadamente un 1 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 1 % o más, aproximadamente un 2 % o más, aproximadamente un 3 % o más, aproximadamente un 4 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 6 % o más, aproximadamente un 7 % o más, aproximadamente un 8 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 11 % o más, aproximadamente un 12 % o más, aproximadamente un 13 % o más, aproximadamente un 14 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, 10 aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 50 % o más, aproximadamente un 45 % o más, o 15 aproximadamente un 50 % o más) del área tumoral en un corte de la muestra tumoral obtenida del paciente. Por ejemplo, en algunos casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden cubrir aproximadamente un 1 % o más del área tumoral en un corte de la muestra de tumor. En algunos casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden cubrir aproximadamente un 5 % o más del área tumoral en un corte de la muestra de tumor. En otros 20 casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden cubrir aproximadamente un 10 % o más del área tumoral en un corte de la muestra de tumor. En algunos casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden cubrir aproximadamente un 15 % o más del área tumoral en un corte de la muestra de tumor. Aún en otros casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden cubrir aproximadamente un 20 % o más del área tumoral en un corte de la muestra de tumor. En otros casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden cubrir aproximadamente un 25 % o más del área tumoral en un corte de la muestra de tumor. En algunos casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden cubrir aproximadamente un 30 % o más del área tumoral en un corte de la muestra de tumor. En algunos 25 casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden cubrir aproximadamente un 35 % o más del área tumoral en un corte de la muestra de tumor. En algunos casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden cubrir aproximadamente un 40 % o más del área tumoral en un corte de la muestra de tumor. En algunos casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden cubrir aproximadamente un 50 % o más del área tumoral en un corte de la muestra de tumor.
- 30 En cualquiera de los procedimientos precedentes, la muestra de tumor obtenida del paciente puede incluir un número incrementado de células inmunitarias intraepiteliales y/o estromales en relación con una muestra de tumor de referencia. En cualquiera de los procedimientos precedentes, la muestra de tumor obtenida del paciente puede incluir un número incrementado de linfocitos T CD8+ en relación con una muestra de tumor de referencia. En algunos casos, la muestra de tumor obtenida del paciente tiene un nivel de expresión incrementado de uno o más genes relacionados con linfocitos B o genes relacionados con linfocitos citolíticos naturales (NK) en relación con una muestra de tumor de referencia. En algunos casos, el uno o más genes relacionados con linfocitos B se seleccionan del grupo que consiste en CD19, MS4A1 y CD79A. En algunos casos, el uno o más genes relacionados con linfocitos NK se seleccionan del grupo que consiste en KLRB1, KLRC1, KLRC2, KLRC3, KLRD1, KLRF1, KLRG1, KLRK1, NCAM1, PRF1, NCR1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DS2, KIR3DL1, FCGR3A, MICA y MICB.
- 35 40 En algunas divulgaciones, los procedimientos incluyen determinar el nivel de expresión de uno o más biomarcadores adicionales. En algunas divulgaciones, el biomarcador adicional es un marcador inmunomediado. Un marcador inmunomediado se refiere a un marcador que se expresa por células inmunitarias o por otras células (por ejemplo, células tumorales, células endoteliales, fibroblastos u otras células estromales). Si se expresa por células distintas de las células inmunitarias, el marcador puede estar implicado en la regulación de la biología y función de las células inmunitarias, incluyendo, por ejemplo, la activación, cebado, reconocimiento y presentación de antígeno, producción 45 de citocinas y quimiocinas, proliferación, migración, supervivencia o producción de anticuerpos. En algunas divulgaciones, el marcador inmunomediado es un marcador relacionado con linfocitos T. En algunas divulgaciones, el marcador relacionado con linfocitos T se selecciona del grupo que consiste en CD8A, IFN-γ, EOMES, granzima A, CXCL9 y cualquier combinación de los mismos. En algunas divulgaciones, el marcador inmunomediado se selecciona del grupo que consiste en CX3CL1, CD45RO, IDO1, galectina 9, MIC-A, MIC-B, CTLA-4 y cualquier combinación de los mismos. En algunas divulgaciones, el biomarcador adicional es un gen relacionado con linfocitos NK. En algunas divulgaciones, un gen relacionado con linfocitos NK incluye, pero no se limita a, KLRB1, KLRC1, KLRC2, KLRC3, KLRD1, KLRF1, KLRG1, KLRK1, NCAM1, PRF1, NCR1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DS2, KIR3DL1, FCGR3A, MICA, MICB y cualquier combinación de los mismos. En algunas divulgaciones, el biomarcador adicional es un gen relacionado con células mielógenas. En algunas divulgaciones, el gen relacionado con células mielógenas incluye, pero no se limita a, IL1B, IL8, CCL2 y cualquier combinación de los mismos. En algunas divulgaciones, el biomarcador adicional es un gen relacionado con linfocitos B. En algunas divulgaciones, el gen relacionado con linfocitos B incluye, pero no se limita a, CD19, MS4A1, CD79A y cualquier combinación de los mismos. En algunas divulgaciones, el biomarcador adicional es un gen relacionado con linfocitos T efectores ( $T_{eff}$ ). En algunas divulgaciones, un gen relacionado con  $T_{eff}$  incluye, pero no se limita a, CD8A, GZMA, GZMB, IFNG, EOMES, PRF1, CXCL9, CXCL10, TBX21 y cualquier combinación de los mismos. En algunas divulgaciones, el gen relacionado con Teff es IFNG, GZMB o CXCL9. En algunas divulgaciones, el biomarcador adicional es un gen de colágeno. En algunas divulgaciones, el gen de colágeno es COL6A1 o COL6A2.
- 55 60 65 En cualquiera de los procedimientos precedentes, el procedimiento puede incluir además administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje PD-L1 en base al nivel de expresión de PD-L1 en

células tumorales o en células inmunitarias infiltrantes de tumor en la muestra de tumor. El antagonista de unión al eje PD-L1 puede ser cualquier antagonista de unión al eje PD-L1 conocido en la técnica o descrito en el presente documento, por ejemplo, en la sección C, "Antagonistas de unión al eje PD-L1" a continuación.

- 5       El antagonista de unión al eje PD-L1 es un antagonista de unión a PD-L1. El antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a uno o más de sus compañeros de unión a ligando. El antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1. El antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a B7-1. 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 es el anticuerpo MPDL3280A (atezolizumab). El anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de HVR-H1 de SEQ ID NO:19, la secuencia de HVR-H2 de SEQ ID NO:20 y la secuencia de HVR-H3 de SEQ ID NO:21; y una cadena ligera que comprende la secuencia de HVR-L1 de SEQ ID NO:22, la secuencia de HVR-L2 de SEQ ID NO:23 y la secuencia de HVR-L3 de SEQ ID NO:24. El anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4.
- 10      En algunos casos, el procedimiento incluye además administrar al paciente una cantidad eficaz de un segundo agente terapéutico. En algunos casos, el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un agente citotóxico, un agente inhibidor del crecimiento, un agente radioterápico, un agente antiangiogénico y combinaciones de los mismos.
- 15      En cualquiera de los casos precedentes, el carcinoma de pulmón no microcítico puede ser un carcinoma de pulmón no microcítico localmente avanzado o metastásico. En cualquiera de los casos precedentes, el carcinoma de pulmón no microcítico puede ser CPNM escamoso o CPNM no escamoso.
- 20      En cualquiera de los procedimientos precedentes, la muestra obtenida del paciente se selecciona del grupo que consiste en tejido, sangre completa, plasma, suero y combinaciones de los mismos. En algunas divulgaciones, la muestra es una muestra tisular. En algunas divulgaciones, la muestra tisular es una muestra de tumor. En algunas divulgaciones, la muestra de tumor comprende células tumorales, células inmunitarias infiltrantes de tumor, células estromales o cualquier combinación de las mismas. En cualquiera de las divulgaciones precedentes, la muestra de tumor puede ser una muestra de tumor fijada con formol e incluida en parafina (FFPE), una muestra de tumor de archivo, una muestra de tumor fresco o una muestra de tumor congelada.
- 25      La presencia y/o niveles de expresión/cantidad de diversos biomarcadores descritos en el presente documento en una muestra se pueden analizar por una serie de metodologías, de las que muchas son conocidas en la técnica y se entienden por el experto en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, inmunohistoquímica ("IHQ"), análisis de inmunoelectrotransferencia, inmunoprecipitación, ensayos de unión molecular, ELISA, ELIFA, separación celular activada por fluorescencia ("FACS"), MassARRAY, proteómica, ensayos cuantitativos basados en la sangre (por ejemplo, ELISA en suero), ensayos bioquímicos de actividad enzimática, así como uno cualquiera de la amplia variedad de ensayos que se pueden realizar por análisis de proteínas, matrices.
- 30      En cualquiera de los procedimientos precedentes, la presencia y/o nivel de expresión/cantidad del biomarcador PD-L1 se mide determinando los niveles de expresión de proteínas del biomarcador. En determinadas divulgaciones, el procedimiento comprende poner en contacto la muestra biológica con anticuerpos que se unen específicamente al biomarcador (por ejemplo, anticuerpos anti-PD-L1) 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 sujetos idóneos para su tratamiento con un antagonista de unión al eje PD-L1, 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 algunas divulgaciones, se determina un nivel de expresión de proteínas del biomarcador PD-L1 usando un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en citometría de flujo (por ejemplo, separación celular activada por fluorescencia (FACS™)), inmunoelectrotransferencia, ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA), inmunoprecipitación, inmunohistoquímica (IHQ), inmunofluorescencia, radioinmunoanálisis, transferencia por puntos, procedimientos de inmunodetección, HPLC, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía óptica, espectrometría de masas y HPLC. El nivel de expresión de proteínas del biomarcador PD-L1 se determina en células inmunitarias infiltrantes de tumor. En algunas divulgaciones, el nivel de expresión de proteínas del biomarcador (por ejemplo, PD-L1) se determina en células tumorales. En algunas divulgaciones, el nivel de expresión de proteínas del biomarcador (por ejemplo, PD-L1) se determina en células inmunitarias infiltrantes de tumor y en células tumorales.
- 35      En determinadas divulgaciones, la presencia y/o nivel de expresión/cantidad de una proteína biomarcadora (por ejemplo, PD-L1) en una muestra se examina usando IHQ y protocolos de tinción. Se ha demostrado que la tinción IHQ de cortes tisulares es un procedimiento fiable de determinación o detección de la presencia de proteínas en una

- muestra. En algunas divulgaciones de cualquiera de los procedimientos, ensayos y/o kits, el biomarcador es PD-L1. En una divulgación, 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 algunas divulgaciones, la intensidad de tinción IHQ se determina en relación con una referencia. En algunas divulgaciones, la referencia es un valor de referencia. En algunas divulgaciones, la referencia es una muestra de referencia (por ejemplo, una muestra de tinción de línea de células de control, una muestra tisular de un paciente no canceroso o una muestra de tumor negativo para PD-L1).
- 5            10 La IHQ se puede realizar en combinación con técnicas adicionales, tales como tinción morfológica y/o hibridación *in situ* (por ejemplo, FISH). 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 otra interacción de anticuerpo. 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 a un marcador enzimático, se añade un sustrato cromógeno o fluorógeno para proporcionar la visualización del antígeno. La amplificación de la señal se produce porque varios anticuerpos secundarios pueden reaccionar con diferentes epítopos en el anticuerpo primario.
- 15            20 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 <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C, <sup>125</sup>I, <sup>3</sup>H y <sup>131</sup>I; (b) partículas de oro coloidal; (c) marcadores fluorescentes incluyendo, pero sin limitarse a, quelatos de tierras raras (quelatos de europio), Texas Red, rodamina, fluoresceína, dansilo, lisamina, umbelifera, ficoeritina, 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 estos. 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-dihidrotauracindionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa, tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina,
- 25            30 β-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasa (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasa heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares.
- 35            35 Los ejemplos de combinaciones enzima-sustrato incluyen, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (HRPO) con hidrógeno peroxidasa como sustrato; fosfatasa alcalina (AP) con para-nitrofenilfosfato como sustrato cromógeno; y β-D-galactosidasa (β-D-Gal) con un sustrato cromógeno (por ejemplo, p-nitrofenil-β-D-galactosidasa) o sustrato fluorógeno (por ejemplo, 4-metilumbeliferal-β-D-galactosidasa). Para una revisión general de estas, véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 4.275.149 y 4.318.980.
- 40            40 Las muestras se pueden preparar, por ejemplo, manualmente, o usando un instrumento de tinción automatizado (por ejemplo, un instrumento Ventana BenchMark XT o Benchmark ULTRA; véase, por ejemplo, el ejemplo 1 a continuación). Las muestras preparadas así se pueden montar y tapar 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 una divulgación, se debe entender que, cuando se examinan células y/o tejido de un tumor usando IHQ, la tinción se determina o evalúa, en general, en célula(s) y/o tejido tumoral(es) (a diferencia del tejido estromal o circundante que puede estar presente en la muestra). En algunas divulgaciones, se entiende que, cuando se examinan células y/o tejido de un tumor usando IHQ, la tinción incluye la determinación o evaluación en células inmunitarias infiltrantes de tumor, incluyendo células inmunitarias intratumorales o peritumorales. En algunas divulgaciones, la presencia de un biomarcador (por ejemplo, PD-L1) se detecta 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 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 cualquiera de los criterios descritos en el presente documento (véase, por ejemplo, la tabla 2 y 3), por ejemplo, por un anatomopatólogo o análisis por imágenes automatizado.
- 45            50 En algunas divulgaciones de cualquiera de los procedimientos, PD-L1 se detecta por inmunohistoquímica usando un anticuerpo de diagnóstico anti-PD-L1 (es decir, anticuerpo primario). En algunas divulgaciones, el anticuerpo de diagnóstico frente a PD-L1 se une específicamente a PD-L1 humano. En algunas divulgaciones, el anticuerpo de diagnóstico frente a PD-L1 es un anticuerpo no humano. En algunas divulgaciones, el anticuerpo de diagnóstico frente a PD-L1 es un anticuerpo de rata, ratón o conejo. En algunas divulgaciones, el anticuerpo de diagnóstico frente a PD-L1 es un anticuerpo de conejo. En algunas divulgaciones, el anticuerpo de diagnóstico frente a PD-L1 es un anticuerpo monoclonal. En algunas divulgaciones, el anticuerpo de diagnóstico frente a PD-L1 se marca directamente.
- 55            60
- 65            65

En otras divulgaciones, el anticuerpo de diagnóstico frente a PD-L1 se marca indirectamente.

En algunas divulgaciones de cualquiera de los procedimientos precedentes, el nivel de expresión de PD-L1 se detecta en células tumorales, células inmunitarias infiltrantes de tumor o combinaciones de las mismas usando 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 del estroma tumoral (por ejemplo, fibroblastos). Dichas células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden ser linfocitos T (tales como linfocitos T CD8+ y/o linfocitos T CD4+), 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. En algunas divulgaciones, la tinción para PD-L1 se detecta como tinción de membrana, tinción citoplásmica y combinaciones de las mismas. En otras divulgaciones, la ausencia de PD-L1 se detecta como ausente o sin tinción en la muestra.

En determinadas divulgaciones, la presencia y/o niveles de expresión/cantidad de un biomarcador en una primera muestra están incrementados o elevados en comparación con la presencia/ausencia y/o niveles de expresión/cantidad de un biomarcador en una segunda muestra. En determinadas divulgaciones, la presencia/ausencia y/o niveles de expresión/cantidad de un biomarcador en una primera muestra están disminuidos o reducidos en comparación con la presencia y/o niveles de expresión/cantidad en una segunda muestra. En determinadas divulgaciones, la segunda muestra es una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control. Las divulgaciones adicionales para determinar la presencia/ausencia y/o niveles de expresión/cantidad de un gen se describen en el presente documento.

En determinadas divulgaciones, 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 sujeto o individuo que se obtienen en uno o más puntos de tiempo diferentes que 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 de tiempo más temprano del mismo sujeto o individuo que 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 determinadas divulgaciones, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control son múltiples muestras combinadas de uno o más individuos sanos que no son el paciente. En determinadas divulgaciones, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control son múltiples muestras combinadas de uno o más individuos con una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) que no son el sujeto o individuo. En determinadas divulgaciones, 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 determinadas divulgaciones, 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.

En algunas divulgaciones de cualquiera de los procedimientos, expresión elevada o incrementada 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 del nivel de biomarcador (por ejemplo, proteína o ácido nucleico (por ejemplo, gen o ARNm)), detectado por procedimientos conocidos en la técnica estándar, tales como los descritos en el presente documento, en comparación con una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control. En determinadas divulgaciones, la expresión elevada se refiere al incremento del nivel de expresión/cantidad de un biomarcador en la muestra en el que el incremento es al menos aproximadamente cualquiera de 1,5X, 1,75X, 2X, 3X, 4X, 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X, 25X, 50X, 75X o 100X el nivel de expresión/cantidad del biomarcador respectivo en una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control. En algunas divulgaciones, la expresión elevada se refiere a un incremento global mayor de aproximadamente 1,5 veces, aproximadamente 1,75 veces, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 2,25 veces, aproximadamente 2,5 veces, aproximadamente 2,75 veces, aproximadamente 3,0 veces o aproximadamente 3,25 veces en comparación con una 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 algunas divulgaciones de cualquiera de los procedimientos, expresión reducida se refiere a una reducción global de aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor del nivel de biomarcador (por ejemplo, proteína o ácido nucleico (por ejemplo, gen o ARNm)), detectado por procedimientos conocidos en la técnica estándar, tales como los descritos en el presente documento, en comparación con una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control. En determinadas divulgaciones, la expresión reducida se refiere a la disminución del nivel de expresión/cantidad de un biomarcador en la muestra en la que la disminución es al menos aproximadamente cualquiera de 0,9X, 0,8X, 0,7X, 0,6X, 0,5X, 0,4X, 0,3X, 0,2X, 0,1X, 0,05X o 0,01X el nivel de expresión/cantidad del

biomarcador respectivo en una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control.

## B. Procedimientos terapéuticos

- 5 La presente divulgación proporciona procedimientos para tratar a un paciente que padece un cáncer (por ejemplo, un carcinoma de pulmón no microcítico). En algunos casos, los procedimientos de la divulgación incluyen administrar al paciente un tratamiento antineoplásico que incluye un antagonista de unión al eje PD-L1, en el que el antagonista de unión al eje PD-L1 es un anticuerpo, en el que el anticuerpo es atezolizumab. En algunos casos, los procedimientos implican determinar la presencia y/o nivel de expresión de un biomarcador descrito en el presente documento en una muestra obtenida de un paciente y administrar un tratamiento antineoplásico al paciente en base a la presencia y/o nivel de expresión del biomarcador en la muestra, por ejemplo, usando cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento (por ejemplo, los descritos en la sección A, "Procedimientos de diagnóstico" o en los ejemplos a continuación) o conocidos en la técnica. El biomarcador es PD-L1.
- 10 15 La divulgación proporciona un procedimiento de tratamiento de un paciente que padece un carcinoma de pulmón no microcítico, comprendiendo el procedimiento administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje PD-L1, en el que el antagonista de unión al eje PD-L1 es un anticuerpo, en el que el anticuerpo es atezolizumab, en el que se ha determinado que una muestra de tumor obtenida del paciente tiene un nivel de expresión de proteínas detectable de PD-L1 en un 50 % o más, aproximadamente un 55 % o más, aproximadamente un 60 % o más, aproximadamente un 65 % o más, aproximadamente un 70 % o más, aproximadamente un 80 % o más, aproximadamente un 85 % o más, aproximadamente un 90 % o más, aproximadamente un 95 % o más, o aproximadamente un 99 % o más) de las células tumorales en la muestra de tumor.
- 20 25 30 Por ejemplo, en algunas divulgaciones, se ha determinado que la muestra de tumor obtenida del paciente tiene un nivel de expresión de proteínas detectable de PD-L1 en un 50 % o más de las células tumorales en la muestra de tumor. En algunas divulgaciones, la muestra de tumor obtenida del paciente tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprenden menos de un 10 % (por ejemplo, menos de un 10 %, menos de un 9 %, menos de un 8 %, menos de un 7 %, menos de un 6 %, menos de un 5 %, menos de un 4 %, menos de un 3 %, menos de un 2 % o menos de un 1 %) de la muestra de tumor. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, la muestra de tumor obtenida del paciente tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que cubren menos de un 10 % del área tumoral (por ejemplo, menos de un 10 % del área tumoral, menos de un 9 % del área tumoral, menos de un 8 % del área tumoral, menos de un 7 % del área tumoral, menos de un 6 % del área tumoral, menos de un 5 % del área tumoral, menos de un 4 % del área tumoral, menos de un 3 % del área tumoral, menos de un 2 % del área tumoral o menos de un 1 % del área tumoral) en un corte de la muestra de tumor obtenida del paciente, por ejemplo, como se determina por inmunohistoquímica usando un anticuerpo anti-PD-L1. En algunas divulgaciones, la muestra de tumor obtenida del paciente no tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor.
- 35 40 45 50 55 La divulgación también proporciona un procedimiento de tratamiento de un paciente que padece un carcinoma de pulmón no microcítico, comprendiendo el procedimiento administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje PD-L1, en el que se ha determinado que una muestra de tumor obtenida del paciente tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprenden un 1 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 1 % o más, aproximadamente un 2 % o más, aproximadamente un 3 % o más, aproximadamente un 4 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 6 % o más, aproximadamente un 7 % o más, aproximadamente un 8 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 11 % o más, aproximadamente un 12 % o más, aproximadamente un 13 % o más, aproximadamente un 14 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 50 % o más, aproximadamente un 45 % o más, o aproximadamente un 50 % o más) de la muestra de tumor, y un nivel de expresión detectable de PD-L1 en menos de un 50 % (por ejemplo, menos de un 50 %, menos de un 45 %, menos de un 40 %, menos de un 35 %, menos de un 30 %, menos de un 25 %, menos de un 20 %, menos de un 15 %, menos de un 10 % o menos de un 5 %) de las células tumorales en la muestra de tumor.
- 60 65 En cualquiera de los procedimientos precedentes, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden cubrir aproximadamente un 1 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 1 % o más, aproximadamente un 2 % o más, aproximadamente un 3 % o más, aproximadamente un 4 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 6 % o más, aproximadamente un 7 % o más, aproximadamente un 8 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 11 % o más, aproximadamente un 12 % o más, aproximadamente un 13 % o más, aproximadamente un 14 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 50 % o más, aproximadamente un 45 % o más, o aproximadamente un 50 % o más) del área tumoral en un corte de la muestra tumoral obtenida del paciente. Por ejemplo, en algunos casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden cubrir aproximadamente un 1 % o

más del área tumoral en un corte de la muestra de tumor. En algunos casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden cubrir aproximadamente un 5 % o más del área tumoral en un corte de la muestra de tumor. En otros casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden cubrir aproximadamente un 10 % o más del área tumoral en un corte de la muestra de tumor. En algunos casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden cubrir aproximadamente un 15 % o más del área tumoral en un corte de la muestra de tumor. Aún en otros casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden cubrir aproximadamente un 20 % o más del área tumoral en un corte de la muestra de tumor. En otros casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden cubrir aproximadamente un 25 % o más del área tumoral en un corte de la muestra de tumor. En algunos casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden cubrir aproximadamente un 30 % o más del área tumoral en un corte de la muestra de tumor. En algunos casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden cubrir aproximadamente un 35 % o más del área tumoral en un corte de la muestra de tumor. En algunos casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden cubrir aproximadamente un 40 % o más del área tumoral en un corte de la muestra de tumor. En algunos casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden cubrir aproximadamente un 50 % o más del área tumoral en un corte de la muestra de tumor.

15 El antagonista de unión al eje PD-L1 es un antagonista 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 es un anticuerpo. El anticuerpo es MPDL3280A (atezolizumab). El anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de HVR-H1 de SEQ ID NO:19, la secuencia de HVR-H2 de SEQ ID NO:20 y la secuencia de HVR-H3 de SEQ ID NO:21; y una cadena ligera que comprende la secuencia de HVR-L1 de SEQ ID NO:22, la secuencia de HVR-L2 de SEQ ID NO:23 y la secuencia de HVR-L3 de SEQ ID NO:24. El anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4.

30 En algunos casos, el tratamiento incluye además administrar al paciente una cantidad eficaz de un segundo agente terapéutico. En algunos casos, el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un agente citotóxico, un agente inhibidor del crecimiento, un agente radioterápico, un agente antiangiogénico y combinaciones de los mismos.

35 En cualquiera de los casos precedentes, el carcinoma de pulmón no microcítico puede ser un carcinoma de pulmón no microcítico localmente avanzado o metastásico. En cualquiera de los casos precedentes, el carcinoma de pulmón no microcítico puede ser CPNM escamoso o CPNM no escamoso.

40 En otro aspecto, la divulgación proporciona el uso de un antagonista de unión al eje PD-L1 en la fabricación o preparación de un medicamento. En una divulgación, el medicamento es para el tratamiento de un cáncer. En otra divulgación, el medicamento es para su uso en un procedimiento de tratamiento de un cáncer que comprende administrar a un paciente que padece un cáncer (por ejemplo, CPNM) una cantidad eficaz del medicamento. En una divulgación de este tipo, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

45 Las composiciones utilizadas en los procedimientos descritos en el presente documento (por ejemplo, antagonistas de unión al eje PD-L1) se pueden administrar por cualquier procedimiento adecuado, incluyendo, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, percutánea, intrarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intrarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intratecal, intranasal, intravaginal, intrarrectal, tópica, intratumoral, peritoneal, subconjuntival, intravesicular, mucosa, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, intraorbital, oral, tópica, transdérmica, intravítreo (por ejemplo, por inyección intravítreo), por colirio, por inhalación, por inyección, por implantación, por infusión, por infusión continua, por perfusión localizada que baña directamente las células diana, 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 sistémica o localmente. 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 trata). En algunas divulgaciones, el antagonista de unión al eje PD-L1 se administra por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, tópica, oral, transdérmica, intraperitoneal, intraorbital, por implantación, por inhalación, por vía intratecal, intraventricular o intranasal. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo, en parte, de si la administración es breve o prolongada. En el presente documento se contemplan diversos programas de dosificación que incluyen, pero sin limitarse a, administraciones únicas o múltiples durante diversos puntos de tiempo, administración por inyección intravenosa rápida e infusión pulsada.

65 Los antagonistas de unión al eje PD-L1 (por ejemplo, un anticuerpo, polipéptido de unión y/o molécula pequeña) descritos en el presente documento (cualquier agente terapéutico adicional) se pueden formular, dosificar y administrar de una forma consecuente con la buena práctica médica. Los factores que se deben tener en consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, la afección clínica del paciente

individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, el programa de administración y otros factores conocidos por los médicos de cabecera. El antagonista de unión al eje PD-L1 no lo necesita, pero opcionalmente se formula con y/o se administra de forma simultánea con uno o más agentes usados actualmente para evitar o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad del antagonista de unión al eje PD-L1 presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores analizados anteriormente. Estos se usan, en general, en las mismas dosificaciones y por las vías de administración como se describe en el presente documento, o aproximadamente de un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que sea apropiada.

Para la prevención o tratamiento de un cáncer (por ejemplo, un carcinoma de pulmón no microcítico), la dosificación apropiada de un antagonista de unión al eje PD-L1 descrito en el presente documento (cuando se usa solo o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se vaya a tratar, la gravedad y evolución de la enfermedad, si el antagonista de unión al eje PD-L1 se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, tratamiento previo, la anamnesis del paciente y respuesta al antagonista de unión al eje PD-L1, y el criterio del médico especialista. El antagonista de unión al eje PD-L1 se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, en general, se mantendría el tratamiento hasta que se produjera una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Dichas dosis se pueden administrar intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente reciba, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente veinte o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del antagonista de unión al eje PD-L1). Se puede administrar una mayor dosis de carga inicial, seguido de una o más dosis menores. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. El curso de este tratamiento se supervisa fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

Por ejemplo, como proposición general, la cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo antagonista de unión al eje PD-L1 administrada al ser humano estará en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal del paciente, ya sea en una o más administraciones. En algunas divulgaciones, el anticuerpo usado se administra de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 45 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 35 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg o de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg diariamente, semanalmente, cada dos semanas, cada tres semanas o mensualmente, por ejemplo. En algunas divulgaciones, el anticuerpo se administra a 15 mg/kg. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. En una divulgación, un anticuerpo anti-PD-L1 descrito en el presente documento se administra a un ser humano a una dosis de aproximadamente 100 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 400 mg aproximadamente 500 mg, aproximadamente 600 mg, aproximadamente 700 mg, aproximadamente 800 mg, aproximadamente 900 mg, aproximadamente 1000 mg, aproximadamente 1100 mg, aproximadamente 1200 mg, aproximadamente 1300 mg, aproximadamente 1400 mg, aproximadamente 1500 mg, aproximadamente 1800 mg, aproximadamente 1700 mg o aproximadamente 1800 mg el día 1 de ciclos de 21 días (cada tres semanas, c3s). En algunas divulgaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 MPDL3280A se administra a 1200 mg por vía intravenosa cada tres semanas (c3s). La dosis se puede administrar como una dosis única o como dosis múltiples (por ejemplo, 2 o 3 dosis), tal como infusiones. La dosis del anticuerpo administrado en un tratamiento de combinación se puede reducir en comparación con la de un tratamiento único. El curso de este tratamiento se supervisa fácilmente por técnicas convencionales.

En algunas divulgaciones, los procedimientos implican además administrar al paciente una cantidad eficaz de un segundo agente terapéutico. En algunas divulgaciones, el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un agente citotóxico, un agente quimioterápico, un agente inhibidor del crecimiento, un agente radioterápico, un agente antiangiogénico y combinaciones de los mismos. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con una quimioterapia o agente quimioterápico. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un agente de radioterapia. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un tratamiento dirigido o agente terapéutico dirigido. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con una inmunoterapia o un agente inmunoterápico, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal. En algunas divulgaciones, el segundo agente terapéutico es un agonista dirigido frente a una molécula coestimuladora activadora. En algunas divulgaciones, el segundo agente terapéutico es un antagonista dirigido frente a una molécula coestimuladora inhibidora.

Dichas politerapias señaladas anteriormente engloban la administración combinada (donde se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o en formulaciones separadas) y administración separada, caso en el que la administración de un antagonista de unión al eje PD-L1 se puede producir antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente o agentes terapéutico(s) adicional(es). En una divulgación, la administración de un

antagonista de unión al eje PD-L1 y la administración de un agente terapéutico adicional se produce dentro de aproximadamente un mes, o dentro de aproximadamente una, dos o tres semanas, o dentro de aproximadamente uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis días, entre sí.

- 5 Sin desear quedar ligado a la teoría, se piensa que la potenciación de la estimulación de los linfocitos T, promoviendo una molécula coestimuladora activadora o inhibiendo una molécula coestimuladora negativa, puede promover la muerte de las células tumorales, tratando o retrasando, de este modo, la progresión del cáncer. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un agonista dirigido frente a una molécula coestimuladora activadora. En algunas divulgaciones, una molécula coestimuladora activadora puede incluir CD40, CD226, CD28, OX40, GITR, CD137, CD27, HVEM o CD127. En algunas divulgaciones, el agonista dirigido frente a una molécula coestimuladora activadora es un anticuerpo agonista que se une a CD40, CD226, CD28, OX40, GITR, CD137, CD27, HVEM o CD127. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un antagonista dirigido frente a una molécula coestimuladora inhibidora. En algunas divulgaciones, una molécula coestimuladora inhibidora puede incluir CTLA-4 (también conocido como CD152), TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3, B7-H3, B7-H4, IDO, TIGIT, MICA/B o arginasa. En algunas divulgaciones, el antagonista dirigido frente a una molécula coestimuladora inhibidora es un anticuerpo antagonista que se une a CTLA-4, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3, B7-H3, B7-H4, IDO, TIGIT, MICA/B o arginasa.
- 10 En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un antagonista dirigido frente a CTLA-4 (también conocido como CD152), por ejemplo, un anticuerpo bloqueante. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con ipilimumab (también conocido como MDX-010, MDX-101 o YERVOY®). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con tremelimumab (también conocido como ticitimimumab o CP-675.206). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un antagonista dirigido frente a B7-H3 (también conocido como CD276), por ejemplo, un anticuerpo bloqueante. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con MGA271. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un antagonista dirigido frente a un TGF-beta, por ejemplo, metelimumab (también conocido como CAT-192), fresolimumab (también conocido como GC1008) o LY2157299.
- 15 En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un tratamiento que comprende la transferencia adoptiva de un linfocito T (por ejemplo, un linfocito T citotóxico o CTL) que expresa un receptor de antígeno químérico (CAR). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un tratamiento que comprende la transferencia adoptiva de un linfocito T que comprende un receptor de TGF beta negativo dominante, por ejemplo, un receptor de tipo II de TGF beta negativo dominante. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un tratamiento que comprenda un protocolo HERCREEM (véase, por ejemplo, ClinicalTrials.gov, identificador NCT00889954).
- 20 En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un agonista dirigido frente a CD137 (también conocido como TNFRSF9, 4-1BB o ILA), por ejemplo, un anticuerpo activador. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con urelumab (también conocido como BMS-663513). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un agonista dirigido frente a CD40, por ejemplo, un anticuerpo activador. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con CP-870893. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un agonista dirigido frente a OX40 (también conocido como CD134), por ejemplo, un anticuerpo activador. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un anticuerpo anti-OX40 (por ejemplo, AgonOX). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un agonista dirigido frente a CD27, por ejemplo, un anticuerpo activador. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con CDX-1127. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un antagonista dirigido frente a indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO). En algunas divulgaciones, el antagonista de IDO es 1-metil-D-triptófano (también conocido como 1-D-MT).
- 25 En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un conjugado anticuerpo-fármaco. En algunas divulgaciones, el conjugado anticuerpo-fármaco comprende mertansina o monometil auristatina E (MMAE). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un conjugado anticuerpo anti-NaPi2b-MMAE (también conocido como DNIB0600A o RG7599). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con trastuzumab emtansina (también conocido como T-DM1, ado-trastuzumab emtansina o KADCYLA®, Genentech). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con DMUC5754A. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un conjugado anticuerpo-fármaco que selecciona como diana el receptor de endotelina B (EDNBR), por ejemplo, un anticuerpo dirigido frente a EDNBR conjugado con MMAE.
- 30 En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un agente antiangiogénesis. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un anticuerpo dirigido frente a un VEGF, por ejemplo, VEGF-A. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con bevacizumab (también conocido como AVASTIN®, Genentech). En
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un anticuerpo dirigido frente a angiopoyetina 2 (también conocida como Ang2). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con MEDI3617.

- 5 En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un agente antineoplásico. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un agente que selecciona como diana CSF-1R (también conocido como M-CSFR o CD115). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con anti-CSF-1R (también conocido como IMC-CS4).
  - 10 En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un interferón, por ejemplo, interferón alfa o interferón gamma. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con Roferon-A (también conocido como interferón alfa-2a recombinante). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con GM-CSF (también conocido como factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos humano recombinante, rhu GM-CSF, sargamostim o LEUKINE®). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con IL-2 (también conocida como aldesleucina o PROLEUKIN®).
  - 15 En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con IL-12. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un anticuerpo que selecciona como diana CD20. En algunas divulgaciones, el anticuerpo que selecciona como diana CD20 es obinutuzumab (también conocido como GA101 o GAZYVA®) o rituximab. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un anticuerpo que selecciona como diana GITR. En algunas divulgaciones, el anticuerpo que selecciona como diana GITR es TRX518.
  - 20
  - 25 En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con una vacuna contra el cáncer. En algunas divulgaciones, la vacuna contra el cáncer es una vacuna contra el cáncer peptídica que, en algunas divulgaciones, es una vacuna peptídica personalizada. En algunas divulgaciones, la vacuna contra el cáncer peptídica es un péptido largo multivalente, un péptido múltiple, un combinado de péptidos, un péptido híbrido o una vacuna de células dendríticas pulsadas con péptidos (véase, por ejemplo, Yamada *et al.*, *Cancer Sci.* 104:14-21, 2013). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un adyuvante. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un tratamiento que comprende un agonista de TLR, por ejemplo, poli-ICLC (también conocido como HILTONOL®), LPS, MPL u ODN CpG.
  - 30 En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con factor de necrosis tumoral (TNF) alfa. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con IL-1. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con HMGB1. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un antagonista de IL-10. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un antagonista de IL-4. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un antagonista de IL-13. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un antagonista de HVEM. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un agonista de ICOS, por ejemplo, por administración de ICOS-L, o un anticuerpo agonista dirigido frente a ICOS. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un tratamiento que selecciona como diana CX3CL1. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un tratamiento que selecciona como diana CXCL9. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un tratamiento que selecciona como diana CXCL10. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un tratamiento que selecciona como diana CCL5. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un agonista de LFA-1 o ICAM1. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un agonista de selectina.
  - 35
  - 40
  - 45
  - 50
  - 55
  - 60
  - 65
- En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un tratamiento dirigido. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un inhibidor de B-Raf. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con vemurafenib (también conocido como ZELBORAF®). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con dabrafenib (también conocido como TAFINLAR®). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con erlotinib (también conocido como TARCEVA®). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un inhibidor de MEK, tal como MEK1 (también conocido como MAP2K1) o MEK2 (también conocido como MAP2K2). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con cobimetinib (también conocido como GDC-0973 o XL-518). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con trametinib (también conocido como MEKINIST®). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un inhibidor de K-Ras. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un inhibidor de c-Met. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con onartuzumab (también conocido como MetMAb). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un inhibidor de Alk. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con AF802 (también conocido como CH5424802 o alecitinib). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un inhibidor de una fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con BKM120. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con idelalisib (también conocido como

GS-1101 o CAL-101). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con perifosina (también conocida como KRX-0401). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un inhibidor de una Akt. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con MK2206. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con GSK690693. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con GDC-0941. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un inhibidor de mTOR. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con sিরولিমস (también conocido como rapamicina). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con temsিরولিমس (también conocido como CCI-779 o Torisel®). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con everolimus (también conocido como RAD001). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con ridaforolimus (también conocido como AP-23573, MK-8669 o deforolimus). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con OSI-027. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con AZD8055. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con INK128. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con un inhibidor doble para PI3K/mTOR. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con XL765. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con GDC-0980. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con BEZ235 (también conocido como NVP-BEZ235). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con BGT226. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con GSK2126458. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con PF-04691502. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de unión al eje PD-L1 junto con PF-05212384 (también conocido como PKI-587).

## 25 C. Antagonistas de unión al eje PD-L1 para su uso en los procedimientos de la invención

En el presente documento se proporcionan procedimientos para tratar o retrasar la progresión de un cáncer (por ejemplo, un carcinoma de pulmón no microcítico) en un paciente que comprenden administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje PD-L1. En el presente documento se proporcionan procedimientos para determinar si es probable que un paciente que padece un cáncer (por ejemplo, un carcinoma de pulmón no microcítico) responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje PD-L1. En el presente documento se proporcionan procedimientos para predecir la reactividad de un paciente que padece un cáncer (por ejemplo, un carcinoma de pulmón no microcítico) al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje PD-L1. En el presente documento se proporcionan procedimientos para seleccionar un tratamiento para un paciente que padece un cáncer (por ejemplo, un carcinoma de pulmón no microcítico). Cualquiera de los procedimientos precedentes se puede basar en el nivel de expresión de un biomarcador proporcionado en el presente documento, por ejemplo, la expresión de PD-L1 en una muestra de tumor, por ejemplo, en células inmunitarias infiltrantes de tumor y/o en células tumorales.

40 El antagonista de unión al eje PD-L1 es atezolizumab. PD-1 (muerte programada 1) también se denomina en la técnica "muerte celular programada 1", "PD-CD1", "CD279" y "SLEB2". Un PD-1 humano ejemplar se muestra en el n.º de acceso a UniProtKB/Swiss-Prot Q15116. PD-L1 (ligando 1 de muerte programada) 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 a UniProtKB/Swiss-Prot Q9NZQ7.1. PD-L2 (ligando 2 de muerte programada) 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 a UniProtKB/Swiss-Prot Q9BQ51. En algunas divulgaciones, PD-1, PD-L1 y PD-L2 son PD-1, PD-L1 y PD-L2 humanos.

50 El anticuerpo anti-PD-L1 MPDL3280A (atezolizumab). Los ejemplos de anticuerpos anti-PD-L1 y procedimientos para preparar los mismos se describen en la solicitud de patente PCT WO 2010/077634, WO 2007/005874, WO 2011/066389, la pat. de EE. UU. n.º 8.217.149 y el documento US 2013/034559.

55 Los anticuerpos anti-PD-L1 descritos en los documentos WO 2010/077634 A1 y US 8.217.149 se pueden usar en los procedimientos descritos en el presente documento. En algunas divulgaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:3 y/o una secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:4. Todavía en otra divulgación, se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada y/o una de la región variable de la cadena ligera, en el que:

60 (a) la secuencia de la cadena pesada tiene al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de la cadena pesada;

EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVVVRQAPGKGLEWVAVWISPYGGSTYYADSVKGRT  
TISADOTSKNTAYLQMNSSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDTWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:3).

y

- 5 (b) la secuencia de la cadena ligera tiene al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de la cadena ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASODVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPSRFSGSGSGTD  
FTLTISSLQPEDFATYYCQQQLYHPATFGQCTKVEIKR (SEQ ID NO:4).

- 10 En una divulgación, el anticuerpo anti-PD-L1 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en la que:

- 15 (a) la secuencia de HVR-H1 es GFTFSX<sub>1</sub>SWIH (SEQ ID NO:5);  
 (b) la secuencia de HVR-H2 es AWIX<sub>2</sub>PYGGSX<sub>3</sub>YYADSVKG (SEQ ID NO:6);  
 (c) la secuencia de HVR-H3 es RHWPGGFDY (SEQ ID NO:7);

- 20 en las que además: X<sub>1</sub> es D o G; X<sub>2</sub> es S o L; X<sub>3</sub> es T o S. En un aspecto específico, X<sub>1</sub> es D; X<sub>2</sub> es S y X<sub>3</sub> es T. En otro aspecto, el polipéptido comprende además secuencias estructurales de la cadena pesada de región variable yuxtapuestas entre las HVR de acuerdo con la fórmula: (FR-H1)-(HVR-H1)-(FR-H2)-(HVR-H2)-(FR-H3)-(HVR-H3)-(FR-H4). Aún en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. En otro aspecto, las secuencias estructurales son la región estructural consenso del subgrupo III de VH.  
 25 Todavía en otro aspecto, al menos una de las secuencias estructurales es la siguiente:

FR-H1 es EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:8)  
 FR-H2 es WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:9)  
 30 FR-H3 es RFTISADOTSKNTAYLQMNSSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:10)  
 FR-H4 es WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:11).

- 35 Todavía en otro aspecto, el polipéptido de cadena pesada se combina además con una cadena ligera de región variable que comprende una HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, en la que:

- 40 (a) la secuencia de HVR-L1 es RASQX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>TX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>A (SEQ ID NO:12);  
 (b) la secuencia de HVR-L2 es SASX<sub>9</sub>LX<sub>10</sub>S, (SEQ ID NO:13);  
 (c) la secuencia de HVR-L3 es QQX<sub>11</sub>X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>PX<sub>15</sub>T (SEQ ID NO:14);

- 45 en las que: X<sub>4</sub> es D o V; X<sub>5</sub> es V o I; X<sub>6</sub> es S o N; X<sub>7</sub> es A o F; X<sub>8</sub> es V o L; X<sub>9</sub> es F o T; X<sub>10</sub> es Y o A; X<sub>11</sub> es Y, G, F, o S; X<sub>12</sub> es L, Y, F o W; X<sub>13</sub> es Y, N, A, T, G, F o I; X<sub>14</sub> es H, V, P, T o I; X<sub>15</sub> es A, W, R, P o T. Todavía en otro aspecto, X<sub>4</sub> es D; X<sub>5</sub> es V; X<sub>6</sub> es S; X<sub>7</sub> es A; X<sub>8</sub> es V; X<sub>9</sub> es F; X<sub>10</sub> es Y; X<sub>11</sub> es Y; X<sub>12</sub> es L; X<sub>13</sub> es Y; X<sub>14</sub> es H; X<sub>15</sub> es A.

- 50 Todavía en otro aspecto, la cadena ligera comprende además secuencias estructurales de la cadena ligera de región variable yuxtapuestas entre las HVR de acuerdo con la fórmula: (FR-L1)-(HVR-L1)-(FR-L2)-(HVR-L2)-(FR-L3)-(HVR-L3)-(FR-L4). Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales son la región estructural consenso de kappa I de VL. Todavía en otro aspecto, al menos una de las secuencias estructurales es la siguiente:

- 55 FR-L1 es DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:15)  
 FR-L2 es WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:16)  
 FR-L3 es GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:17)  
 60 FR-L4 es FGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:18).

En otra divulgación, se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado o fragmento de unión a antígeno que comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que:

- 5 (a) la cadena pesada comprende una HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en la que además:  
10 (i) la secuencia de HVR-H1 es GFTFSX<sub>1</sub>SWIH; (SEQ ID NO:5)  
15 (ii) la secuencia de HVR-H2 es AWIX<sub>2</sub>PYGGSX<sub>3</sub>YYADSVKG (SEQ ID NO:6)  
20 (iii) la secuencia de HVR-H3 es RHWPGGF DY, y (SEQ ID NO:7)  
25 (b) la cadena ligera comprende una HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, en la que además:  
30 (i) la secuencia de HVR-L1 es RASQX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>TX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>A (SEQ ID NO:12)  
35 (ii) la secuencia de HVR-L2 es SASX<sub>9</sub>LX<sub>10</sub>S; y (SEQ ID NO:13)  
40 (iii) la secuencia de HVR-L3 es QQX<sub>11</sub>X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>PX<sub>15</sub>T; (SEQ ID NO:14)  
45 en las que: X<sub>1</sub> es D o G; X<sub>2</sub> es S o L; X<sub>3</sub> es T o S; X<sub>4</sub> es D o V; X<sub>5</sub> es V o I; X<sub>6</sub> es S o N; X<sub>7</sub> es A o F; X<sub>8</sub> es V o L; X<sub>9</sub> es F o T; X<sub>10</sub> es Y o A; X<sub>11</sub> es Y, G, F o S; X<sub>12</sub> es L, Y, F o W; X<sub>13</sub> es Y, N, A, T, G, F o I; X<sub>14</sub> es H, V, P, T o I; X<sub>15</sub> es A, W, R, P o T. En un aspecto específico, X<sub>1</sub> es D; X<sub>2</sub> es S y X<sub>3</sub> es T. En otro específico, X<sub>4</sub> es D; X<sub>5</sub> es V; X<sub>6</sub> es S; X<sub>7</sub> es A; X<sub>8</sub> es V; X<sub>9</sub> es F; X<sub>10</sub> es Y; X<sub>11</sub> es Y; X<sub>12</sub> es L; X<sub>13</sub> es Y; X<sub>14</sub> es H; X<sub>15</sub> es A. Aún en otro aspecto, X<sub>1</sub> es D; X<sub>2</sub> es S y X<sub>3</sub> es T, X<sub>4</sub> es D; X<sub>5</sub> es V; X<sub>6</sub> es S; X<sub>7</sub> es A; X<sub>8</sub> es V; X<sub>9</sub> es F; X<sub>10</sub> es Y; X<sub>11</sub> es Y; X<sub>12</sub> es L; X<sub>13</sub> es Y; X<sub>14</sub> es H y X<sub>15</sub> es A.  
50 En otro aspecto, la región variable de la cadena pesada comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (FR-H1)-(HVR-H1)-(FR-H2)-(HVR-H2)-(FR-H3)-(HVR-H3)-(FR-H4), y la región variable de la cadena ligera comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (FR-L1)-(HVR-L1)-(FR-L2)-(HVR-L2)-(FR-L3)-(HVR-L3)-(FR-L4). Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humano. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena pesada se derivan de una secuencia del subgrupo I, II o III de Kabat. Todavía en otro aspecto, la secuencia estructural de la cadena pesada es una región estructural consenso del subgrupo III de VH. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena pesada se exponen como SEQ ID NO:8, 9, 10 y 11. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo kappa I, II, III o IV de Kabat. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera son la región estructural consenso de kappa I de VL. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena ligera se exponen como SEQ ID NO:15, 16, 17 y 18.  
55 Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo comprende además una región constante humana o murina. Todavía en otro aspecto, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Todavía en otro aspecto específico, la región constante humana es IgG1. Todavía en otro aspecto, la región constante murina se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Todavía en otro aspecto, la región constante murina es IgG2A. Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo tiene una función efectora reducida o mínima. Todavía en otro aspecto específico, la función efectora mínima resulta de una "mutación en Fc sin efecto" o aglucosilación. Todavía en otra divulgación, la mutación en Fc sin efecto es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.  
60 Aún en otra divulgación, se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 que comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que:  
65 (a) la cadena pesada comprende además una secuencia de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con respecto a GFTFSDSWIH (SEQ ID NO:19), AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:20) y RHWPGGF DY (SEQ ID NO:21), respectivamente, o  
70 (b) la cadena ligera comprende además una secuencia de HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con respecto a RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:22), SASFLYS (SEQ ID NO:23) y QQYLYHPAT (SEQ ID NO:24), respectivamente.  
75 En un aspecto específico, la identidad de secuencia es de un 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100%.  
80 En otro aspecto, la región variable de la cadena pesada comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (FR-H1)-(HVR-H1)-(FR-H2)-(HVR-H2)-(FR-H3)-(HVR-H3)-(FR-H4), y la región variable de la

cadena ligera comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (FR-L1)-(HVR-L1)-(FR-L2)-(HVR-L2)-(FR-L3)-(HVR-L3)-(FR-L4). Aún en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena pesada se derivan de una secuencia del subgrupo I, II o III de Kabat. Todavía en otro aspecto, la secuencia estructural de la cadena pesada es una región estructural consenso del subgrupo III de VH. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena pesada se exponen como SEQ ID NO:8, 9, 10 y 11. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo kappa I, II, III o IV de Kabat. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera son la región estructural consenso de kappa I de VL. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena ligera se exponen como SEQ ID NO:15, 16, 17 y 18.

Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo comprende además una región constante humana o murina. Todavía en otro aspecto, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Todavía en otro aspecto específico, la región constante humana es IgG1. Todavía en otro aspecto, la región constante murina se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Todavía en otro aspecto, la región constante murina es IgG2A. Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo tiene una función efectora reducida o mínima. Todavía en otro aspecto específico, la función efectora mínima resulta de una "mutación en Fc sin efecto" o aglucosilación. Todavía en otra divulgación, la mutación en Fc sin efecto es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

En otra divulgación, se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que:

(a) la secuencia de la cadena pesada tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con respecto la secuencia de la cadena pesada:

**EVLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:25),**

y/o

(b) la secuencia de la cadena ligera tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de la cadena ligera:

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLOPEDFATYYCQQQLYHPATFGQGTLVKEIKR (SEQ ID NO:4).**

En un aspecto específico, la identidad de secuencia es de un 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100%. En otro aspecto, la región variable de la cadena pesada comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (FR-H1)-(HVR-H1)-(FR-H2)-(HVR-H2)-(FR-H3)-(HVR-H3)-(FR-H4), y la región variable de la cadena ligera comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (FR-L1)-(HVR-L1)-(FR-L2)-(HVR-L2)-(FR-L3)-(HVR-L3)-(FR-L4). Aún en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. En otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena pesada se derivan de una secuencia del subgrupo I, II o III de Kabat. Todavía en otro aspecto, la secuencia estructural de la cadena pesada es una región estructural consenso del subgrupo III de VH. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena pesada se exponen como SEQ ID NO:8, 9, 10 y WGQGTLTVSS (SEQ ID NO:27).

Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo kappa I, II, III o IV de Kabat. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera son la región estructural consenso de kappa I de VL. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena ligera se exponen como SEQ ID NO:15, 16, 17 y 18.

Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo comprende además una región constante humana o murina. Todavía en otro aspecto, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Todavía en otro aspecto específico, la región constante humana es IgG1. Todavía en otro aspecto, la región constante murina se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Todavía en otro aspecto, la región constante murina es IgG2A. Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo tiene una función efectora reducida o mínima. Todavía en otro aspecto específico, la función efectora mínima resulta de la producción en células procariotas. Todavía en otro aspecto específico, la función efectora mínima resulta de una "mutación en Fc sin efecto" o aglucosilación. Todavía en otra divulgación, la mutación en Fc sin efecto es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

En otro aspecto, la región variable de la cadena pesada comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (FR-H1)-(HVR-H1)-(FR-H2)-(HVR-H2)-(FR-H3)-(HVR-H3)-(FR-H4), y la región variable de la cadena ligera comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (FR-L1)-(HVR-L1)-(FR-L2)-(HVR-L2)-(FR-L3)-(HVR-L3)-(FR-L4). Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena pesada se derivan de una secuencia del subgrupo I, II o III de Kabat. Todavía en otro aspecto, la secuencia estructural de la cadena pesada es una región estructural consenso del subgrupo III de VH. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena pesada es la siguiente:

10	FR-H1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	(SEQ ID NO:29)
	FR-H2	WVRQAPGKGLEWVA	(SEQ ID NO:30)
15	FR-H3	RFTISADTSKNTAYLOMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO:10)
	FR-H4	WGQGTLVTVSS	(SEQ ID NO:27).

Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo kappa I, II, III o IV de Kabat. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera son la región estructural consenso de kappa I de VL. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena ligera es la siguiente:

20	FR-L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	(SEQ ID NO:15)
25	FR-L2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO:16)
	FR-L3	GVPSRFGSGSGTDFTLTSSLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO:17)
30	FR-L4	FGQQGTTKVEIK	(SEQ ID NO:28).

Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo comprende además una región constante humana o murina. Todavía en otro aspecto, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Todavía en otro aspecto específico, la región constante humana es IgG1. Todavía en otro aspecto, la región constante murina se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Todavía en otro aspecto, la región constante murina es IgG2A. Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo tiene una función efectora reducida o mínima. Todavía en otro aspecto específico, la función efectora mínima resulta de una "mutación en Fc sin efector" o aglucosilación. Todavía en otra divulgación, la mutación en Fc sin efector es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

Aún en otra divulgación, se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 que comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que:

(c) la cadena pesada comprende además una secuencia de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con respecto a GFTFSDSWIH (SEQ ID NO:19), AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:20) y RWWPFGFDY (SEQ ID NO:21), respectivamente, y/o

(d) la cadena ligera comprende además una secuencia de HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con respecto a RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:22), SASFLYS (SEQ ID NO:23) y QQYLYHPAT (SEQ ID NO:24), respectivamente.

En un aspecto específico, la identidad de secuencia es de un 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100%.

55 En otro aspecto, la región variable de la cadena pesada comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (FR-H1)-(HVR-H1)-(FR-H2)-(HVR-H2)-(FR-H3)-(HVR-H3)-(FR-H4), y la región variable de la cadena ligera comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (FR-L1)-(HVR-L1)-(FR-L2)-(HVR-L2)-(FR-L3)-(HVR-L3)-(FR-L4). Aún en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena pesada se derivan de una secuencia del subgrupo I, II o III de Kabat. Todavía en otro aspecto, la secuencia estructural de la cadena pesada es una región estructural consenso del subgrupo III de VH. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena pesada se exponen como SEQ ID NO:8, 9, 10 y WGQGTLVTVSSASTK (SEQ ID NO:31).

Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo kappa I, II, III o IV de Kabat. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera son la región estructural consenso de kappa I de VL. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena ligera se exponen como SEQ ID NO:15, 16, 17 y 18. Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo comprende además una región constante humana o murina. Todavía en otro aspecto, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Todavía en otro aspecto específico, la región constante humana es IgG1. Todavía en otro aspecto, la región constante murina se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Todavía en otro aspecto, la región constante murina es IgG2A. Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo tiene una función efectora reducida o mínima. Todavía en otro aspecto específico, la función efectora mínima resulta de una "mutación en Fc sin efector" o aglucosilación. Todavía en otra divulgación, la mutación en Fc sin efector es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

Todavía en otra divulgación, se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que:

(a) la secuencia de la cadena pesada tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con respecto la secuencia de la cadena pesada:

EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTESDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQCTLTVSSASTK (SEQ ID NO:26).

0

(b) la secuencia de la cadena ligera tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de la cadena ligera:

DIONMTQSPSSLSASVQDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCCQQLYHPATFGQQTKVEIKR (SEQ ID NO:4).

En algunas divulgaciones, se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que la secuencia de la región variable de la cadena ligera tiene al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4. En algunas divulgaciones, se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que la secuencia de la región variable de la cadena pesada tiene al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26. En algunas divulgaciones, se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que la secuencia de la región variable de la cadena ligera tiene al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 y la secuencia de la región variable de la cadena pesada tiene al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26. En algunas divulgaciones, uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos de aminoácido en el extremo N terminal de la cadena pesada y/o ligera se pueden delecionar, sustituir o modificar.

Todavía en otra divulgación, se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que:

(a) la secuencia de la cadena pesada tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con respecto la secuencia de la cadena pesada:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPQQFDYWQQGTLTVSSASTKQPSVFPLAPSSKSTS

GGTAALGCLVKDYFPEPVTVWNNGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPK  
SNTKVDKKVEPKSODKTHTCPPCPAPELLOGPSVLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVVEVHNNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAQGQP  
RQVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKOFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTPPVLDSDQFFLYSKLTVDKS  
RWOQGNVFSCSVNHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:32).

y/o

- 5 (b) la secuencia de la cadena ligera tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de la cadena ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD  
FTLTISLQPEDFATYYCQOYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEOLKSGTASVVCLNNFYP  
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN  
RGEC (SEQ ID NO:33).

- 10 En algunas divulgaciones, se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que la secuencia de la cadena ligera tiene al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33.
- 15 En algunas divulgaciones, se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que la secuencia de la cadena pesada tiene al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ
- 20 ID NO:32. En algunas divulgaciones, se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que la secuencia de la cadena ligera tiene al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ
- 25 ID NO:33 y la secuencia de la cadena pesada tiene al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32.
- 30 En algunas divulgaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 aislado está aglucosilado. La glucosilación de anticuerpos está típicamente unida a N o bien unida a O. Unida a N se refiere a la unión del resto glucídico a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripeptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto glucídico a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripeptido en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación unida a O se refiere a la unión de uno de los glucídicos N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, lo más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. La retirada de sitios de glucosilación para formar un anticuerpo se logra convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se retire una de las secuencias de tripeptido descritas anteriormente (para sitios de glucosilación unida a N). La alteración se puede realizar por sustitución de un residuo de asparagina, serina o treonina dentro del sitio de glucosilación con otro residuo de aminoácido (por ejemplo, glicina, alanina o una sustitución conservadora).

- 45 En cualquiera de las divulgaciones 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 a UniProtKB/Swiss-Prot Q9NZQ7.1, o una variante del mismo.

Todavía en otra divulgación, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento. En algunas divulgaciones, el ácido nucleico comprende además un vector

5 adecuado para la expresión del ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 descritos previamente. Todavía en otro aspecto específico, el vector está en una célula huésped adecuada para la expresión del ácido nucleico. Todavía en otro aspecto específico, la célula huésped es una célula eucariota o una célula procariota. Todavía en otro aspecto específico, la célula eucariota es una célula de mamífero, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO).

10 El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se puede preparar usando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, por un procedimiento que comprende cultivar una célula huésped que contiene ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno descritos previamente en una forma adecuada para su expresión, en condiciones adecuadas para producir dicho anticuerpo o fragmento, y recuperar el anticuerpo o fragmento.

15 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 las divulgaciones enumeradas anteriormente puedan tener cualquiera de los rasgos característicos, individualmente o en combinación, descritos en las secciones 1-7 a continuación.

#### 20 1. Afinidad de los anticuerpos

25 En determinadas divulgaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 o un anticuerpo anti-PD-1) tiene una constante de disociación ( $K_d$ ) de  $\leq 1 \mu\text{M}$ ,  $\leq 100 \text{nM}$ ,  $\leq 10 \text{nM}$ ,  $\leq 1 \text{nM}$ ,  $\leq 0,1 \text{nM}$ ,  $\leq 0,01 \text{nM}$  o  $\leq 0,001 \text{nM}$  (por ejemplo,  $10^{-8} \text{ M}$  o menos, por ejemplo, de  $10^{-8} \text{ M}$  a  $10^{-13} \text{ M}$ , por ejemplo, de  $10^{-9} \text{ M}$  a  $10^{-13} \text{ M}$ ).

30 35 En un aspecto, se mide la  $K_d$  por un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA). En una divulgación, se realiza un RIA con la versión de Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno. Por ejemplo, se mide la afinidad de unión en solución de los Fab por el antígeno equilibrando Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con ( $^{125}\text{I}$ ) en presencia de una serie de valoraciones de antígeno no marcado, capturando, a continuación, el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren placas de múltiples pocillos MICROTITER® (Thermo Scientific) durante la noche con 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6) y posteriormente se bloquean con seroalbúmina bovina al 2 % (p/v) en PBS durante de dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (n.º 269620 de Nunc), se mezcla  $[^{125}\text{I}]$ -antígeno 100 pM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, consecuente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta *et al.*, *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). A continuación, el Fab de interés se incuba durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo más largo (por ejemplo, de aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcanza el equilibrio. Después de esto, se transfieren las mezclas a la placa de captura para su incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). A continuación, se retira la solución y se lava la placa ocho veces con polisorbato 20 (TWEEN-20®) al 0,1 % en PBS. Cuando las placas se hayan secado, se añaden 150  $\mu\text{l}/\text{pocillo}$  de centelleador (MICROSCINT-20™, Packard) y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Se eligen concentraciones de cada Fab que dan menos de o igual a un 20 % de unión máxima para su uso en ensayos de unión competitiva.

40 45 De acuerdo con otra divulgación, se mide la  $K_d$  usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial en BIACORE®. Por ejemplo, se realiza un ensayo usando un BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips CM5 con antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). En una divulgación, se activan chips de biosensor con dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc.) con clorhidrato de  $N$ -etil- $N$ -(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y  $N$ -hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (~0,2  $\mu\text{M}$ ) antes de su inyección a un caudal de 5  $\mu\text{l}/\text{minuto}$  para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Despues de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie de dos veces de Fab (de 0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo polisorbato 20 (TWEEN-20™) (PBST) al 0,05 % a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Se calculan las tasas de asociación ( $k_{as}$ ) y las tasas de disociación ( $k_{dis}$ ) usando un simple modelo de unión uno a uno de Langmuir (programa informático de evaluación de BIACORE®, versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio ( $K_d$ ) se calcula como la proporción  $k_{dis}/k_{as}$ . Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). Si la tasa de asociación sobrepasa  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  por el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces, se puede determinar la tasa de asociación usando una técnica de extinción fluorescente que mide el incremento o disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación=295 nm; emisión=340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo antiantígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ de la serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

## 2. Fragmentos de anticuerpo

En determinadas divulgaciones, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 o un anticuerpo anti-PD-1) 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, eds. Rosenburg y Moore, (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); véanse también el documento WO 93/16185; y las patentes de EE. UU. n.º 5.571.894 y 5.587.458. Para un análisis de los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> que comprenden residuos de epítopos 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, el documento EP 404.097; el documento 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 determinadas divulgaciones, 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), como se describe en el presente documento.

## 3. Anticuerpos químéricos y humanizados

En determinadas divulgaciones, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 o un anticuerpo anti-PD-1) proporcionado en el presente documento es un anticuerpo químérico. Se describen determinados anticuerpos químéricos, 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 químérico 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 químérico es un anticuerpo de "clase cambiada" en el que se ha cambiado la clase o subclase de la del anticuerpo original. Los anticuerpos químéricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

En determinadas divulgaciones, un anticuerpo químérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente, se humaniza un anticuerpo no humano para reducir la inmunogenicidad con respecto a los seres humanos, mientras que se retienen 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 algunas divulgaciones, 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 preparación de los mismos 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); las patentes de EE. UU. n.º 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Kashmiri *et al.*, *Methods* 36:25-34 (2005) (que describen el injerto de regiones determinantes 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 describen el "barajado de FR"); y Osbourn *et al.*, *Methods* 36:61-68 (2005) y Klimka *et al.*, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (que describen el enfoque de "selección guiada" con respecto al barajado 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 (véanse, 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 (mutadas somáticamente) humanas o regiones estructurales de la 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 (véanse, por ejemplo, Baca *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) y Rosok *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

#### 4. Anticuerpos humanos

En determinadas divulgaciones, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 o un anticuerpo anti-PD-1) proporcionado en el presente documento es un anticuerpo humano. Se pueden producir anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Se describen, en general, anticuerpos humanos 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 haya modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a la exposición antigenica. Dichos animales típicamente contienen todos o una porción de los locus de inmunoglobulina humana, que remplazan los locus de inmunoglobulina endógena, o que están presentes de forma extracromosómica o integrados aleatoriamente en los cromosomas del animal. En dichos ratones transgénicos, los locus de inmunoglobulina endógena, en general, se han inactivado. Para una revisión de los procedimientos para obtener anticuerpos humanos 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 de células de mieloma humano y de heteromieloma ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Véanse, por ejemplo, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New 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 de células 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 para Fv seleccionadas de colecciones de presentación en fagos derivadas de seres humanos. 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.

#### 5. Anticuerpos derivados de colecciones

Los anticuerpos de la divulgación (por ejemplo, anticuerpos anti-PD-L1 y anticuerpos anti-PD-1) se pueden aislar cribando colecciones combinatorias para determinar anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, es conocida en la técnica una variedad de procedimientos para generar colecciones de presentación en fagos y cribar dichas colecciones para determinar los anticuerpos que posean las características de unión deseadas. Dichos procedimientos se revisan, por ejemplo, en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (ed. O'Brien *et al.*, Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen además, por ejemplo, en McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554; Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks y Bradbury, en *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (ed. Lo, 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 clonian 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 determinar el fago de unión a antígeno como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Los fagos típicamente 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 requerimiento de construir hibridomas. De forma alternativa, se puede clonar el repertorio sin exposición previa (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 sin exposición previa clonando segmentos de genes V no reordenados a partir de células madre y usando cebadores de PCR que contengan secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 altamente variables y 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.

5      *6. Anticuerpos multiespecíficos*

En uno cualquiera de los aspectos anteriores, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 o un anticuerpo anti-PD-1) proporcionado en el presente documento puede ser 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 determinadas divulgaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. En determinadas divulgaciones, una de las especificidades de unión es por PD-L1 y la otra es por cualquier otro antígeno. En determinadas divulgaciones, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítopos diferentes de PD-L1. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos con respecto a las células que expresan PD-L1. 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, la coexpresión recombinante de dos pares cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tengan diferentes especificidades (véase Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), el documento WO 93/08829 y Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), y la 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 en 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, Kostelný *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 triespecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt *et al.* *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

30     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).

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

7. Variantes de anticuerpo

40     En determinadas divulgaciones, se contemplan variantes de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti-PD-L1 y anticuerpos anti-PD-1). Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se pueden preparar variantes de la 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, delecciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de delección, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno.

*I. Variantes de sustitución, inserción y delección*

50     En determinadas divulgaciones, se proporcionan variantes de anticuerpo 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 1 bajo el encabezado "sustituciones preferentes". Se proporcionan cambios más sustanciales en la tabla 1 bajo el encabezado "sustituciones ejemplares" y como se describe además a continuación en referencia a las clases de cadenas laterales de aminoácidos. Se pueden introducir sustituciones aminoacídicas en un anticuerpo de interés y cribar los productos para determinar una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno retenida/mejorada, immunogenicidad disminuida, o ADCC o CDC mejorada.

**Tabla 1. 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)	Gin; His; Asp, Lys; Arg	Gln

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

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

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

5

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

(3) ácidos: Asp, Glu;

10 (4) básicos: His, Lys, Arg;

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

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

15

Las sustituciones no conservadoras supondrán 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 otro estudio tendrán modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad incrementada y/o inmunogenicidad reducida) en relación con el anticuerpo original y/o habrán retenido sustancialmente determinadas propiedades biológicas del anticuerpo original. Una variante de sustitución ejemplar es un anticuerpo madurado en afinidad, que se puede generar convenientemente, por ejemplo, usando técnicas de maduración en 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 fago y se criban para determinar una actividad biológica particular (por ejemplo, la afinidad de unión).

Se pueden realizar alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en las HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad de los anticuerpos. Dichas alteraciones se pueden realizar en "puntos calientes" de HVR, es decir, residuos codificados por codones que se someten a 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, sometiéndolo a prueba el VH o VL variante resultante para determinar la afinidad de unión. La maduración en afinidad por construcción y reselección de colecciones secundarias se ha descrito, por ejemplo, en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (ed. O'Brien *et al.*, Human Press, Totowa, NJ, (2001)). En algunas divulgaciones de la maduración en afinidad, se introduce diversidad en los genes variables elegidos para la 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 como diana, en particular, CDR-H3 y CDR-L3.

- 5 En determinadas divulgaciones, se pueden producir sustituciones, inserciones o delecciones 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 realizar 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 determinadas divulgaciones 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.
- 10 Un procedimiento útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que se pueden seleccionar como diana para la mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe por Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. En este procedimiento se identifican un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados, tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) y se remplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Se pueden introducir otras sustituciones en las localizaciones aminoacídicas que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. De forma alternativa, o adicionalmente, una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos adyacentes se pueden seleccionar como diana o eliminar como candidatos para la sustitución. Se pueden cribar variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.
- 15 20 25 30 Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxiterminales que varían en longitud desde un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuenciales de residuos de aminoácido únicos 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 al extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que incrementa la semivida en suero del anticuerpo.

### *II. Variantes de glucosilación*

- 35 En determinadas divulgaciones, los anticuerpos se pueden alterar para incrementar o disminuir el grado en que el anticuerpo se glucosila. La adición o delección de sitios de glucosilación en un anticuerpo de la divulgación se puede lograr convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se cree o retire uno o más sitios de glucosilación.
- 40 Si el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato unido a la misma. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero típicamente comprenden un oligosacárido biantenario ramificado que se une, 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 unida a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura de oligosacárido biantenario. En algunas divulgaciones, se pueden realizar modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo para crear variantes de anticuerpo con determinadas propiedades mejoradas.
- 50 55 60 65 En una divulgación, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una estructura glucídica que carece de fucosa unida (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 en la cadena glucídica en Asn297, en relación con la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn 297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y de alto contenido en manosa) como se mide por espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2008/077546. 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, la Asn297 también se puede localizar aproximadamente  $\pm$  3 aminoácidos en dirección 5' o en dirección 3' de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia sin importancia en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una función ADCC mejorada. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de EE. UU. n.º 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; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki *et al.* *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al.* *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares que pueden producir anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lec 13 carentes de fucosilación de proteínas (Ripka *et al.* *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); la sol. de pat. de EE. UU. n.º US 2003/0157108 A1; y el documento WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente en el ejemplo 11) y líneas celulares con genes inactivados, tales como el gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*,

células CHO con genes inactivados (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 WO2003/085107).

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

### *III. Variantes de la región Fc*

15 En determinadas divulgaciones, se pueden introducir una o más modificaciones aminoacídicas en la región Fc de un anticuerpo, 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 comprenda una modificación aminoacídica (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones aminoacídicas.

20 En determinadas divulgaciones, la divulgación contempla una variante de anticuerpo que posee algunas, pero no todas, las funciones efectoras, que le convierten en 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 la 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 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 FcγR (de ahí que probablemente carezca de actividad ADCC), pero retenga su capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, expresan solo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. 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 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); el documento 5.821.337 (véase Bruggemann, M. *et al.*, *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). De forma alternativa, se pueden emplear procedimientos de ensayo no radioactivo (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACT™ 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 monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, se puede evaluar *in vivo* la actividad 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 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 (véanse, 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 la unión a FcRn y de eliminación/semivida *in vivo* usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova *et al.* *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

50 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 con respecto a Fc incluyen mutantes con respecto a Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones aminoacídicas 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el llamado mutante con respecto a Fc "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 con alanina (patente de EE. UU. n.º 7.332.581 y 8.219.149).

55 Se describen determinadas variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a los FcR. (Véanse, 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)).

60 En determinadas divulgaciones, 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).

65 En algunas divulgaciones, las alteraciones se realizan en la región Fc, que dan como resultado una unión a C1q y/o 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).

65 En el documento US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*) se describen anticuerpos con semivididas incrementadas y unión

mejorada al receptor de Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)). Estos 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, 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.

#### *IV. Variantes de anticuerpo genomanipulado con cisteína*

En determinadas divulgaciones, puede ser deseable crear anticuerpos genomanipulados con cisteína, por ejemplo, "thioMAb", en los que uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen con residuos de cisteína. En algunas divulgaciones, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Sustituyendo 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 a otros restos, tales como restos de fármaco o restos de conector-fármaco, para crear un inmunoconjungado, como se describe además en el presente documento. En determinadas divulgaciones, se puede sustituir uno cualquiera o más de los siguientes residuos con cisteína: 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.

#### *V. Derivados de anticuerpo*

En determinadas divulgaciones, un anticuerpo 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 solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, polí(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 polí(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de polí(óxido de propileno/óxido de etileno), polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), polí(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 unidos al anticuerpo puede variar, y, si se une más de un polímero, pueden ser las mismas moléculas o 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, independientemente de si el derivado de anticuerpo se usará en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

En otra divulgación, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y un resto no proteínico que se pueden calentar de forma selectiva por exposición a radiación. En una divulgación, 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, las longitudes de onda que no dañan a las células normales, pero que calientan el resto no proteínico a una temperatura en la que se destruyen las células proximales al anticuerpo-resto no proteínico.

#### *VI. Inmunoconjungados*

La invención también proporciona inmunoconjungados que comprenden un anticuerpo en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 o un anticuerpo anti-PD-1) 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 una divulgación, un inmunoconjungado 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 de fármaco de 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 antracicicina, 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 otra divulgación, un inmunoconjungado 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, la cadena A de difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina diftérica, la cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modecina, 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 otra divulgación, un inmunoconjungado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado a un átomo radioactivo para formar un radioconjungado. Está disponible una variedad de isótopos radioactivos para la producción de radioconjungados. Los ejemplos incluyen 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>, Pb<sup>212</sup> e isótopos radioactivos de Lu. Cuando el radioconjungado se usa para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para estudios de centellografía, por ejemplo, Tc99m o I123, 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. Se pueden preparar conjugados de un anticuerpo y un agente citotóxico usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (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 de 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-dinitrobenceno). 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-metildietilentriaminopentaacético (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 facilite 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); patente de EE. UU. n.º 5.208.020).

Los inmunoconjungados 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. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas de los antagonistas de unión al eje PD-L1 usadas de acuerdo con la presente divulgación (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, MPDL3280A)) se preparan para su almacenamiento mezclando el antagonista que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Para la información general en relación con las formulaciones, véanse, por ejemplo, Gilman *et al.* (eds.) *The Pharmacological Bases of Therapeutics*, 8.<sup>a</sup> ed., Pergamon Press, 1990; A. Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18.<sup>a</sup> edición, Mack Publishing Co., Pennsylvania, 1990; Avis *et al.* (eds.) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications* Dekker, New York, 1993; Lieberman *et al.* (eds.) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets* Dekker, New York, 1990; Lieberman *et al.* (eds.), *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems* Dekker, New York, 1990; y Walters (ed.) *Dermatological and Transdermal Formulations* (Drugs and the Pharmaceutical Sciences), vol. 119, Marcel Dekker, 2002.

Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecidimetilbencílamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos, tales como metil- o propilparabeno; catecol; resorcínl; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipeptídos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; glúcidos, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos de metal (por ejemplo, complejos Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

La formulación en el presente documento también puede contener más de un compuesto activo, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se vean afectadas de forma adversa entre sí. El tipo y cantidades eficaces de dichos medicamentos dependen, por ejemplo, de la cantidad y tipo de antagonista presente en la

formulación y los parámetros clínicos de los sujetos.

Los ingredientes activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divultan en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16.<sup>a</sup> edición, ed. Osol, A. (1980).

- 5 10 Se pueden preparar preparaciones de liberación mantenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación mantenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el antagonista, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación mantenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (pat. de EE. UU. n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de γ-etilo, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como LUPRON DEPOT<sup>TM</sup> (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprorrelina) y poli(ácido D-(–)-3-hidroxibutírico).
- 15 20 Las formulaciones que se van a usar para su administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se debe entender que cualquiera de los artículos de fabricación anteriores puede incluir un inmunoconjungado descrito en el presente documento en lugar de o además de un antagonista de unión al eje PD-L1.

## 25 VI. Kits de diagnóstico y artículos de fabricación

En el presente documento se proporcionan kits de diagnóstico que comprenden uno o más reactivos para determinar la presencia de un biomarcador (por ejemplo, niveles de expresión de PD-L1, por ejemplo, en células tumorales y/o células inmunitarias infiltrantes de tumor) en una muestra de un individuo o paciente con una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer, incluyendo carcinoma de pulmón no microcítico). En algunos casos, la presencia del biomarcador en la muestra indica una mayor probabilidad de eficacia cuando se trata al individuo con un antagonista de unión al eje PD-L1. En algunos casos, la ausencia del biomarcador en la muestra indica una menor probabilidad de eficacia cuando se trata al individuo con el antagonista de unión al eje PD-L1. Opcionalmente, el kit puede incluir además instrucciones de uso del kit para seleccionar un medicamento (por ejemplo, un antagonista de unión al eje PD-L1, tal como un anticuerpo anti-PD-L1, tal como MPDL3280A) para tratar la enfermedad o trastorno si el individuo expresa el biomarcador en la muestra. En otro caso, las instrucciones son para usar el kit para seleccionar un medicamento distinto del antagonista de unión al eje PD-L1 si el individuo no expresa el biomarcador en la muestra.

40 En el presente documento también se proporcionan artículos de fabricación que incluyen, envasados juntos, un antagonista de unión al eje PD-L1 (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1) en un vehículo farmacéuticamente aceptable y un prospecto del envase que indica que el antagonista de unión al eje PD-L1 (por ejemplo, anticuerpo anti-PD-L1) es para tratar a un paciente con una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) en base a la expresión de un biomarcador. Los procedimientos de tratamiento incluyen cualquiera de los procedimientos de tratamiento divulgados en el presente documento. Además, se proporciona la divulgación que se relaciona con un procedimiento para fabricar un artículo de fabricación que comprende combinar en un envase una composición farmacéutica que comprende un antagonista de unión al eje PD-L1 (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1) y un prospecto del envase que indica que la composición farmacéutica es para tratar a un paciente con una enfermedad o trastorno en base a la expresión de un biomarcador (por ejemplo, niveles de expresión de PD-L1, por ejemplo, en células tumorales y/o células inmunitarias infiltrantes de tumor).

50 55 El artículo de fabricación puede incluir, por ejemplo, un recipiente y una ficha técnica o prospecto del envase en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas y similares. El recipiente se puede formar a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente aloja o contiene una composición que comprende el medicamento contra el cáncer como agente activo y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica).

60 65 El artículo de fabricación puede incluir además un segundo recipiente que comprende un tampón diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y/o solución de dextrosa. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

El artículo de fabricación de la presente divulgación también incluye información, por ejemplo, en forma de un prospecto del envase, que indica que la composición se usa para tratar el cáncer en base al nivel de expresión del/de los biomarcador(es) en el presente documento. El prospecto o ficha técnica puede tomar cualquier forma, tal como

papel o en medios electrónicos, tales como un medio grabado magnéticamente (por ejemplo, un disquete), un CD-ROM, una unidad *flash* de bus en serie universal (USB) y similares. La ficha técnica o prospecto también puede incluir otra información en relación con las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación en el kit o artículo de fabricación.

5

## **EJEMPLOS**

Se proporcionan los siguientes ejemplos para ilustrar, pero no para limitar, la invención reivindicada actual.

10 **Ejemplo 1: Análisis inmunohistoquímico (IHQ) de la expresión de PD-L1 en muestras de tumor**

*Inmunohistoquímica (IHQ):* se desparafinaron cortes tisulares fijados con formol e incluidos en parafina antes de la recuperación, bloqueo e incubación antigenicos con anticuerpo anti-PD-L1 primario. Después de la incubación con anticuerpo secundario y desarrollo de color enzimático, se contratiñeron los cortes y se deshidrataron en series de alcoholes y xilenos antes de taparse con cubreobjetos.

15 Se usó el siguiente protocolo para IHQ. Se usó el sistema Ventana Benchmark XT o Benchmark Ultra para realizar la tinción IHQ para PD-L1 usando los siguientes reactivos y materiales:

20 *anticuerpo primario:* anticuerpo primario monoclonal de conejo anti-PD-L1

*tipo de muestra:* corte fijado con formol e incluido en parafina (FFPE) de muestras de tumor

*condiciones de recuperación de epítopo:* acondicionamiento celular, 1 estándar (CC1, Ventana, n.º de cat. 950-124)

25 *condiciones de anticuerpo primario:* 1/100, 6,5 µg/ml durante 16 minutos a 36 °C

*diluyente:* tampón de dilución de anticuerpos (solución salina tamponada con Tris que contenía proteína transportadora y BRIJ™-35)

30 *control negativo:* IgG de conejo sin exposición previa a 6,5 µg/ml (Cell Signaling) o diluyente solo

*detección:* se usaron el kit de detección por DAB universal Optiview o ultra View (Ventana) y el kit de amplificación (cuando fue aplicable) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Ventana).

35 *contratinción:* hematoxilina II de Ventana (n.º de cat. 790-2208)/ con reactivo Bluing (n.º de cat. 760-2037) (4 minutos y 4 minutos, respectivamente)

El protocolo para Ventana Benchmark fue como sigue:

40 1. parafina (seleccionado)

2. desparafinación (seleccionado)

45 3. acondicionamiento celular (seleccionado)

4. acondicionador n.º 1 (seleccionado)

5. CC1 estándar (seleccionado)

50 6. temperaturas de incubación de Ab (seleccionado)

7. inc. de Ab a 36 °C (seleccionado)

55 8. valoración (seleccionado)

9. autodistribuir (anticuerpo primario) e incubar durante (16 minutos)

10. contratinción (seleccionado)

60 11. aplicar una gota de (hematoxilina II) (contratinción), aplicar cubreobjetos e incubar durante (4 minutos)

12. poscontratinción (seleccionado)

65 13. aplicar una gota de (REACTIVO BLUING) (poscontratinción), aplicar cubreobjetos e incubar durante (4 minutos)

14. lavar los portaobjetos con agua jabonosa para retirar el aceite
15. aclarar los portaobjetos con agua
- 5 16. deshidratar los portaobjetos a través de etanol al 95 %, etanol al 100 % con respecto a xileno (programa de autotefñidor n.º 9 de Leica)
17. cubreobjetos.
- 10 **Ejemplo 2: La expresión de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor y en células tumorales son factores pronóstico independientes para la respuesta al tratamiento con un anticuerpo anti-PD-L1 en un carcinoma de pulmón no microcítico**
- 15 Se evaluó la correlación entre la expresión de PD-L1 en diversos tipos de células presentes dentro de tumores con respuesta al tratamiento con antagonistas de unión al eje PD-L1.
- 20 La expresión de PD-L1 en muestras de tumor antes del tratamiento se evaluó usando inmunohistoquímica (IHQ) como se describe en el ejemplo 1 en varios ensayos clínicos en curso para el tratamiento de pacientes de cáncer con MPDL3280A que incluyen cohortes de pacientes con CPNM, incluyendo un ensayo clínico de fase Ia y dos ensayos clínicos de fase II. Las muestras de tumor se puntuaron en cuanto a la positividad para PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor y en células tumorales de acuerdo con ambos de los criterios para la evaluación diagnóstica mostrados en la tabla 2 y tabla 3, respectivamente. El ensayo de fase Ia en curso es en pacientes con tumores sólidos avanzados y neoplasias hemáticas para evaluar la seguridad y tolerabilidad de un anticuerpo anti-PD-L1 (MPDL3280A) administrado por infusión intravenosa cada 3 semanas a una dosis de 1200 mg. El estudio contiene una gran cohorte de pacientes con CPNM (n=88). Ambos estudios de fase II en curso (denominados en el presente documento "fase II-1" y "fase II-2") incluyen pacientes con CPNM localmente avanzado y metastásico a los que se les ha administrado MPDL3280A en la misma pauta posológica que el ensayo clínico de fase Ia (1200 mg i. v. cada 3 semanas).
- 25

**Tabla 2: Criterios de diagnóstico de IHQ en células inmunitarias (CI) infiltrantes de tumor**

30

Evaluación diagnóstica para PD-L1	Puntuación en CI
Ausencia de cualquier tinción para PD-L1 reconocible o presencia de tinción para PD-L1 reconocible de cualquier intensidad en células inmunitarias infiltrantes de tumor que cubren <1 % del área tumoral ocupada por células tumorales, estroma intratumoral asociado y estroma desmoplásico peritumoral contiguo	CI0
Presencia de tinción para PD-L1 reconocible de cualquier intensidad en células inmunitarias infiltrantes de tumor que cubren de ≥1 % a <5 % del área tumoral ocupada por células tumorales, estroma intratumoral asociado y estroma desmoplásico peritumoral contiguo	CI1
Presencia de tinción para PD-L1 reconocible de cualquier intensidad en células inmunitarias infiltrantes de tumor que cubren de ≥5 % a <10 % del área tumoral ocupada por células tumorales, estroma intratumoral asociado y estroma desmoplásico peritumoral contiguo	CI2
Presencia de tinción para PD-L1 reconocible de cualquier intensidad en células inmunitarias infiltrantes de tumor que cubren ≥10 % del área tumoral ocupada por células tumorales, estroma intratumoral asociado y estroma desmoplásico peritumoral contiguo	CI3

**Tabla 3: Criterios de diagnóstico de IHQ en células tumorales (CT)**

Evaluación diagnóstica para PD-L1	Puntuación en CT
Ausencia de cualquier tinción para PD-L1 reconocible o presencia de tinción para PD-L1 reconocible de cualquier intensidad en <1 % de las células tumorales	CT0
Presencia de tinción para PD-L1 reconocible de cualquier intensidad en ≥1 % a <5 % de las células tumorales	CT1

Evaluación diagnóstica para PD-L1	Puntuación en CT
Presencia de tinción para PD-L1 reconocible de cualquier intensidad en $\geq 5\%$ a $<50\%$ de las células tumorales	CT2
Presencia de tinción para PD-L1 reconocible de cualquier intensidad en $\geq 50\%$ de las células tumorales	CT3

PD-L1 se expresó ampliamente en muchos cánceres humanos, incluyendo CPNM, cáncer de vejiga, carcinoma de células renales, melanoma, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC), cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de mama triple negativo y cáncer de próstata, como se determina por IHQ usando un anticuerpo de diagnóstico anti-PD-L1, como se describe en el ejemplo 1 (figura 1 A). Se evaluaron muestras de CPNM tanto de ensayos con tumores previos al tratamiento de ensayos con MPDL3280A ( $n=498$ ) como de una cohorte no perteneciente al ensayo ( $n=706$ ) para determinar la expresión de PD-L1 en células tumorales y en células inmunitarias infiltrantes de tumor usando el ensayo IHQ anti-PD-L1, como se describe en el ejemplo 1. Las muestras se puntuaron como CT0-3 y CI0-3 en base a la expresión de PD-L1 creciente en células tumorales y en células inmunitarias infiltrantes de tumor, respectivamente. Los tumores con CT3 o CI3, CT2/3 o CI2/3 y CT1/2/3 o CI1/2/3 representaron aproximadamente un 20 %, 40 % y 65 % de las muestras de CPNM, respectivamente.

Se identificaron distintas subpoblaciones de pacientes con CPNM sobre la base de la expresión de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor y células tumorales en muestras de tumor de pacientes (figuras 1B-1D; figuras 2A-2B). Los tumores con CT3 y los tumores con CI3 representaron dos subpoblaciones distintas; existió un solapamiento de menos de un 1 % de las muestras de tumor que se puntuaron como CT3 y que se puntuaron como CI3 usando los criterios descritos en las tablas 2 y 3. Las muestras de tumor con CT3 o CI3 representaron una fracción significativa de los tumores de CPNM (véanse, por ejemplo, las figuras 2A-2B y la figura 11).

Los patrones de expresión de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor y en células tumorales en muestras de tumor obtenidas de pacientes con CPNM incluidos en los ensayos clínicos descritos anteriormente se correlacionaron con la respuesta de los pacientes al tratamiento. En cada ensayo clínico, la expresión de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor y en células tumorales predijo independientemente el resultado del tratamiento con MPDL3280 en pacientes con CPNM (figuras 3A-3B). Por ejemplo, los pacientes en los que sus muestras de tumor tenían una puntuación IHQ para PD-L1 CI3 tenían una tasa de respuesta global (TRG) de un 44 % en el ensayo clínico de fase Ia, y los pacientes en los que sus muestras de tumor tenían una puntuación IHQ para PD-L1 CT3 tenían una TRG de un 50 % (figura 3A). Por el contrario, los pacientes con CPNM en los que sus muestras de tumor no se puntuaron como CT3 o CI3 tenían una TRG de un 14 %.

Se observaron resultados similares en ambos ensayos clínicos de fase II. En el ensayo clínico de fase II-1, se usaron RECISTm (figura 3B) y RECIST v1.1 (figura 3C) para determinar los resultados de eficacia. El estudio incluyó 3 cohortes de pacientes: la cohorte 1 incluyó pacientes con CPNM con 1L; la cohorte 2 incluyó pacientes con CPNM con  $\geq 2L$  sin metástasis cerebrales; y la cohorte 3 incluyó pacientes con CPNM con  $\geq 2L$  con metástasis cerebrales tratadas. En particular, los pacientes en las cohortes 2 y 3 en los que sus muestras de tumor se puntuaron como CT3 o CI3 mostraron una TRG incrementada y una supervivencia sin progresión (SSP) a los 6 meses en comparación con toda la población de pacientes después del tratamiento con atezolizumab (MPDL3280A) (figuras 3B-3C).

En el ensayo clínico de fase II-2, la puntuación IHQ en CI y CT fue predictiva de una supervivencia global, supervivencia sin progresión y tasa de respuesta global mejoradas de los pacientes con CPNM tratados con atezolizumab (MPDL3280A) (figuras 3D-3F). La expresión de PD-L1 en células tumorales y en células inmunitarias infiltrantes de tumor se asoció con una supervivencia global mejorada después del tratamiento con MPDL3280A en comparación con los pacientes en los que sus muestras de tumor eran CT0 y CI0 (figura 3D). Los pacientes en los que sus muestras de tumor se puntuaron como CT3 o CI3 mostraron una supervivencia global incrementada después del tratamiento con MPDL3280A en comparación con los pacientes en los que sus muestras de tumor se puntuaron como CT0 y CI0 (figura 3D). El punto de corte inferior de CT2/3 o CI2/3 también fue predictivo de la supervivencia global (figura 3D).

La expresión de PD-L1 en células tumorales y en células inmunitarias infiltrantes de tumor se asoció con una supervivencia sin progresión mejorada después del tratamiento con MPDL3280A en comparación con los pacientes en los que sus muestras de tumor eran CT0 y CI0 (figura 3E). Los pacientes en los que sus muestras de tumor se puntuaron como CT3 o CI3 mostraron una supervivencia sin progresión mejorada después del tratamiento con MPDL3280A en comparación con los pacientes en los que sus muestras de tumor se puntuaron como CT0 y CI0 (figura 3E).

La expresión de PD-L1 en células tumorales y en células inmunitarias infiltrantes de tumor también se asoció con una TRG incrementada en el estudio de fase II-2 (figura 3F). Los pacientes en los que sus muestras de tumor tenían una puntuación IHQ para PD-L1 CT3 o CI3 tenían una TRG de un 38 % después del tratamiento con atezolizumab (MPDL3280A), en comparación con una TRG de un 13 % después del tratamiento con docetaxel (figura 3F). La TRG de los pacientes con tumores con CI3 o CT3 tratados con MPDL3280A también fue mayor que la de los pacientes en los que sus muestras de tumor se puntuaron como CT0 y CI0 (figura 3F).

Por lo tanto, la expresión de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor y la expresión de PD-L1 en células tumorales representan biomarcadores predictivos independientes para la respuesta al tratamiento con antagonistas de unión al eje PD-L1, incluyendo los anticuerpos anti-PD-L1, tales como MPDL3280A. La expresión de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor y en células tumorales se asoció con SG, SSP y TRG en pacientes con CPNM tratados con MPDL3280A. Por ejemplo, en base a estos resultados, se podría seleccionar un paciente para su tratamiento con un antagonista de unión al eje PD-L1 en base a la expresión de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor y/o células tumorales. En particular, se predice que los pacientes con una clasificación IHQ CT3 o una CI3 responden al tratamiento con un antagonista de unión al eje PD-L1.

**Ejemplo 3: Los tumores caracterizados por células inmunitarias infiltrantes de tumor positivo para PD-L1 y los tumores caracterizados por células tumorales positivas para PD-L1 representan subpoblaciones biológicamente distintas de CPNM**

Para comprender cómo la expresión de PD-L1 tanto en células inmunitarias infiltrantes de tumor como en células tumorales era predictiva de la respuesta al tratamiento con antagonistas de unión al eje PD-L1, tales como el anticuerpo anti-PD-L1 MPDL3280A, se estudiaron las subpoblaciones CI3 y CT3 por análisis histopatológicos y de expresión génica.

La presencia de células inmunitarias infiltrantes de tumor fue necesaria, pero no suficiente, para reflejar la positividad para PD-L1 en los criterios de diagnóstico de IHQ en CI (figura 4). Se observó un infiltrado de células inmunitarias en pacientes en los que sus tumores se clasificaron como CT3 en base a la IHQ para PD-L1, aunque en menor grado en comparación con los tumores que se clasificaron como CI3 en base a la IHQ para PD-L1 (figura 5A). El infiltrado de células inmunitarias presente en los pacientes con CT3, aunque presente, fue, en gran medida, negativo para PD-L1 (figura 5A). La subpoblación CT3 se pudo dividir además en poblaciones que mostraron altos niveles de niveles de expresión de ARNm de CD68 o bajos niveles de niveles de expresión de ARNm de CD68 (figura 5B). La expresión de ARNm de CD8 se incrementó en las muestras de tumor tanto con CT3 como con CI3 en comparación con las muestras de tumor negativo para PD-L1 (figura 5C).

Las muestras de tumor de CPNM con una clasificación IHQ CT3 mostraron distintos rasgos característicos histopatológicos en comparación con las muestras de tumor con una clasificación IHQ CI3 (figuras 6A-6B). Las muestras de tumor se analizaron usando tinción con hematoxilina y eosina (H y E). Los tumores con CT3 presentaron un microentorno tumoral desmoplásico y esclerótico con pocas células inmunitarias infiltrantes de tumor intraepiteliales y estromales, mientras que los tumores con CI3 demostraron una alta frecuencia de infiltrados de células inmunitarias dentro del tumor, estroma e interfase tumor/estroma, con de mínima a ninguna reacción esclerótica (figuras 6A-6B). Cuando estuvieron presentes, los infiltrados de células inmunitarias se localizaron principalmente en el estroma circundante. De acuerdo con la histopatología, los tumores con CT3 mostraron un nivel de expresión incrementado de genes de colágeno (COL6A1 y COL6A2) en comparación con los tumores negativos para PD-L1 y tumores con CI3 (figuras 7 18A y 18B). Los tumores que eran CT0 y CI0 (aproximadamente un 35 % de las muestras de CPNM) mostraron de poca a ninguna evidencia de infiltración o activación de células inmunitarias, lo que es consecuente con la ignorancia inmunológica.

Se realizó un análisis de expresión génica usando un panel inmunológico de NanoString personalizado que comprendía 798 genes inmunomedidos anotados de forma personalizada para determinar los patrones de expresión de firmas inmunológicas en muestras de tumor de CPNM en los subtipos CI y CT (figura 8). Las muestras de tumor de CPNM con una clasificación IHQ CI3 tenían niveles de expresión de ARNm incrementados de CD8 y CXCL9 (figuras 9A-9B). Las muestras de tumor de CPNM con una clasificación IHQ CI3 también tenían expresión incrementada de firmas génicas en linfocitos B (figura 12A), así como firmas génicas en linfocitos citolíticos naturales (NK) (figura 12B). Las firmas génicas en linfocitos B incluyeron los genes CD19, MS4A1 y CD79A. Las firmas génicas en linfocitos NK incluyeron KLRB1, KLRC1, KLRC2, KLRC3, KLRD1, KLRF1, KLRG1, KLRK1, NCAM1, PRF1, NCR1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DS2, KIR3DL1, FCGR3A, MICA y MICB. Por lo tanto, las muestras de tumor con CI3 se caracterizan por un nivel de expresión incrementado de un conjunto de biomarcadores que incluye CD8, CXCL9, genes de linfocitos B y genes de linfocitos NK.

Las muestras de tumor de CPNM con una clasificación IHQ CT3 tenían niveles de expresión incrementados de STAT1 y MEK en comparación con los tumores negativos para PD-L1 y los tumores con CI3 (figuras 10A-10B). Se determinó que los niveles de expresión de JAK1 eran mayores en los tumores positivos para PD-L1 en comparación con tumores negativos para PD-L1 (figura 10C). Sin embargo, a pesar de la señalización por STAT activa, algunas líneas de células tumorales no regulan por incremento PD-L1 en respuesta al interferón gamma (IFN $\gamma$ ) (figura 10D). Por lo tanto, las muestras de tumor de CPNM con CT3 se caracterizan por un nivel de expresión incrementado de STAT, MEK y JAK1.

Las muestras de tumor de CPNM con una puntuación IHQ CT3 tenían niveles de expresión significativamente incrementados de PD-L1 en comparación con las muestras de tumor con CI3 y muestras de tumor con CT0 y CI0 como se evalúa por secuenciación de ARN (figura 17A). La expresión de PD-L2 fue consecuente entre las poblaciones de muestras de tumor con CT3 y CI3 como se evalúa por secuenciación de ARN (figura 17B).

El análisis de NanoString también mostró que las muestras de tumor positivo para PD-L1 (incluyendo CT3 y CI3) tenían niveles de expresión elevados de genes en la firma génica en  $T_{eff}$ , que incluían *CD8A*, *GZMA*, *GZMB*, *IFNG*, *EOMES*, *PRF1*, *CXCL9*, *CXCL10* y *TBX21*, en comparación con muestras de tumor negativo para PD-L1 (figura 13A).

La secuenciación de ARN mostró que los tumores con CI3, en particular, se caracterizaron por una alta expresión de marcadores de firmas en  $T_{eff}$  (figura 13D). La secuenciación de ARN confirmó que los tumores con CI3 tenían expresión incrementada de *IFNG*, *GZMB* y *CXCL9* (figuras 13E-13F). Sin estar ligados a la teoría, estos resultados sugirieron que la expresión de PD-L1 en CI se regula por mecanismo(s) mediado(s) por interferón gamma (IFNG) adaptativo, lo que refleja una inmunidad preexistente. También se determinó el nivel de expresión de la firma génica en MDSC (que incluyó *ITGAM*, *CD33*, *ARG1*, *NOS1*, *CD68*, *CD163*, *LAIR1* e *IL34*) (figura 13B). También se determinó el nivel de expresión de la firma génica en Th2 (que incluyó *IL13*, *IL4*, *GATA3*, *IL5*, *CXCR4*, *CCR3* y *CCR4*) (figura 13C).

En base a estos datos, el CPNM se puede clasificar en distintos subconjuntos moleculares e histopatológicos que definen la sensibilidad al tratamiento con el tratamiento dirigido a PD-L1. Aunque la expresión de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor y/o células inmunitarias puede conferir sensibilidad a MPDL3280A, el contexto inmunológico y la respuesta al tratamiento pueden diferir.

**Ejemplo 4: Biomarcadores sustitutos para predecir la respuesta de los pacientes con CPNM a los antagonistas de unión al eje PD-L1**

Se evaluaron biomarcadores farmacodinámicos y predictivos circulantes en cuanto al tratamiento con antagonistas de unión al eje PD-L1 (por ejemplo, anticuerpos anti-PD-L1, tales como MPDL3280A).

Los marcadores asociados a interferón gamma (IFNy) interleucina 18 e ITAC mostraron niveles de expresión incrementados después del tratamiento de pacientes con CPNM con MPDL3280A (figuras 14A-14B). Por lo tanto, estas proteínas representan biomarcadores farmacodinámicos en cuanto a la respuesta a los antagonistas de unión al eje PD-L1.

Se usó el panel inmunológico de NanoString que comprende 798 genes inmunomedidos anotados de forma personalizada para evaluar si los niveles de expresión de biomarcadores en leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) se asociaban con el tratamiento con antagonistas de unión al eje PD-L1 (por ejemplo, anticuerpos anti-PD-L1, tales como MPDL3280A). La población de pacientes para este estudio incluyó pacientes con CPNM, así como pacientes de cáncer de vejiga urotelial (CVU), melanoma, cáncer de mama y carcinoma de células renales (CCR) que se trataron con MPDL3280A. Se evaluó la asociación entre la expresión de ARNm de PD-L1 y PD-1 de referencia en PBMC con respuesta al tratamiento con MPDL3280A en pacientes con CPNM (figuras 15A-15C). Los niveles de expresión de ARNm de referencia de firmas génicas en linfocitos NK (figura 16A) y células mielógenas (figura 16B) en PBMC se asociaron con la respuesta de los pacientes con CPNM al tratamiento con MPDL3280A. La firma génica en linfocitos NK incluyó los genes *KLRB1*, *KLRC1*, *KLRC2*, *KLRC3*, *KLRD1*, *KLRF1*, *KLRG1*, *KLRK1*, *NCAM1*, *PRF1*, *NCR1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DS2*, *KIR3DL1*, *FCGR3A*, *MICA* y *MICB*. Las firmas génicas en células mielógenas incluyeron los genes *IL1B*, *IL8* y *CCL2*. Los niveles de expresión incrementados de firmas génicas en células mielógenas inmunodepresoras se asociaron con la progresión, mientras que los niveles de expresión incrementados de linfocitos NK citotóxicos se asociaron con la respuesta a MPDL3280A.

Por lo tanto, los genes en la firma génica en linfocitos NK representan biomarcadores predictivos de la respuesta de los pacientes con CPNM al tratamiento con un antagonista de unión al eje PD-L1, con un nivel de expresión incrementado que indica una probabilidad incrementada de respuesta al tratamiento. Los genes en la firma génica en células mielógenas representan biomarcadores predictivos de la respuesta de los pacientes con CPNM al tratamiento con un antagonista de unión al eje PD-L1, con un nivel de expresión incrementado que indica una probabilidad disminuida de respuesta al tratamiento.

## **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Genentech, Inc.  
F. Hoffmann-La Roche AG

5 <120> PROCEDIMIENTOS TERAPÉUTICOS Y DE DIAGNÓSTICO PARA EL CÁNCER

<130> 50474-111WO3

10 <150> US 62/168.700  
<151> 29-05-2015

<150> US 62/160.561  
<151> 12-05-2015

15

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1

<211> 440

<212> PRT

### <213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 1

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

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

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

Ala Val Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
53 54 55 56 57 58 59 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93.

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Glu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
100 105 110

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

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp  
130 135 140

## ES 2 835 866 T5

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr  
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr  
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys  
180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp  
195 200 205

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
210 215 220

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
245 250 255

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val  
260 265 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Gln  
275 280 285

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly  
305 310 315 320

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr  
340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
355 360 365

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
370 375 380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

ES 2 835 866 T5

385                   390                   395                   400

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe  
 405                   410                   415

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 420                   425                   430

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 435                   440

<210> 2

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 2

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
 20                   25                   30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg  
 85                   90                   95

Thr Phe Gly Gin Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100                   105                   110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115                   120                   125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130                   135                   140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145                   150                   155                   160

ES 2 835 866 T5

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 3

<211> 118

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10 <400> 3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser  
20 25 30

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

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala  
115

15 <210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

ES 2 835 866 T5

<223> Polipéptido sintético

<400> 4

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
100 105

5

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (6) . . (6)

<223> Xaa es Asp o Gly

20 <400> 5

Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Ser Trp Ile His  
1 5 10

<210> 6

25 <211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Polipéptido sintético

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (4) . . (4)

35 <223> Xaa es Ser o Leu

<220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (10) .. (10)  
 <223> Xaa es Thr o Ser

5 <400> 6

Ala Trp Ile Xaa Pro Tyr Gly Gly Ser Xaa Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 1                   5                   10                   15

Lys Gly

10 <210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 7

Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr  
 1                   5

20

<210> 8

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 8

30

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
 20                   25

35 <210> 9

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

40

<400> 9

Trp Val Arg Gin Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 1                   5                   10

45 <210> 10

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 10

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln  
 1               5               10               15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
20 25 30

- 5 <210> 11  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Polipéptido sintético

<400> 11

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
1 S 10

15 <210> 12  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Polipéptido sintético

25 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (5)..(5)  
<223> Xaa es Asp o Val

30 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (6)..(6)  
<223> Xaa es Val o Ile

35 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (7)..(7)  
<223> Xaa es Ser o Asn

40 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (9)..(9)  
<223> Xaa es Ala o Phe

45 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (10)..(10)  
<223> Xaa es Val o Leu

50 <400> 12

Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Ala  
1 S 10

55 <210> 13  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

5    <220>  
     <221> MOD\_RES  
     <222> (4)..(4)  
     <223> Xaa es Phe o Thr

10   <220>  
     <221> MOD\_RES  
     <222> (6)..(6)  
     <223> Xaa es Tyr o Ala

15   <400> 13

Ser Ala Ser Xaa Ileu Xaa Ser  
                       1                      5

20   <210> 14  
     <211> 9  
     <212> PRT  
     <213> Secuencia artificial

25   <220>  
     <223> Polipéptido sintético

30   <220>  
     <221> MOD\_RES  
     <222> (3)..(3)  
     <223> Xaa es Tyr, Gly, Phe o Ser

35   <220>  
     <221> MOD\_RES  
     <222> (4)..(4)  
     <223> Xaa es Leu, Tyr, Phe o Trp

40   <220>  
     <221> MOD\_RES  
     <222> (5)..(5)  
     <223> Xaa es Tyr, Asn, Ala, Thr, Gly, Phe o Ile

45   <220>  
     <221> MOD\_RES  
     <222> (6)..(6)  
     <223> Xaa es His, Val, Pro, Thr o Ile

50   <220>  
     <221> MOD\_RES  
     <222> (8)..(8)  
     <223> Xaa es Ala, Trp, Arg, Pro o Thr

55   <400> 14

Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr  
                       1                      5

60   <210> 15  
     <211> 23  
     <212> PRT  
     <213> Secuencia artificial

65   <220>  
     <223> Polipéptido sintético

ES 2 835 866 T5

<400> 15

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
20

5 <210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 16

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
1 5 10 15

15

<210> 17

<211> 32

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

25 <400> 17

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
20 25 30

30 <210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 18

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
1 5 10

40

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 19

50

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His  
 1               5                           10

<210> 20

<211> 18

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 20

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 1               5                           10                           15

Lys Gly

15 <210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 21

Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr  
 1               5

25

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

35 <400> 22

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala  
 1               5                           10

40 <210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Polipéptido sintético

<400> 23

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser  
 1               5

50

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 835 866 T5

<220>

<223> Polipéptido sintético

5 <400> 24

Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr  
1 5

<210> 25

10 <211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Polipéptido sintético

<400> 25

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser  
20 25 30

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

20

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 26

<211> 122

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

30 <400> 26

ES 2 835 866 T5

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser  
 20                   25                   30

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

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50                   55                   60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65                   70                   75                   80

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

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100                   105                   110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 115                   120

<210> 27

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 27

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 1                   5                   10

15

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 28

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 1                   5                   10

25

<210> 29

<211> 30

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

ES 2 835 866 T5

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 29

5

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
20 25 30

<210> 30

<211> 14

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

15

<400> 30

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala  
1 5 10

20 <210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 31

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
1 5 10 15

30

<210> 32

<211> 447

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

40 <400> 32

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser  
20 25 30

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

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

## ES 2 835 866 T5

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

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

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 185 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270

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

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

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320

ES 2 835 866 T5

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335

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

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
385 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 370                   375                   380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
385 390 395 400

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
435 440 445

5 <210> 33  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Polipéptido sintético  
<400> 33

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Ieu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ieu Tyr His Pro Ala  
 15 85 90 95

ES 2 835 866 T5

Thr Phe Gly Gin Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gin Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gin Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gin Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

## REIVINDICACIONES

- 5        1. Un antagonista de unión a PD-L1 para su uso en el tratamiento de un paciente que padece un carcinoma de pulmón no microcítico, en el que se ha determinado que una muestra de tumor obtenida del paciente tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en un 50 % o más de las células tumorales en la muestra de tumor, en el que el antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo, en el que el anticuerpo es atezolizumab, y en el que el nivel de expresión de PD-L1 es un nivel de expresión de proteínas.
- 10      2. El antagonista de unión a PD-L1 para su uso de la reivindicación 1, en el que la muestra de tumor obtenida del paciente tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprenden menos de un 10 % de la muestra.
- 15      3. El antagonista de unión a PD-L1 para su uso de la reivindicación 1 o 2, en el que el antagonista de unión a PD-L1 se formula para su uso en combinación con un segundo agente terapéutico, opcionalmente en el que el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un agente citotóxico, un agente inhibidor del crecimiento, un agente radioterápico, un agente antiangiogénico y combinaciones de los mismos.
- 20      4. Un procedimiento para (i) determinar si es probable que un paciente que padece un carcinoma de pulmón no microcítico responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión a PD-L1 o (ii) predecir la reactividad de un paciente que padece un carcinoma de pulmón no microcítico al tratamiento que comprende un antagonista de unión a PD-L1, comprendiendo el procedimiento: determinar el nivel de expresión de PD-L1 en células tumorales en una muestra de tumor obtenida del paciente, en el que un nivel de expresión detectable de PD-L1 en un 50 % o más de las células tumorales en la muestra de tumor indica que es probable que el paciente responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión a PD-L1, en el que el antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo, en el que el anticuerpo es atezolizumab, y en el que el nivel de expresión de PD-L1 es un nivel de expresión de proteínas.
- 25      5. Un procedimiento para seleccionar un tratamiento para un paciente que padece un carcinoma de pulmón no microcítico, comprendiendo el procedimiento: determinar el nivel de expresión de PD-L1 en células tumorales en una muestra de tumor obtenida del paciente, y seleccionar un tratamiento que comprende un antagonista de unión a PD-L1 para el paciente en base a un nivel de expresión detectable de PD-L1 en un 50 % o más de las células tumorales en la muestra de tumor, en el que el antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo, en el que el anticuerpo es atezolizumab, y en el que el nivel de expresión de PD-L1 es un nivel de expresión de proteínas.
- 30      6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el procedimiento comprende además determinar el nivel de expresión de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor en la muestra de tumor obtenida del paciente, opcionalmente en el que la muestra de tumor obtenida del paciente tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprenden menos de un 10 % de la muestra.
- 35      7. El antagonista de unión a PD-L1 para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en el que:
- 40        (i) la muestra de tumor obtenida del paciente comprende una población de fibroblastos y/o miofibroblastos;
- 45        (ii) la muestra de tumor obtenida del paciente comprende un estroma deficiente en células y/o colagenizado; y/o
- 50        (iii) la muestra de tumor tiene un nivel de expresión incrementado de colágeno, STAT1 o MEK en relación con una muestra de tumor de referencia.
- 55      8. El antagonista de unión a PD-L1 para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 7, o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en el que el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a uno o más de sus compañeros de unión a ligando, opcionalmente en el que el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1, B7-1 o tanto a PD-1 como B7-1.
- 60      9. El antagonista de unión a PD-L1 para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, 7-8, o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 4-8, en el que el carcinoma de pulmón no microcítico es un carcinoma de pulmón no microcítico localmente avanzado o metastásico.
- 65      10. El antagonista de unión a PD-L1 para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 7-8, o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 4-9, en el que la muestra de tumor es una muestra de tumor fijada con formol e incluida en parafina (FFPE), una muestra de tumor de archivo, una muestra de tumor en fresco o una muestra de tumor congelada.
- 65      11. El antagonista de unión a PD-L1 para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 7-10, o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 4-10, en el que:

(i) el nivel de expresión de proteínas de PD-L1 se determina usando un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en inmunohistoquímica (IHQ), inmunofluorescencia, citometría de flujo e inmunolectrotransferencia; opcionalmente en el que el nivel de expresión de proteínas de PD-L1 se detecta usando un anticuerpo anti-PD-L1.

5

Figura 1A

Indicación	N	% de tumores con PD-L1 en CI (CI2/3, CI <sub>1</sub> >=5%)	% de tumores con PD-L1 en CT (CT2/3, CT>=5%)
CPNM	184	26	24
Vejiga	205	27	11
CCR	88	25	10
Melanoma	59	36	5
CCECC	101	22	12
Gástrico	141	18	5
Pancreático	54	12	4
CMTN	317	22	4
Próstata	29	0	3

Figuras 1B-1D

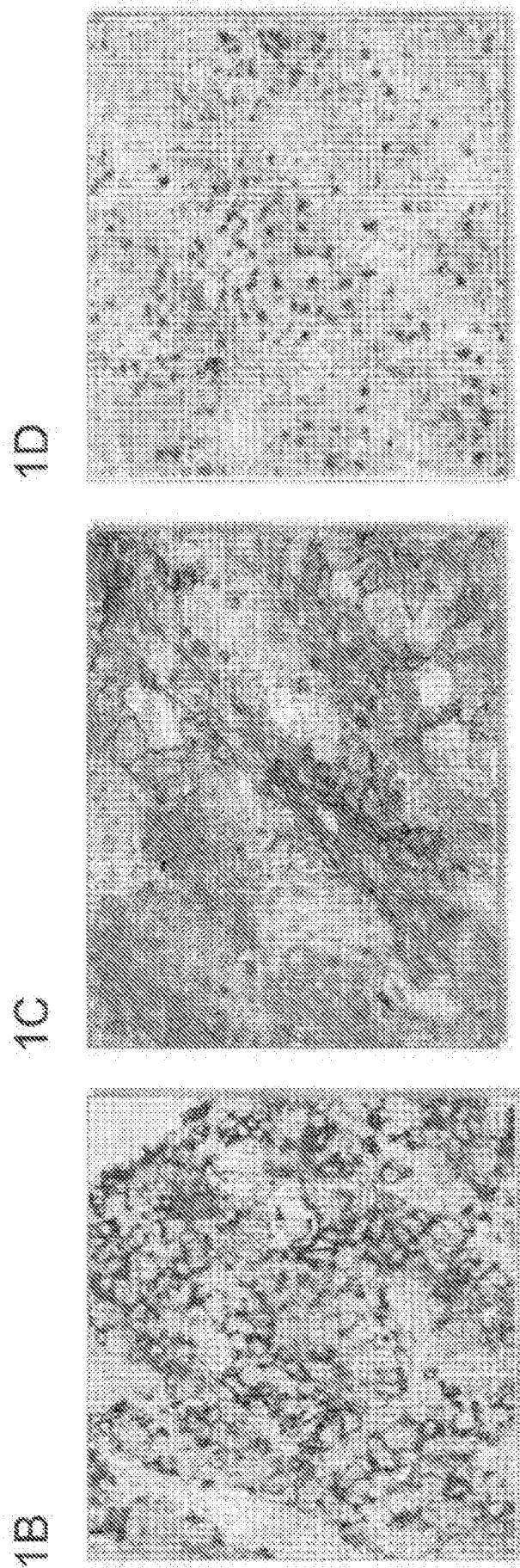


Figura 2A

Nº287 fase II	C10			C11			C12			C13			C14			C15			C16			C17			C18			C19			C20			C21			C22			C23			C24			C25			C26			C27			C28			C29			C30			C31			C32			C33			C34			C35			C36			C37			C38			C39			C40			C41			C42			C43			C44			C45			C46			C47			C48			C49			C50			C51			C52			C53			C54			C55			C56			C57			C58			C59			C60			C61			C62			C63			C64			C65			C66			C67			C68			C69			C70			C71			C72			C73			C74			C75			C76			C77			C78			C79			C80			C81			C82			C83			C84			C85			C86			C87			C88			C89			C90			C91			C92			C93			C94			C95			C96			C97			C98			C99			C100			C101			C102			C103			C104			C105			C106			C107			C108			C109			C110			C111			C112			C113			C114			C115			C116			C117			C118			C119			C120			C121			C122			C123			C124			C125			C126			C127			C128			C129			C130			C131			C132			C133			C134			C135			C136			C137			C138			C139			C140			C141			C142			C143			C144			C145			C146			C147			C148			C149			C150			C151			C152			C153			C154			C155			C156			C157			C158			C159			C160			C161			C162			C163			C164			C165			C166			C167			C168			C169			C170			C171			C172			C173			C174			C175			C176			C177			C178			C179			C180			C181			C182			C183			C184			C185			C186			C187			C188			C189			C190			C191			C192			C193			C194			C195			C196			C197			C198			C199			C200			C201			C202			C203			C204			C205			C206			C207			C208			C209			C210			C211			C212			C213			C214			C215			C216			C217			C218			C219			C220			C221			C222			C223			C224			C225			C226			C227			C228			C229			C230			C231			C232			C233			C234			C235			C236			C237			C238			C239			C240			C241			C242			C243			C244			C245			C246			C247			C248			C249			C250			C251			C252			C253			C254			C255			C256			C257			C258			C259			C260			C261			C262			C263			C264			C265			C266			C267			C268			C269			C270			C271			C272			C273			C274			C275			C276			C277			C278			C279			C280			C281			C282			C283			C284			C285			C286			C287			C288			C289			C290			C291			C292			C293			C294			C295			C296			C297			C298			C299			C300			C301			C302			C303			C304			C305			C306			C307			C308			C309			C310			C311			C312			C313			C314			C315			C316			C317			C318			C319			C320			C321			C322			C323			C324			C325			C326			C327			C328			C329			C330			C331			C332			C333			C334			C335			C336			C337			C338			C339			C340			C341			C342			C343			C344			C345			C346			C347			C348			C349			C350			C351			C352			C353			C354			C355			C356			C357			C358			C359			C360			C361			C362			C363			C364			C365			C366			C367			C368			C369			C370			C371			C372			C373			C374			C375			C376			C377			C378			C379			C380			C381			C382			C383			C384			C385			C386			C387			C388			C389			C390			C391			C392			C393			C394			C395			C396			C397			C398			C399			C400			C401			C402			C403			C404			C405			C406			C407			C408			C409			C410			C411			C412			C413			C414			C415			C416			C417			C418			C419			C420			C421			C422			C423			C424			C425			C426			C427			C428			C429			C430			C431			C432			C433			C434			C435			C436			C437			C438			C439			C440			C441			C442			C443			C444			C445			C446			C447			C448			C449			C450			C451			C452			C453			C454			C455			C456			C457			C458			C459			C460			C461			C462			C463			C464			C465			C466			C467			C468			C469			C470			C471			C472			C473			C474			C475			C476			C477			C478			C479			C480			C481			C482			C483			C484			C485			C486			C487			C488			C489			C490			C491			C492			C493			C494			C495			C496			C497			C498			C499			C500		
	C10			C11			C12			C13			C14			C15			C16			C17			C18			C19			C20			C21			C22			C23			C24			C25			C26			C27			C28			C29			C30			C31			C32			C33			C34			C35			C36			C37			C38			C39			C40			C41			C42			C43			C44			C45			C46			C47			C48			C49			C50			C51			C52			C53			C54			C55			C56			C57			C58			C59			C60			C61			C62			C63			C64			C65			C66			C67			C68			C69			C70			C71			C72			C73			C74			C75			C76			C77			C78			C79			C80			C81			C82			C83			C84			C85			C86			C87			C88			C89			C90			C91			C92			C93			C94			C95			C96			C97			C98			C99			C100			C101			C102			C103			C104			C105			C106			C107			C108			C109			C110			C111			C112			C113			C114			C115			C116			C117			C118			C119			C120			C121			C122			C123			C124			C125			C126			C127			C128			C129			C130			C131			C132			C133			C134			C135			C136			C137			C138			C139			C140			C141			C142			C143			C144			C145			C146			C147			C148			C149			C150			C151			C152			C153			C154			C155			C156			C157			C158			C159			C160			C161			C162			C163			C164			C165			C166			C167			C168			C169			C170			C171			C172			C173			C174			C175			C176			C177			C178			C179			C180			C181			C182			C183			C184			C185			C186			C187			C188			C189			C190			C191			C192			C193			C194			C195			C196			C197			C198			C199			C200			C201			C202			C203			C204			C205			C206			C207			C208			C209			C210			C211			C212			C213			C214			C215			C216			C217			C218			C219			C220			C221			C222			C223			C224			C225			C226			C227			C228			C229			C230			C231			C232			C233			C234			C235			C236			C237			C238			C239			C240			C241			C242			C243			C244			C245			C246			C247			C248			C249			C250			C251			C252			C253			C254			C255			C256			C257			C258			C259			C260			C261			C262			C263			C264			C265			C266			C267			C268			C269			C270			C271			C272			C273			C274			C275			C276			C277			C278			C279			C280			C281			C282			C283			C284			C285			C286			C287			C288			C289			C290			C291			C292			C293			C294			C295			C296			C297			C298			C299			C300			C301			C302			C303			C304			C305			C306			C307			C308			C309			C310			C311			C312			C313			C314			C315			C316			C317			C318			C319			C320			C321			C322			C323			C324			C325			C326			C327			C328			C329			C330			C331			C332			C333			C334			C335			C336			C337			C338			C339			C340			C341			C342			C343			C344			C345			C346			C347			C348			C349			C350			C351			C352			C353			C354			C355			C356			C357			C358			C359			C360			C361			C362			C363			C364			C365			C366			C367			C368			C369			C370			C371			C372			C373			C374			C375			C376			C377			C378			C379			C380			C381			C382			C383			C384			C385			C386			C387			C388			C389			C390			C391			C392			C393			C394			C395			C396			C397			C398			C399			C400			C401			C402			C403			C404			C405			C406			C407			C408			C409			C410			C411			C412			C413			C414			C415			C416			C417			C418			C419			C420			C421			C422			C423			C424			C425			C426			C427			C428			C429			C430			C431			C432			C433			C434			C435			C436			C437			C438			C439			C440			C441			C442			C443			C444			C445			C446			C447			C448			C449			C450			C451			C452			C453																																																																																																																																															
<th colspan="

Figura 2B

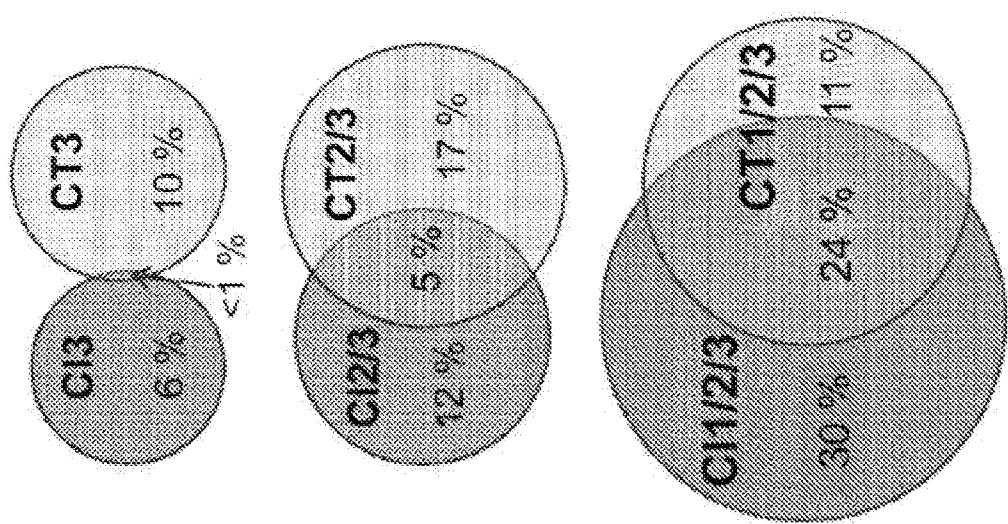


Figura 3A

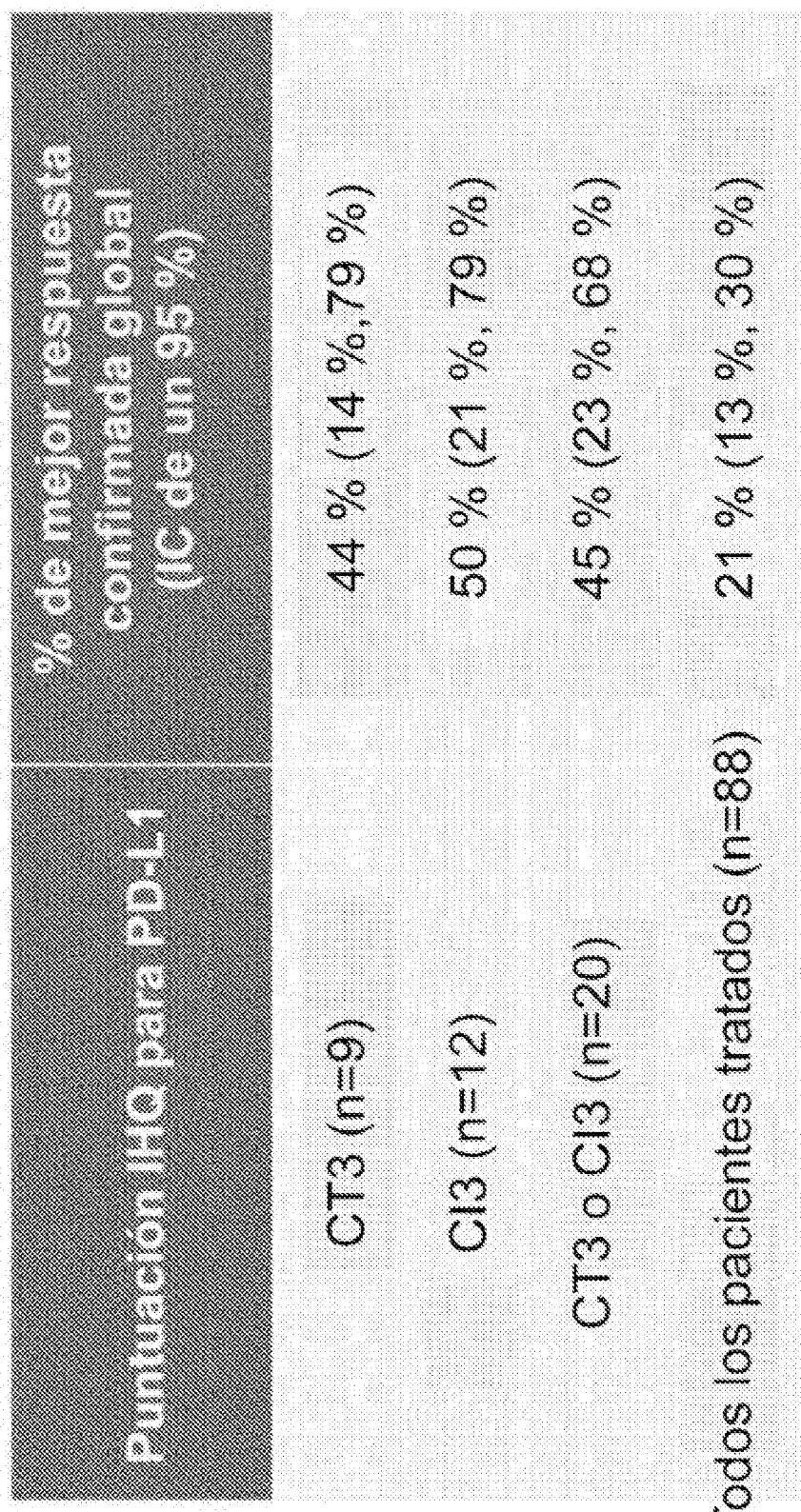


Figura 3B

	Cohorte 1 (IL)	Cohorte 2 (22L, sin mets. cerebrales)*	Cohorte 3 (22L, mets. cerebrales tratadas)
	TRG confirmada, % (IC de un 95 %)		
	n	n	n
Todas	31	29 (14-48)	92
CT3 o CI3	7	29 (4-71)	38
	DR, intervalo (meses)°		
Todas	9	2,3-9,0 (mediana: 3,0)	16
CT3 o CI3	2	2,8-4,2+	10
	SSP a los 6 meses, % (IC de un 95 %)		
Todas	31	43 (25-61)	93
CT3 o CI3	7	29 (0-62)	38

Figura 3C

	Cohorte 1 (n.)	Cohorte 2 (221, sin mets. cerebrales)*	Cohorte 3 (221, mets. cerebrales tratadas)
<b>TRG confirmada, % (IC de un 95 %)</b>			
Todas	31	26 (12-45)	92
CT3 o C13	7	29 (4-71)	38
<b>DR, intervalo (meses)*</b>			
Todas	8	2,3-8,4+	15
CT3 o C13	2	2,8-4,2+	9
<b>SSP a los 6 meses, % (IC de un 95 %)</b>			
Todas	31	34 (17-50)	93
CT3 o C13	7	29 (0-62)	38

Figura 3D

## Supervivencia global (SG)

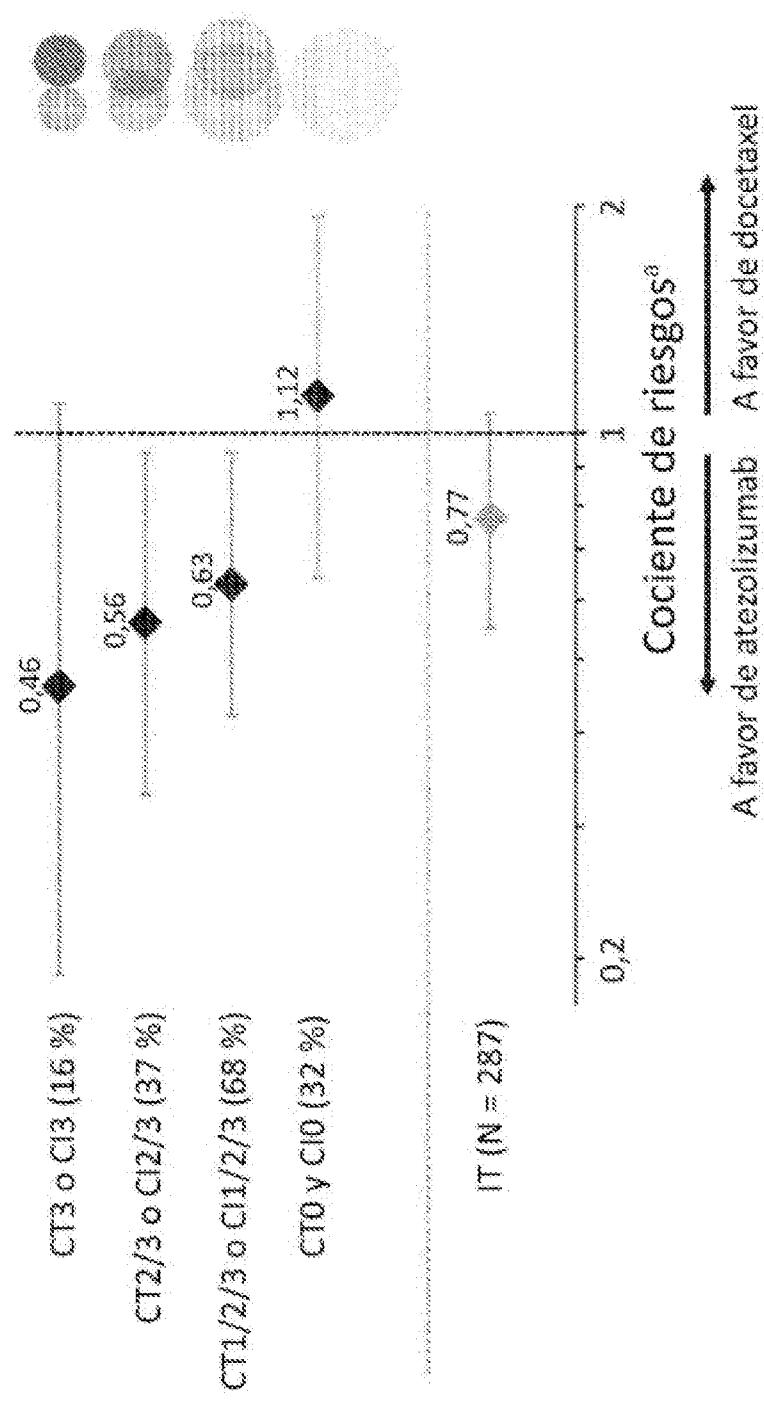


Figura 3E

## Supervivencia sin progresión (SSP)

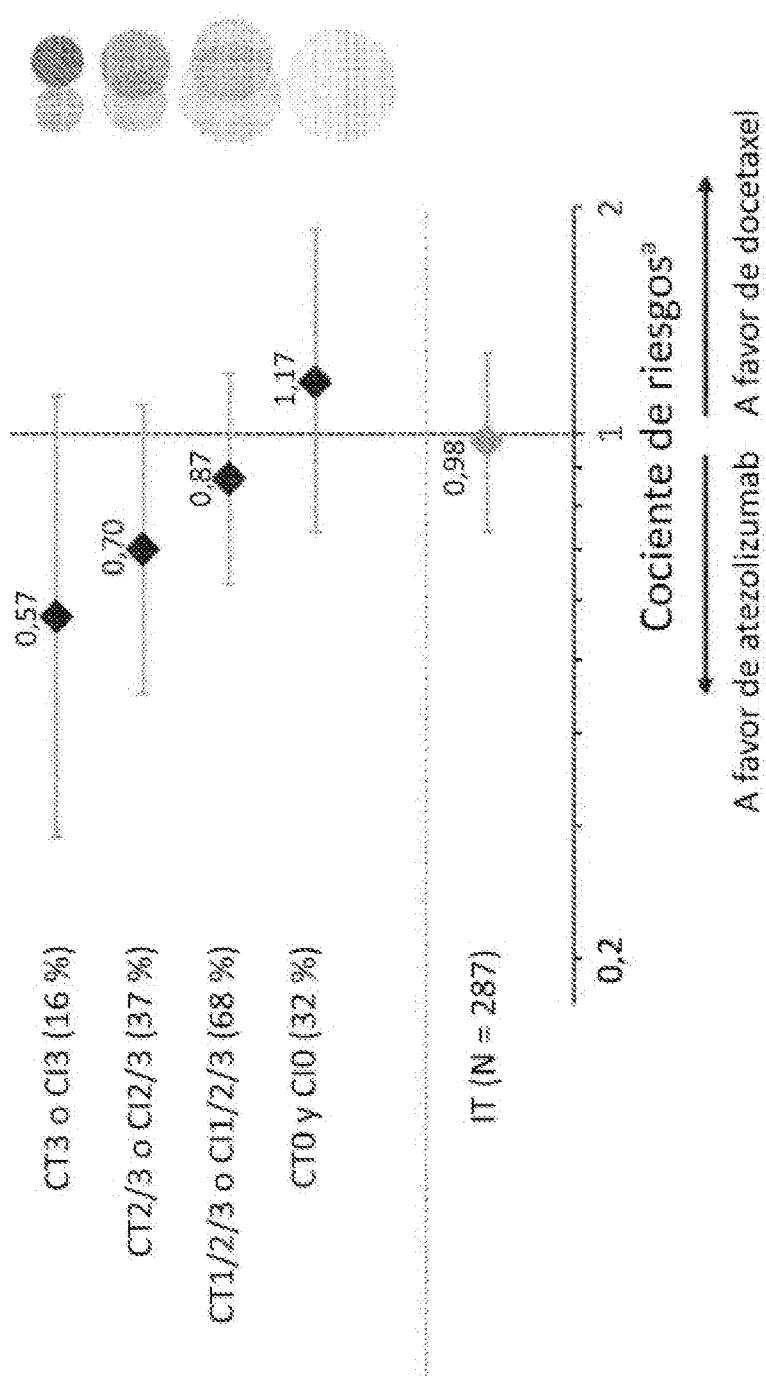


Figura 3F

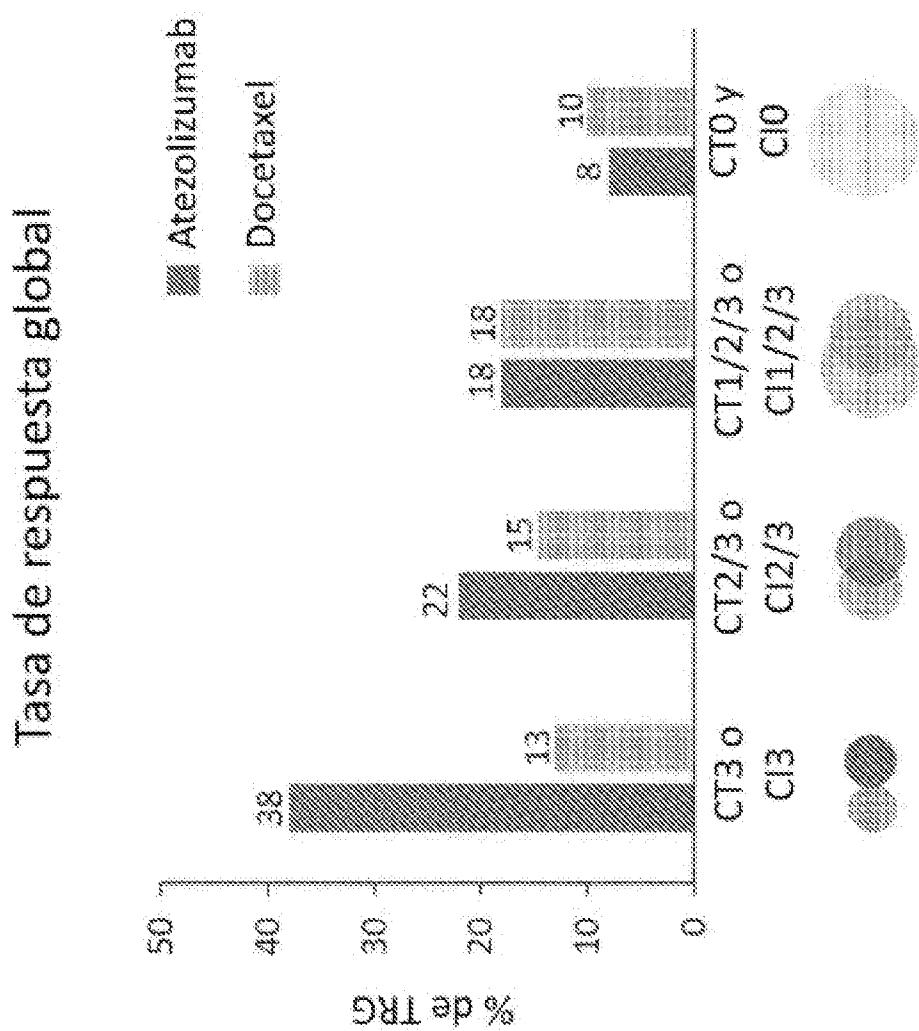


Figura 4

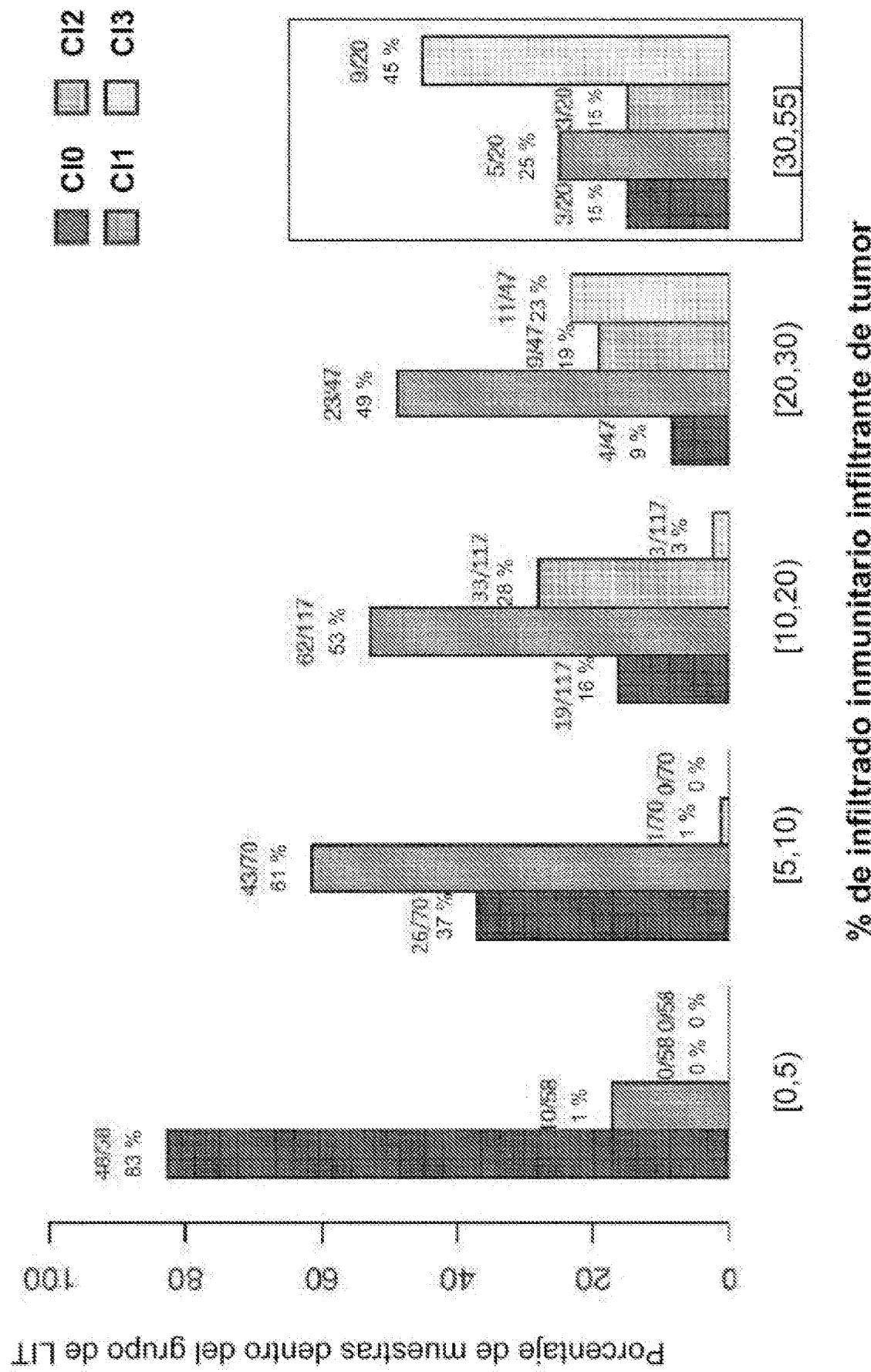


Figura 5A

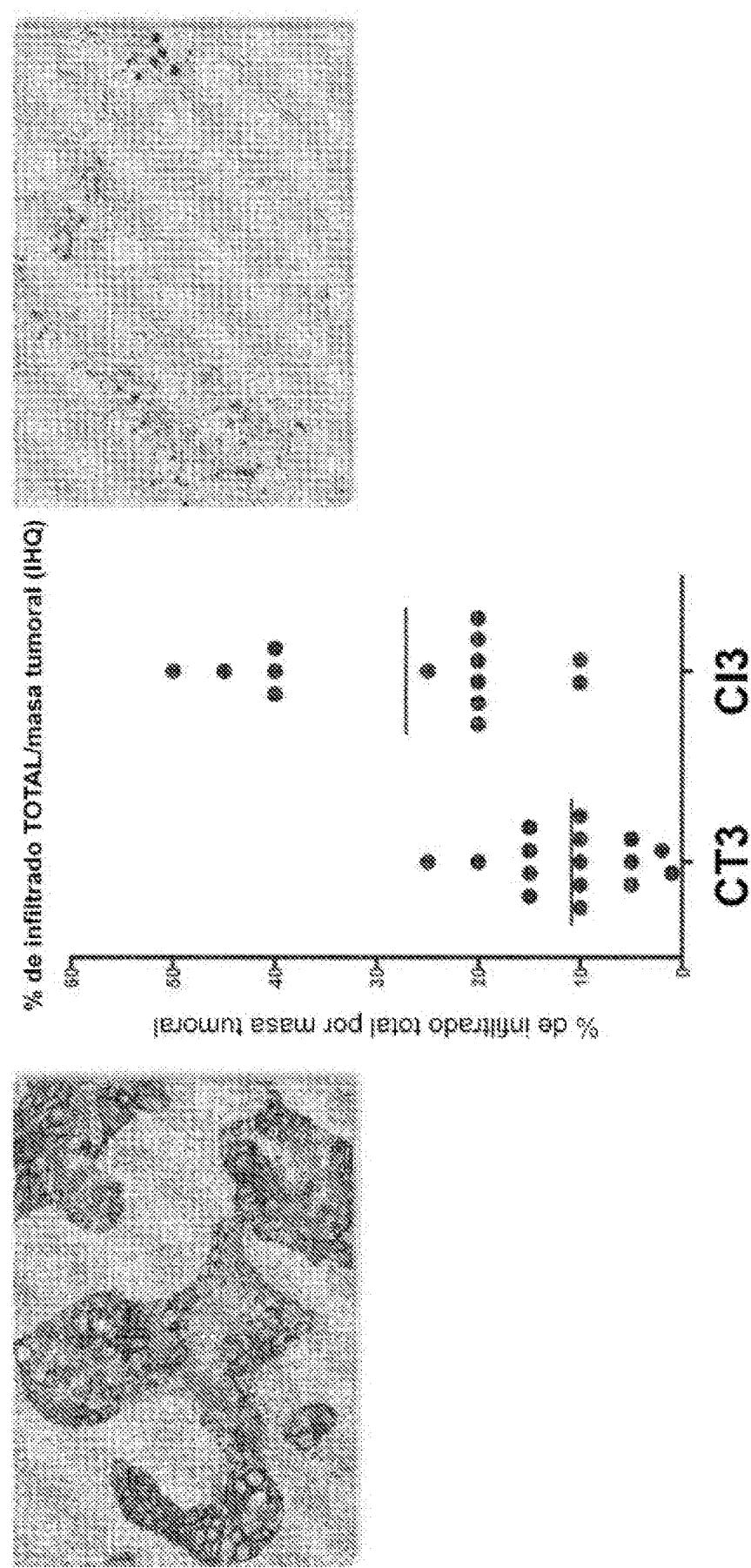


Figura 5B

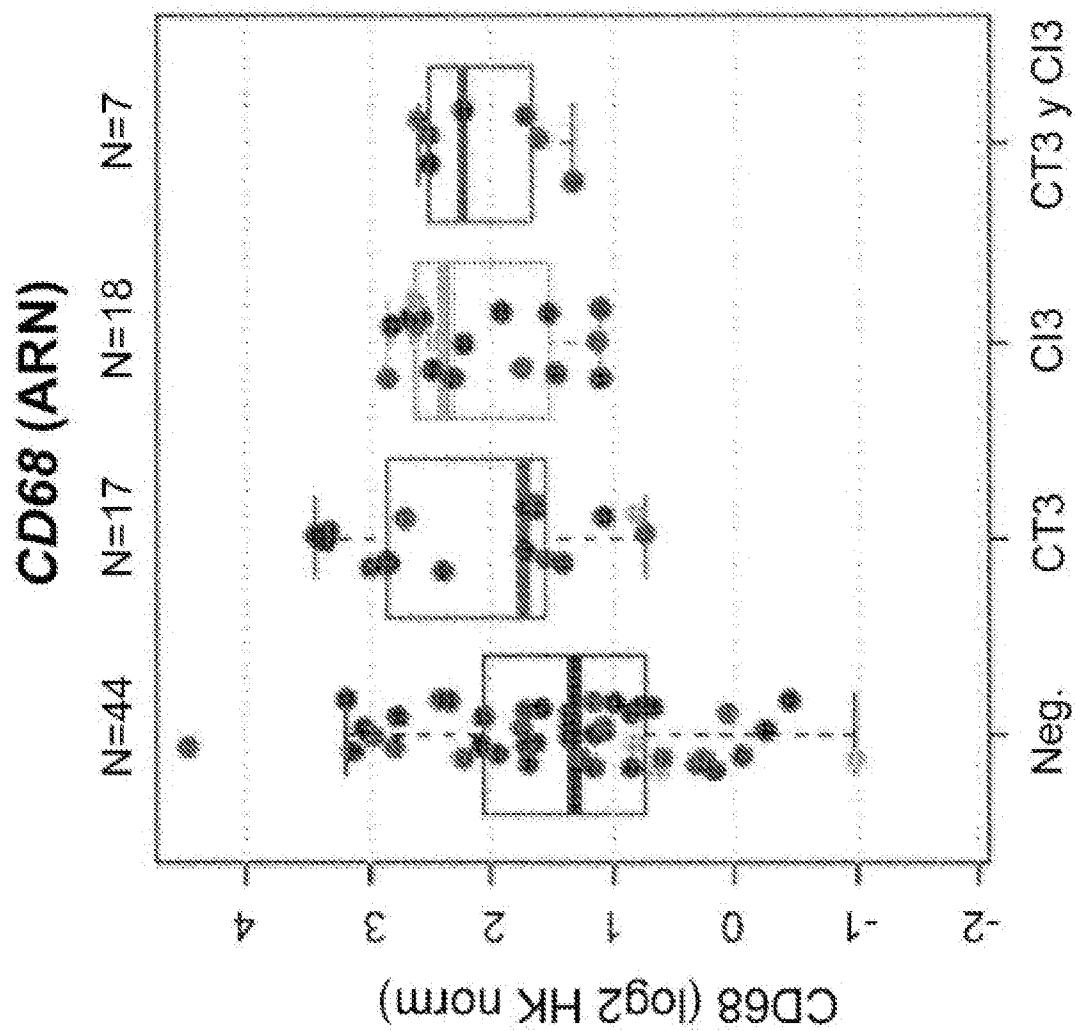


Figura 5C

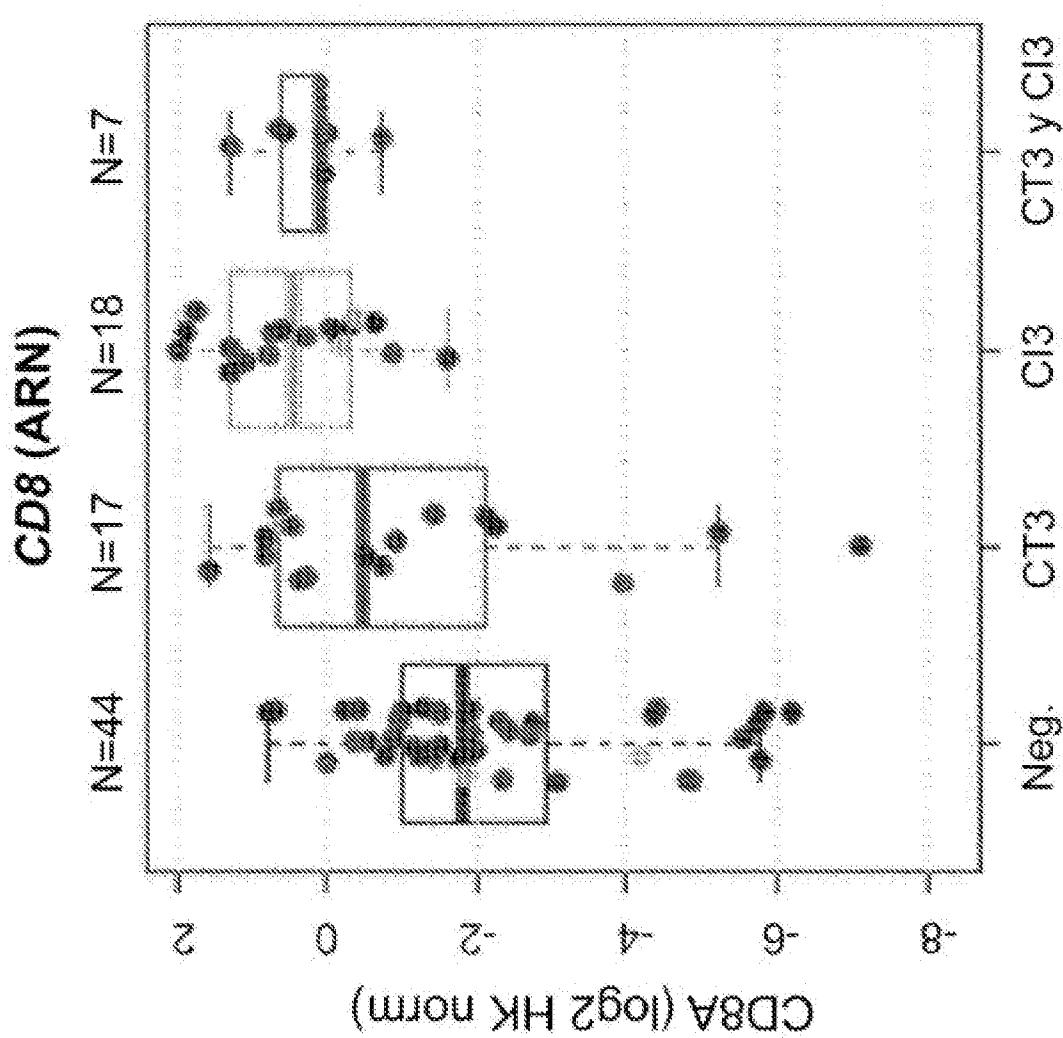


Figura 6A

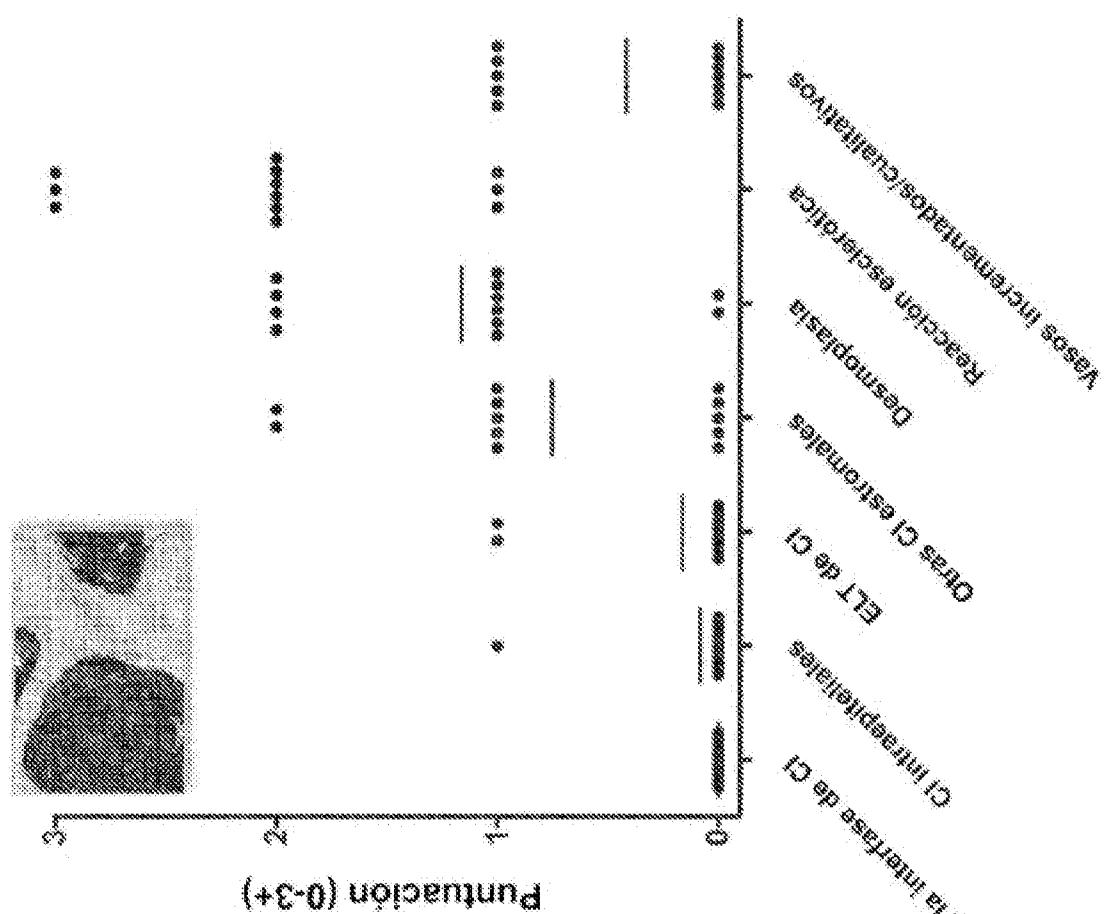


Figura 6B

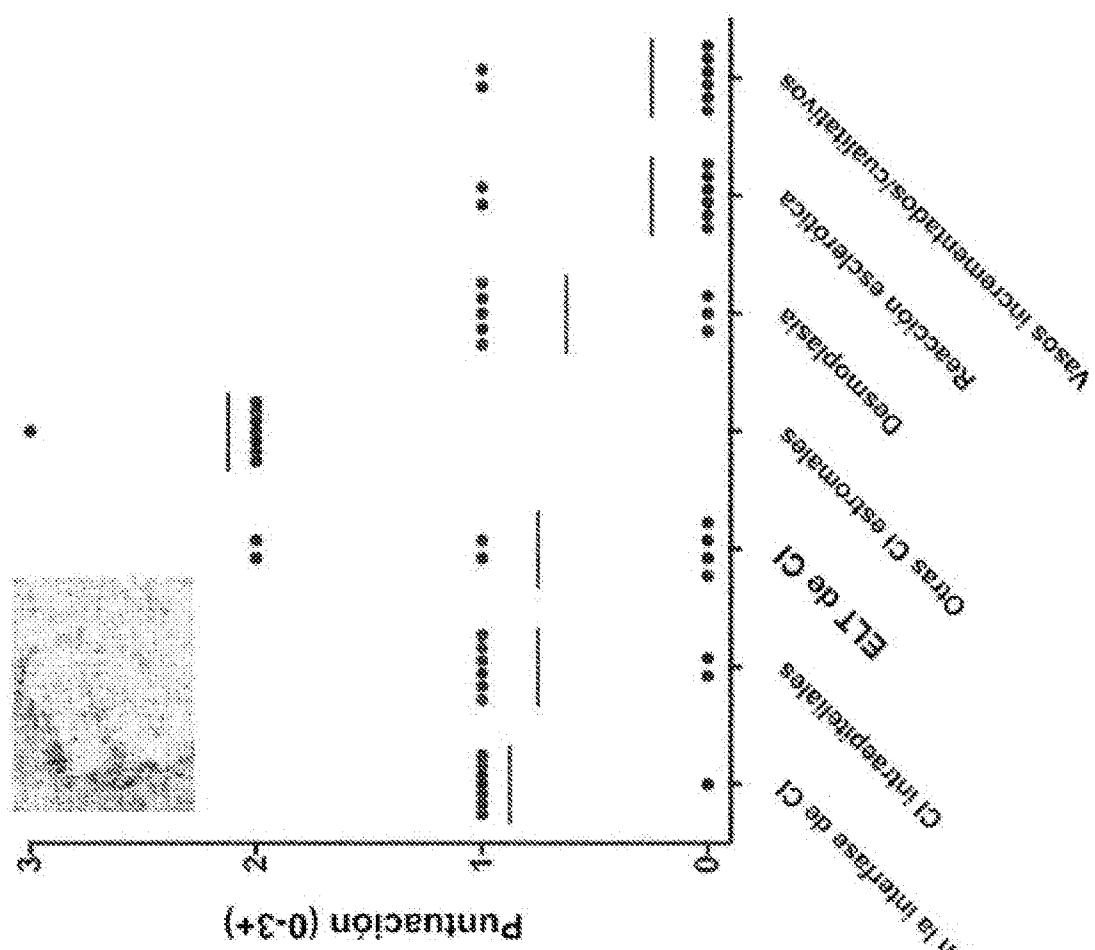
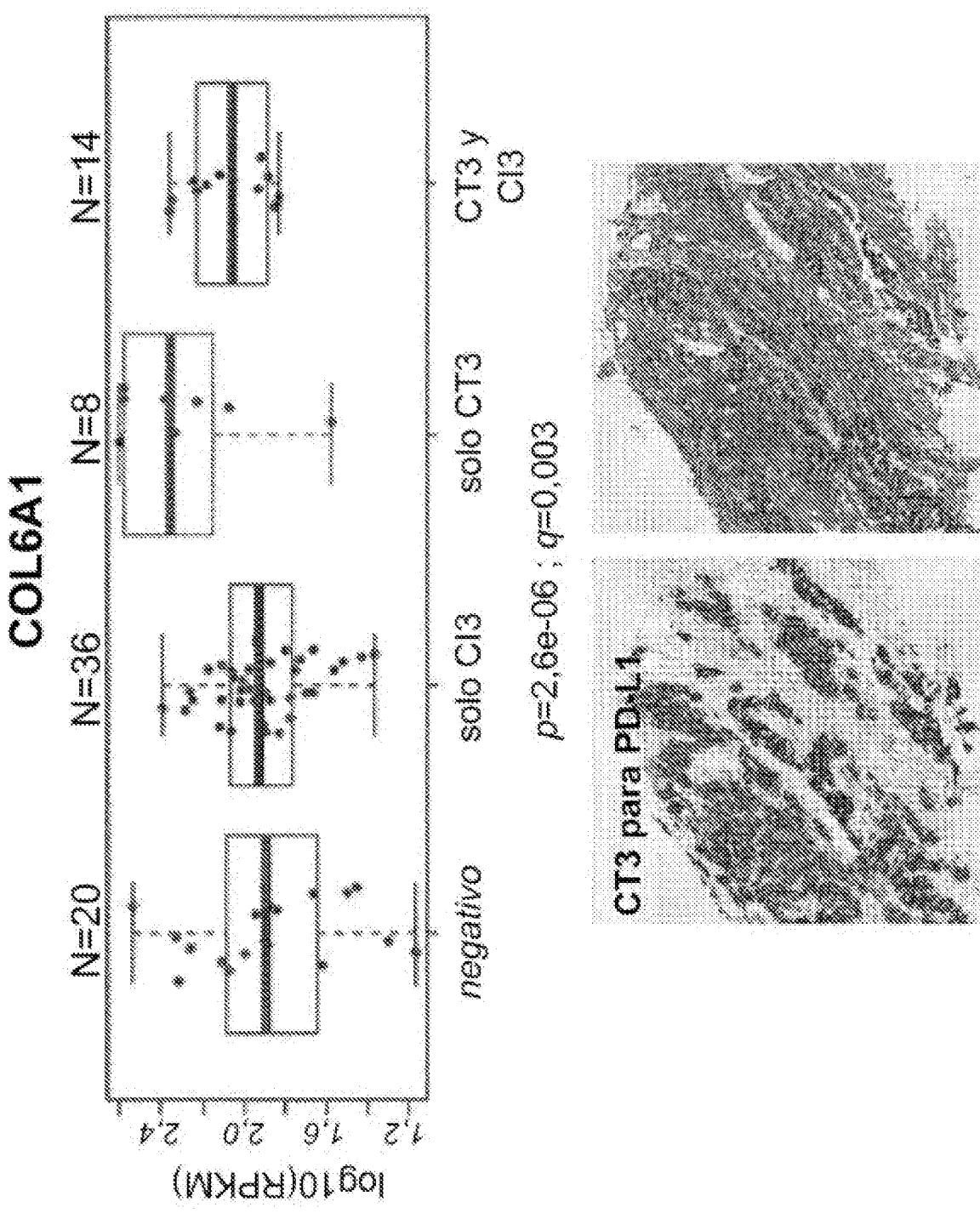
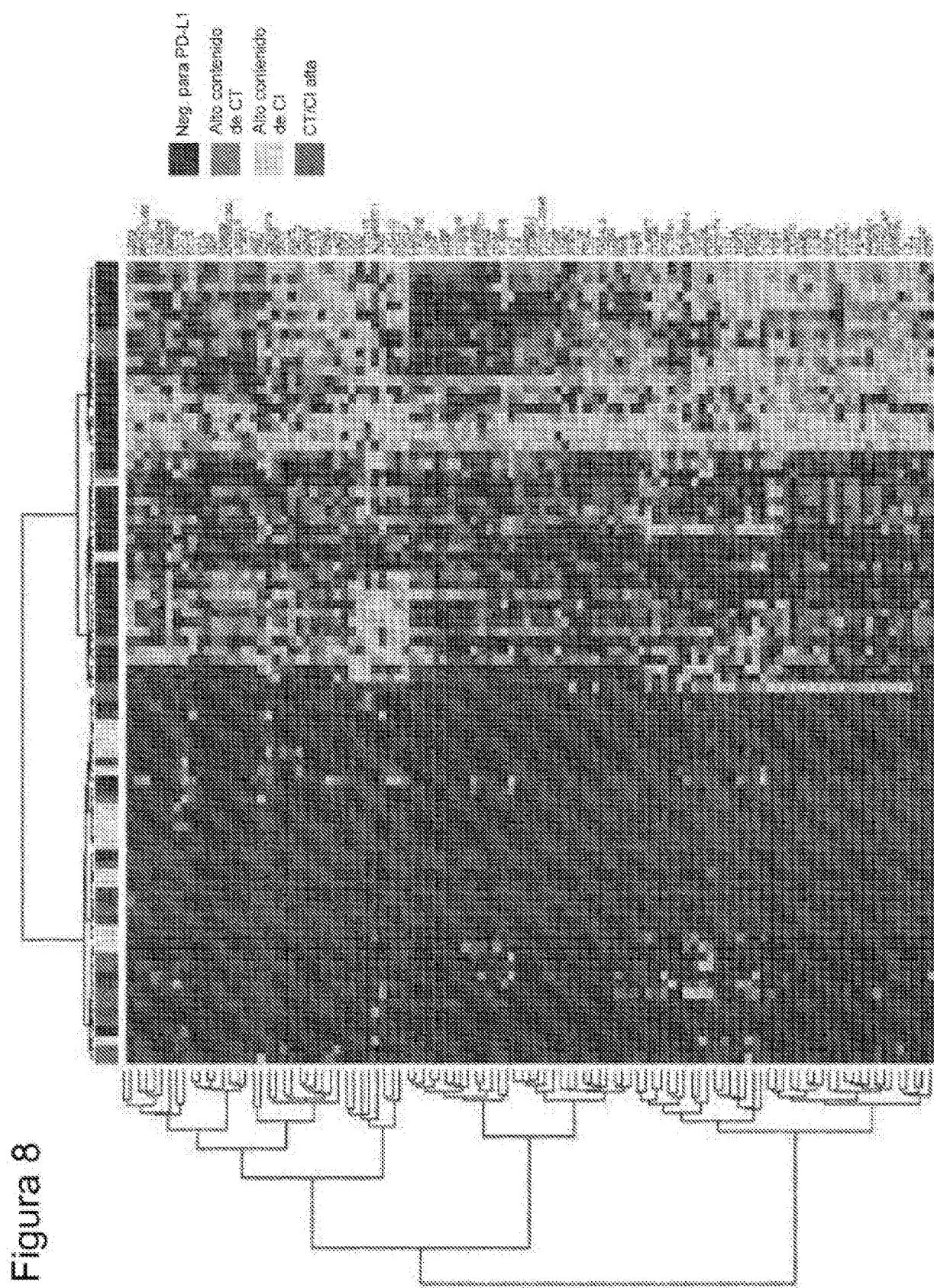
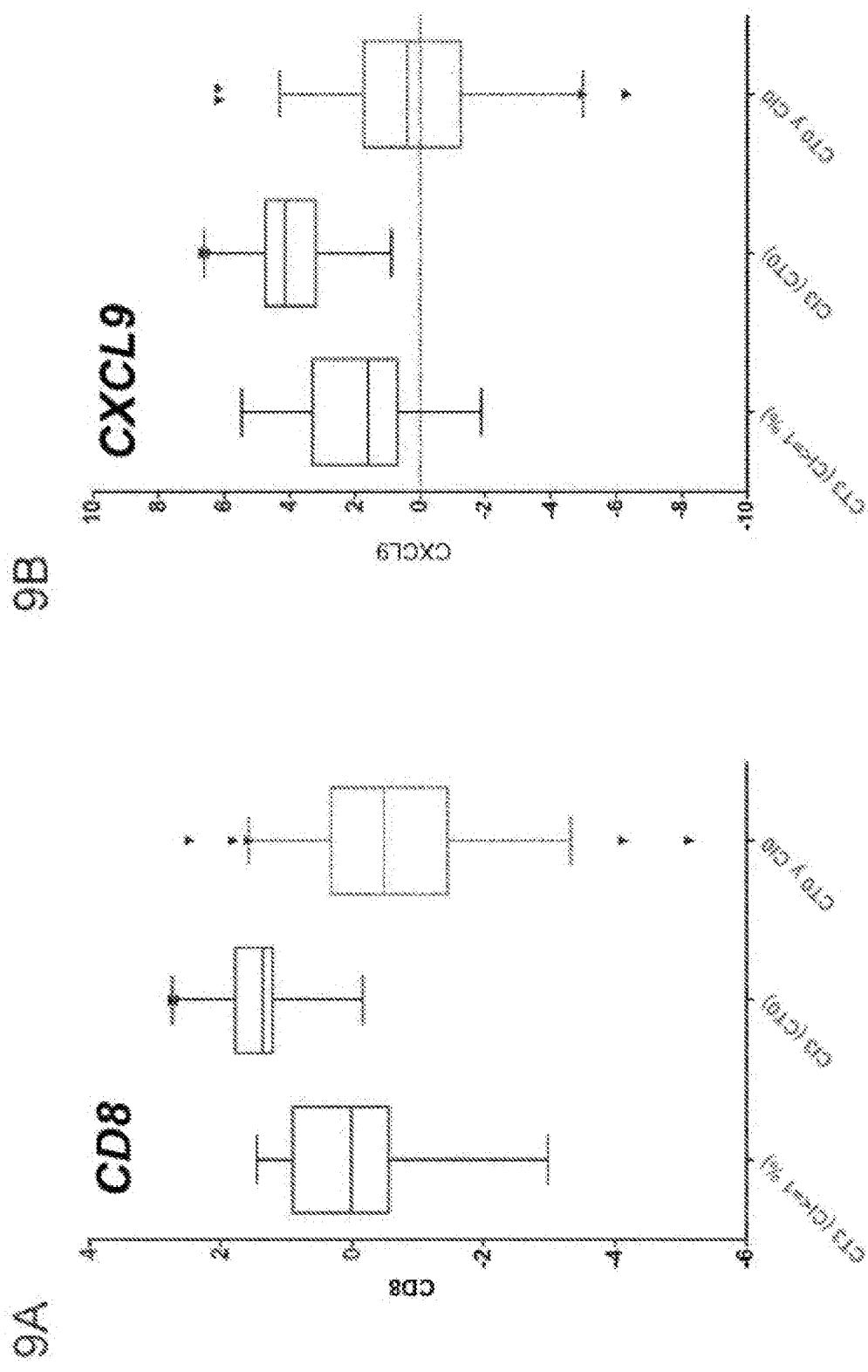


Figura 7





Figuras 9A-9B



Figuras 10A-10C

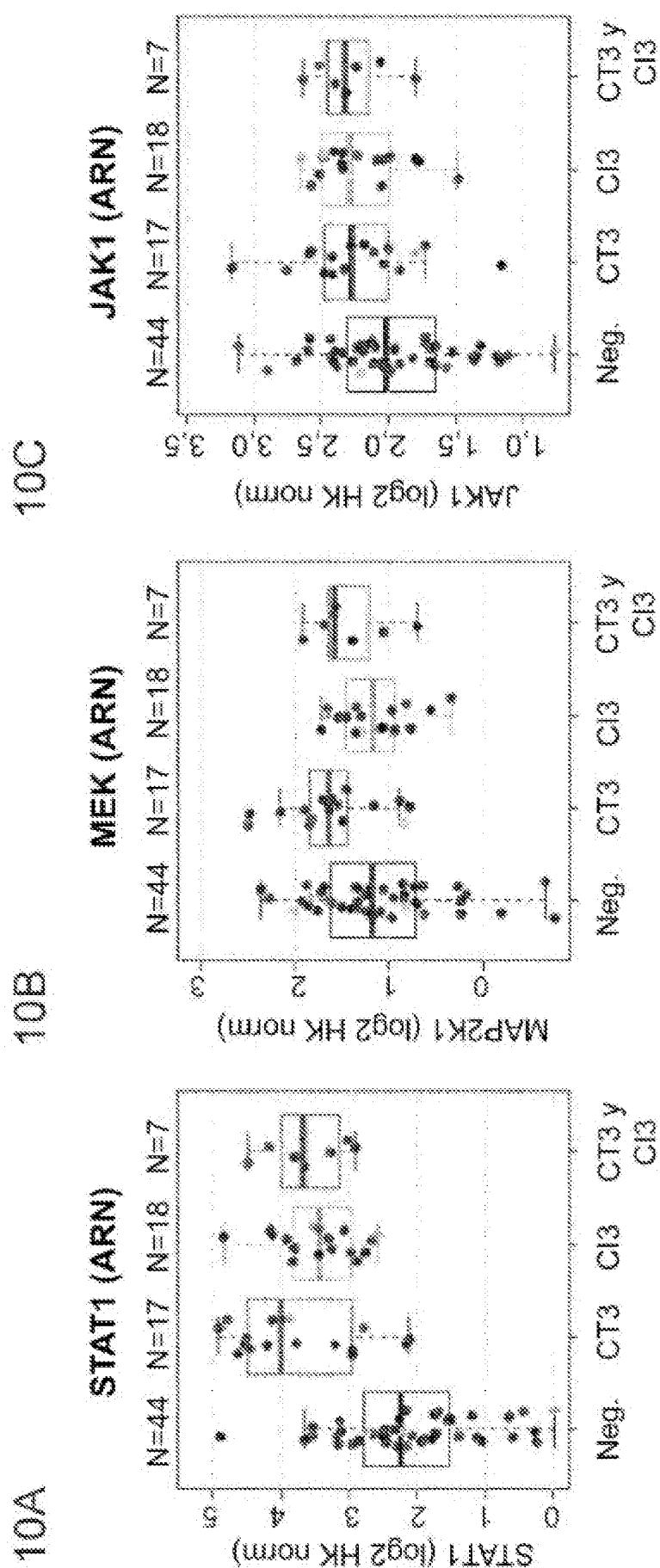
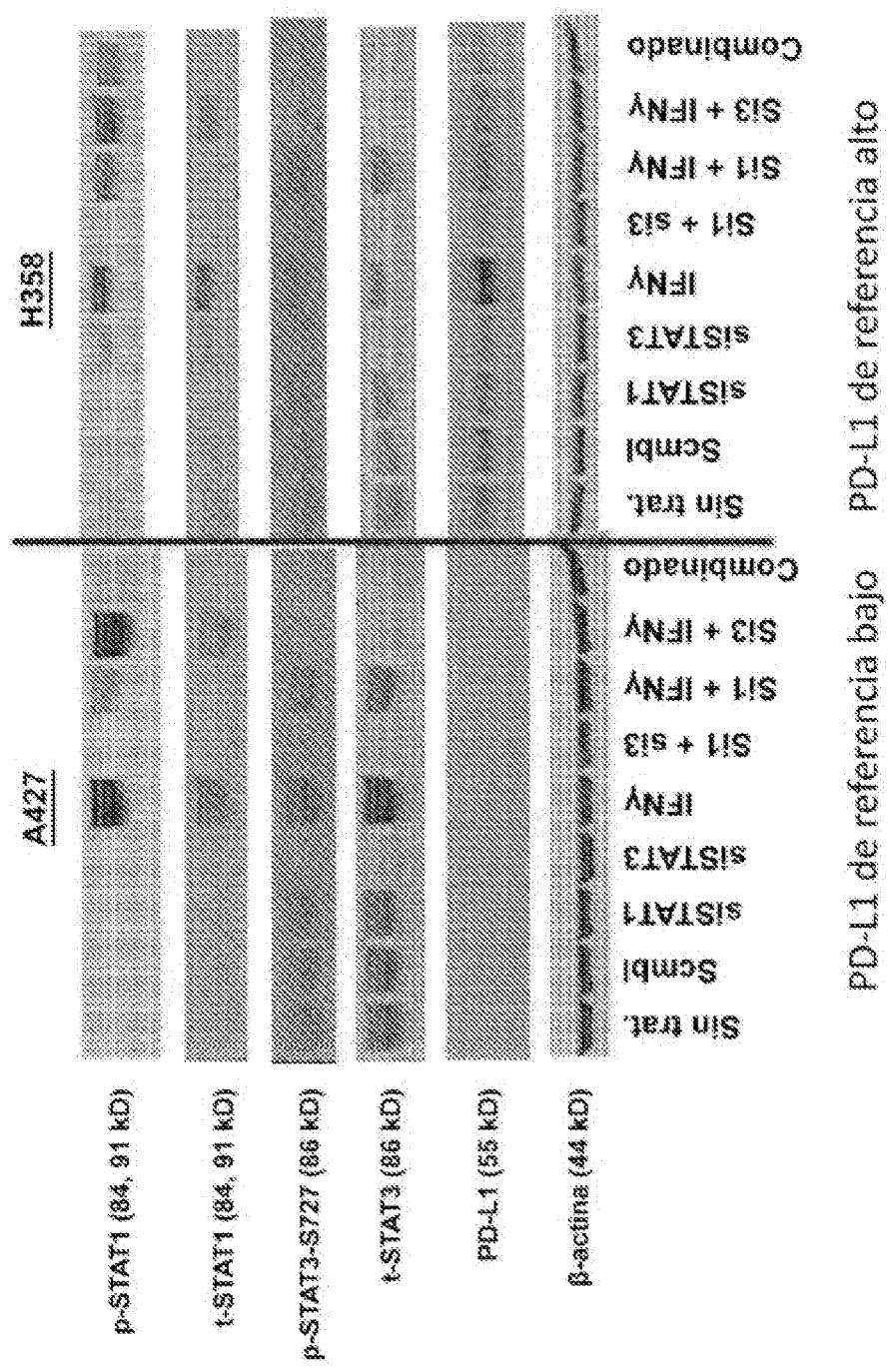


Figura 10D



PD-L1 de referencia bajo      PD-L1 de referencia alto

Figura 11

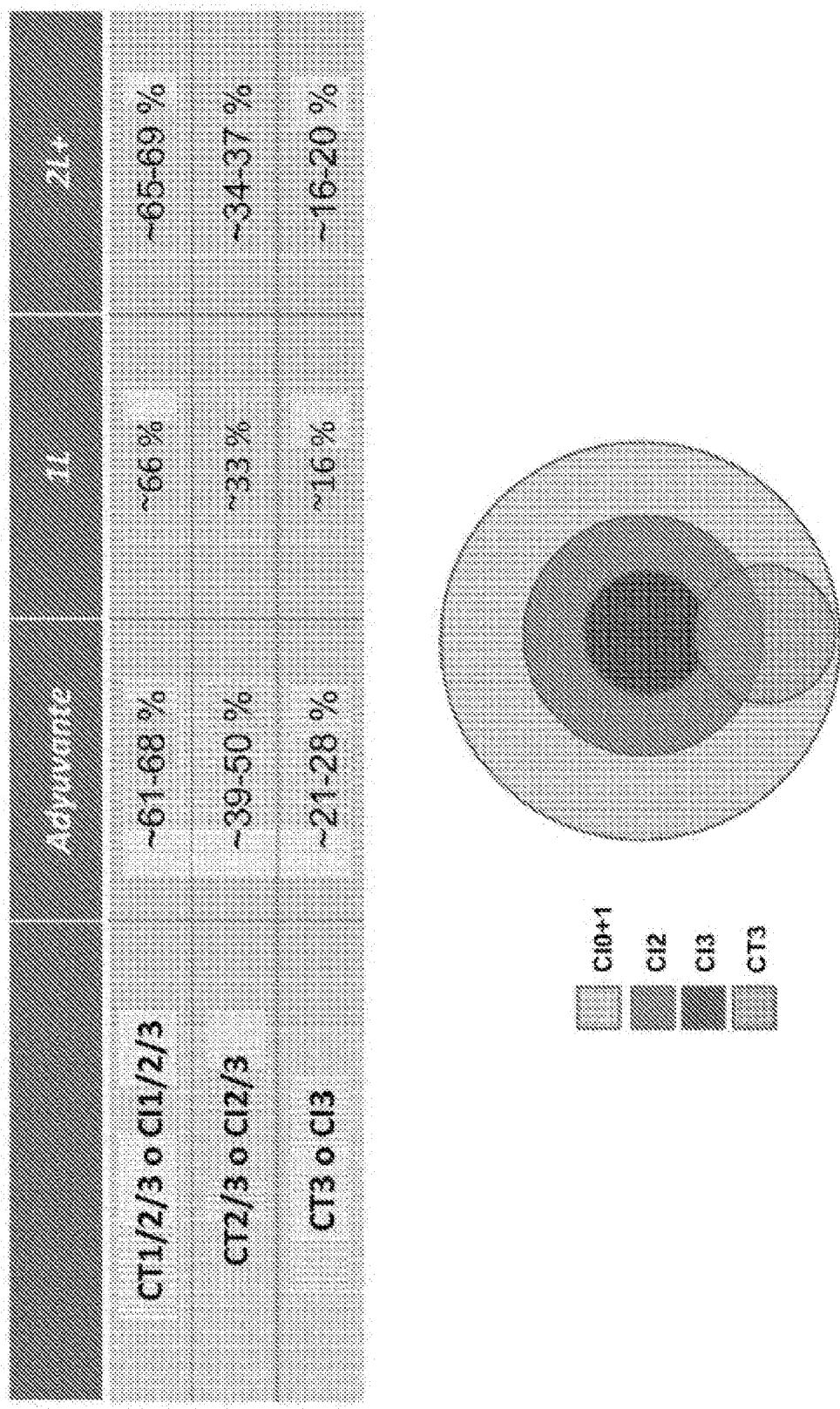


Figura 12A

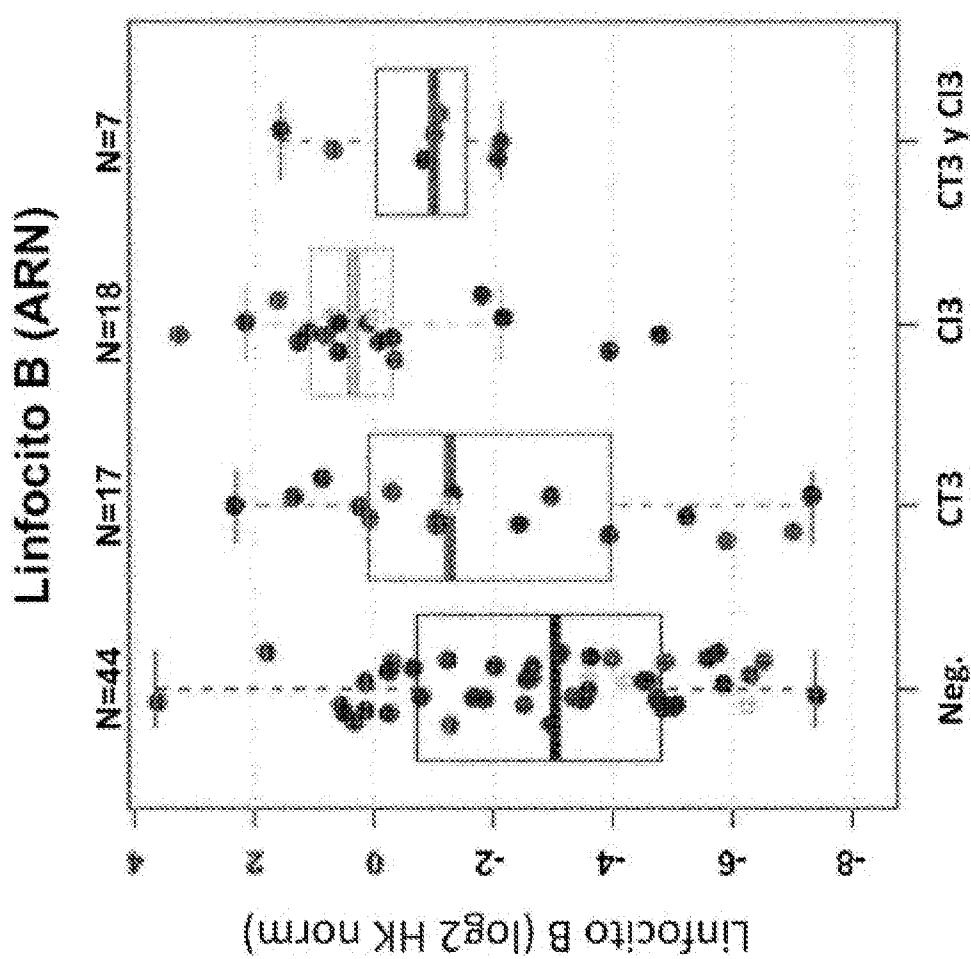


Figura 12B

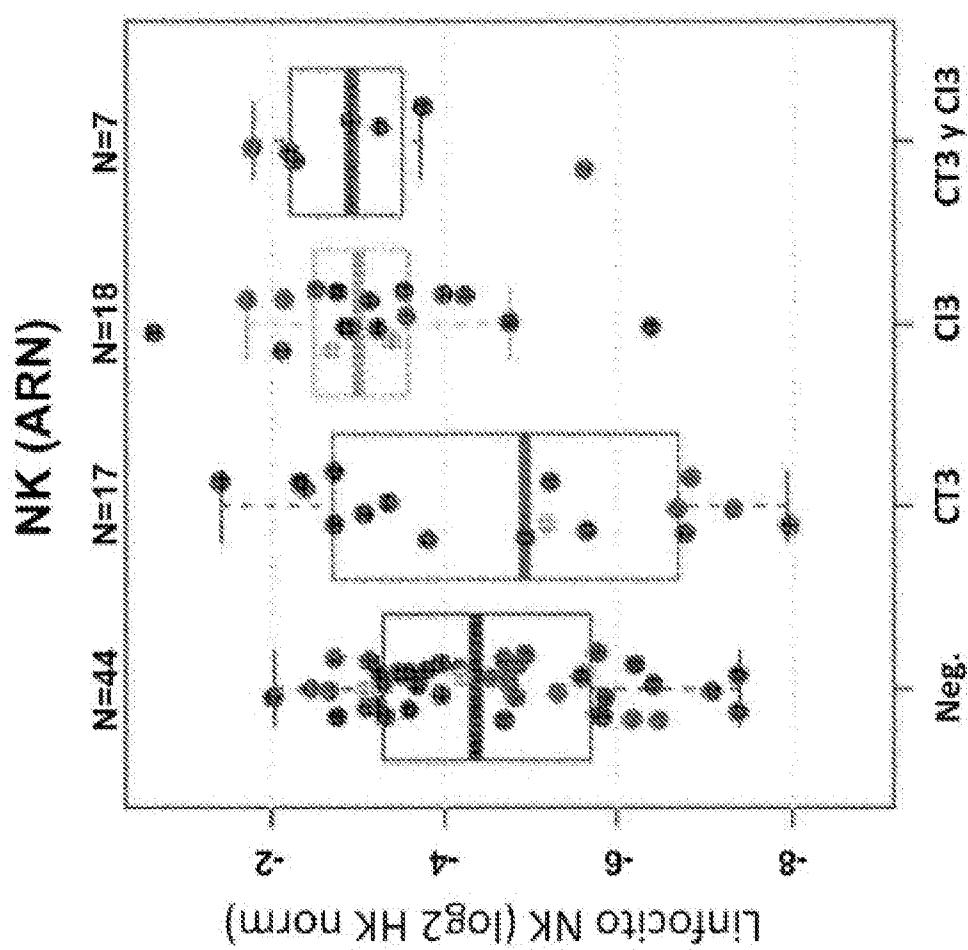


Figura 13A

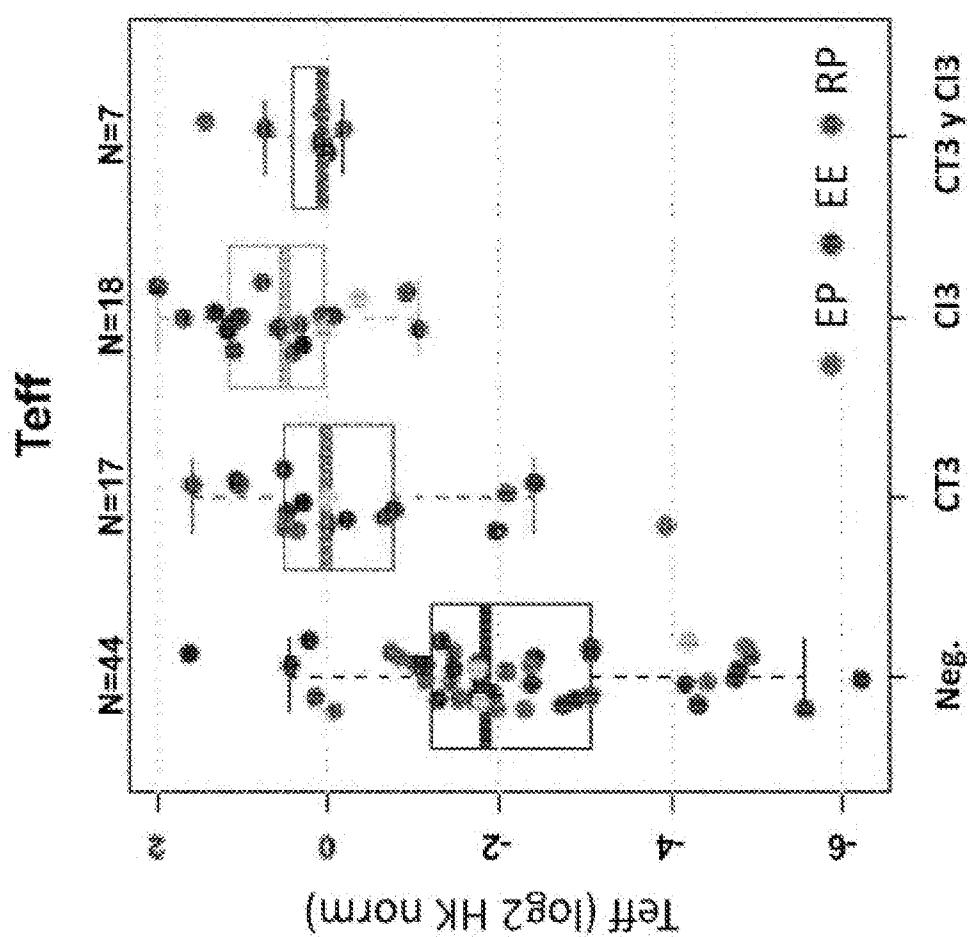


Figura 13B

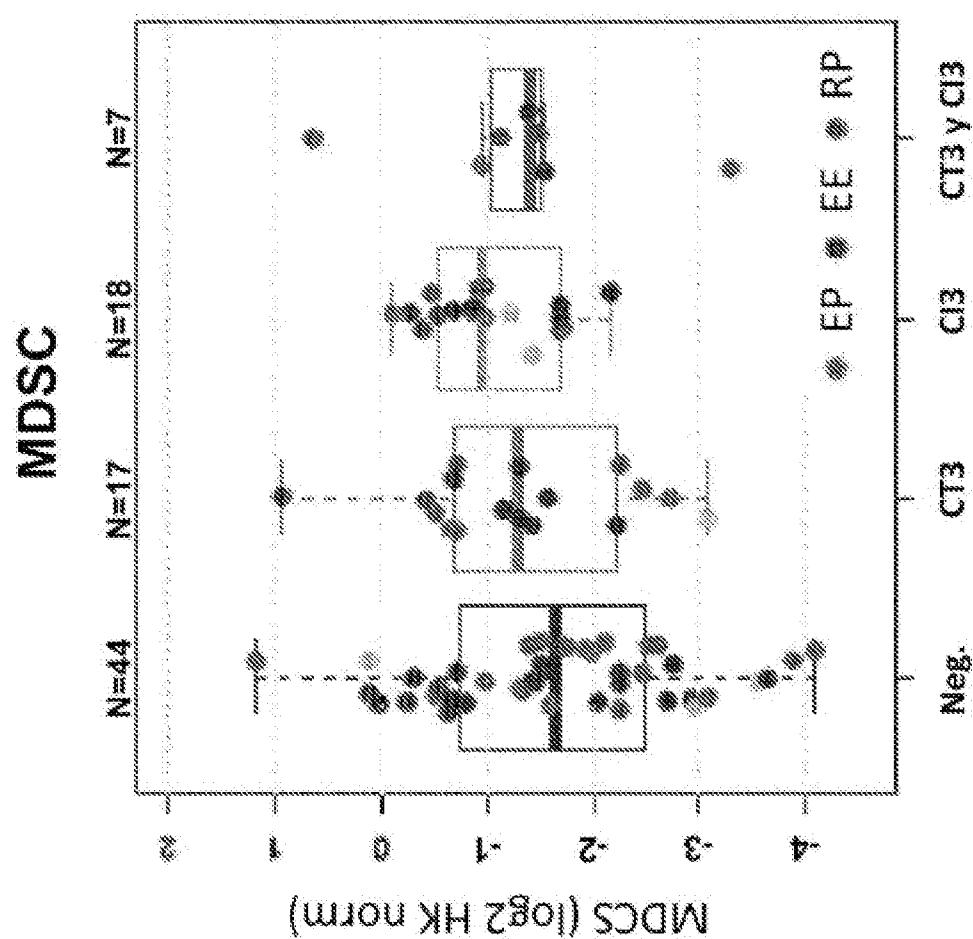
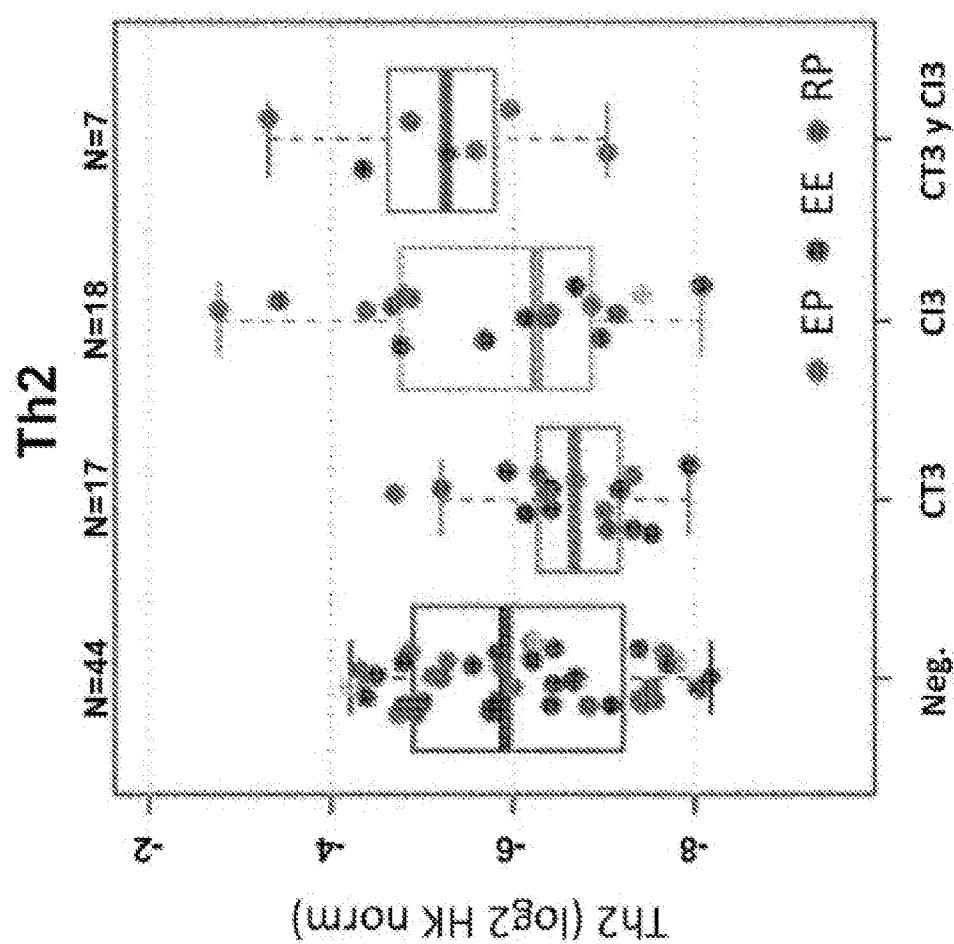
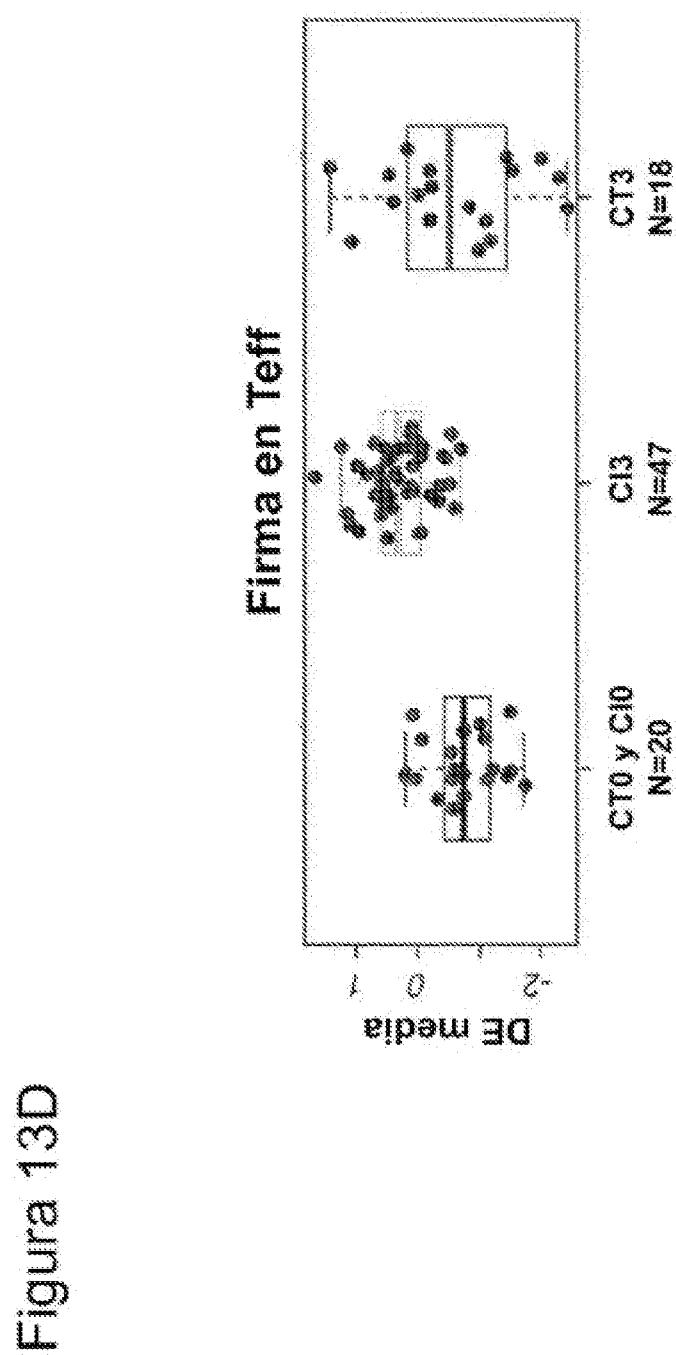
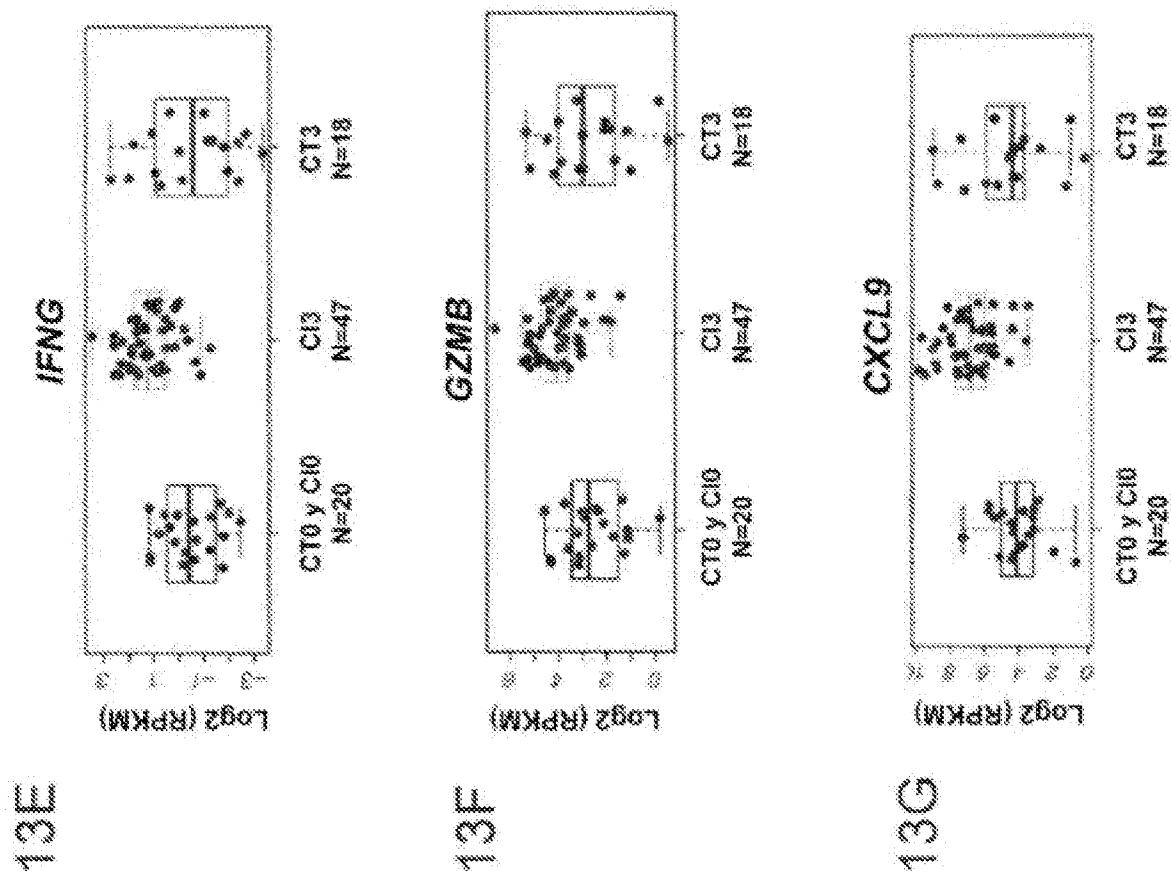


Figura 13C



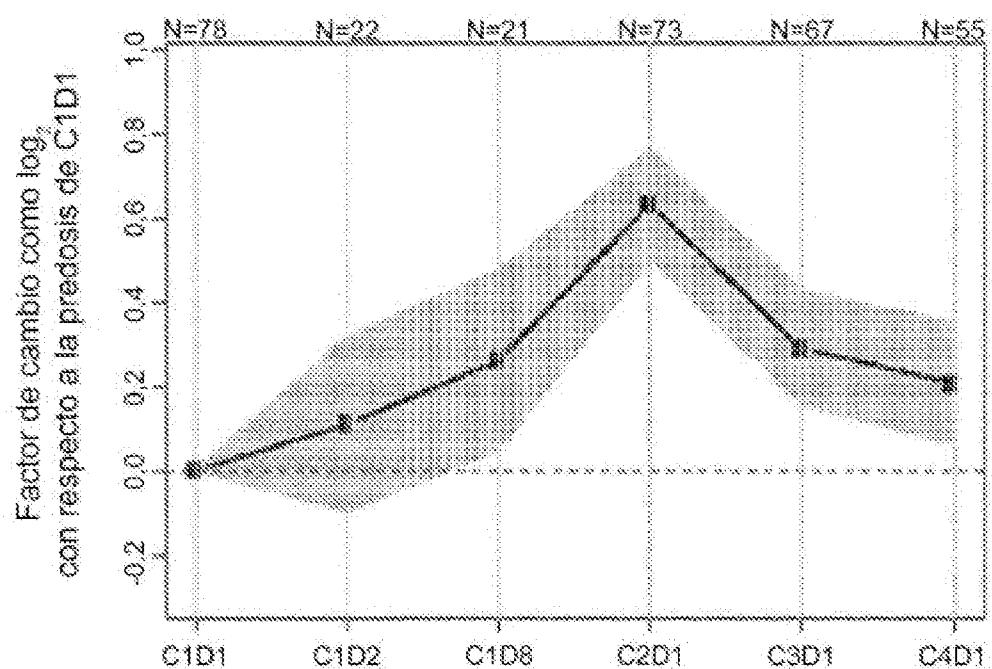


Figuras 13E-13G

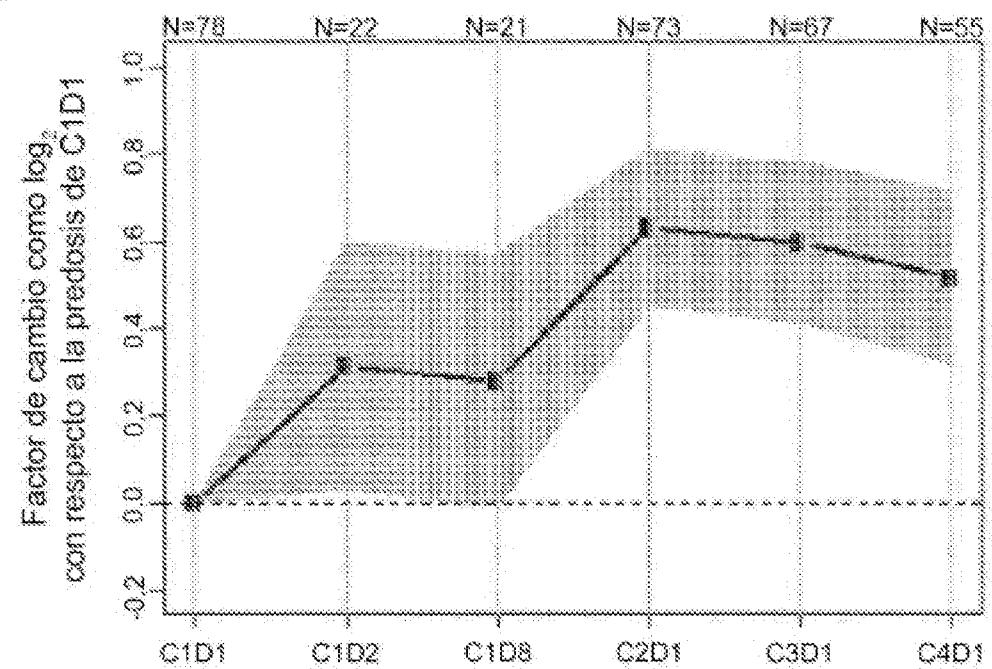


## Figuras 14A-14B

14A



14B



Figuras 15A-15C

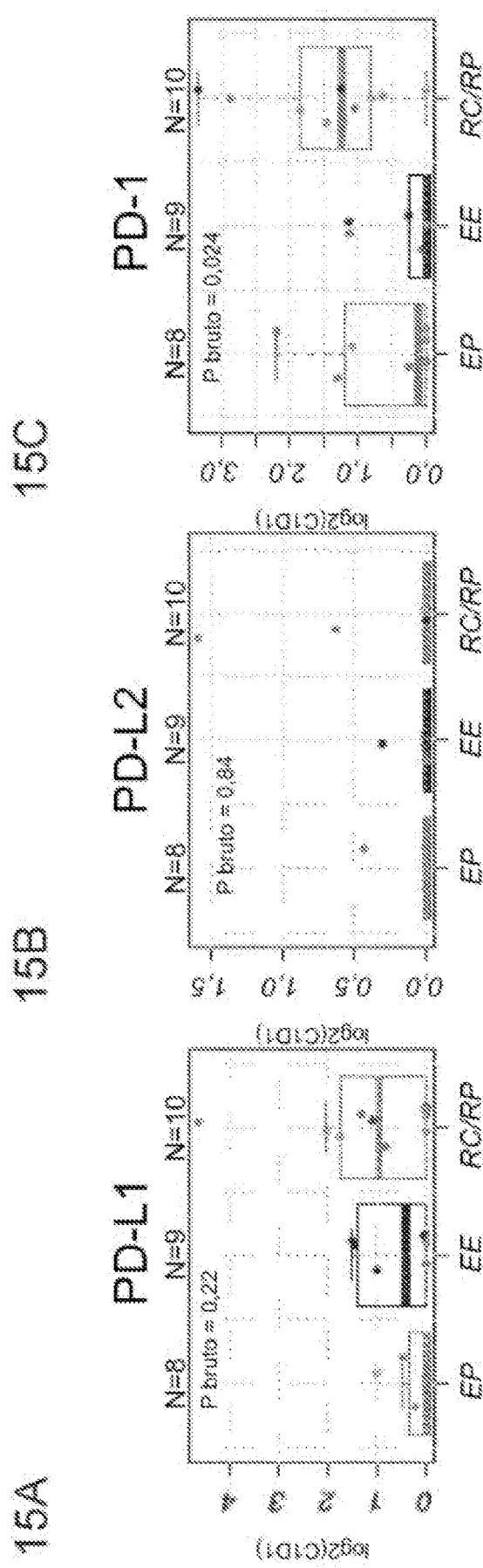


Figura 16A

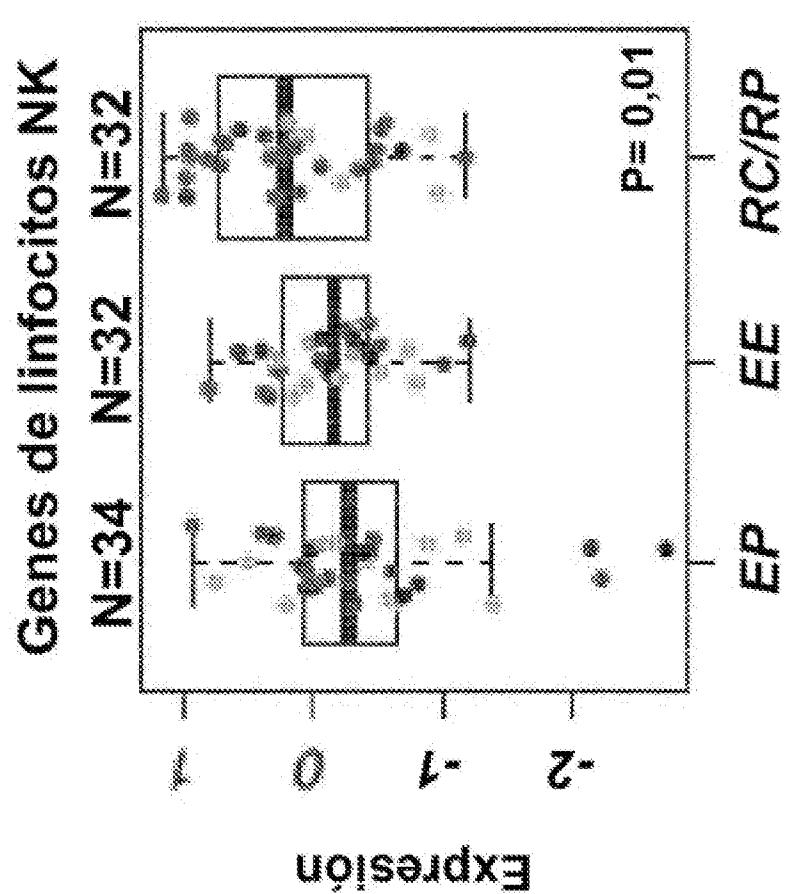
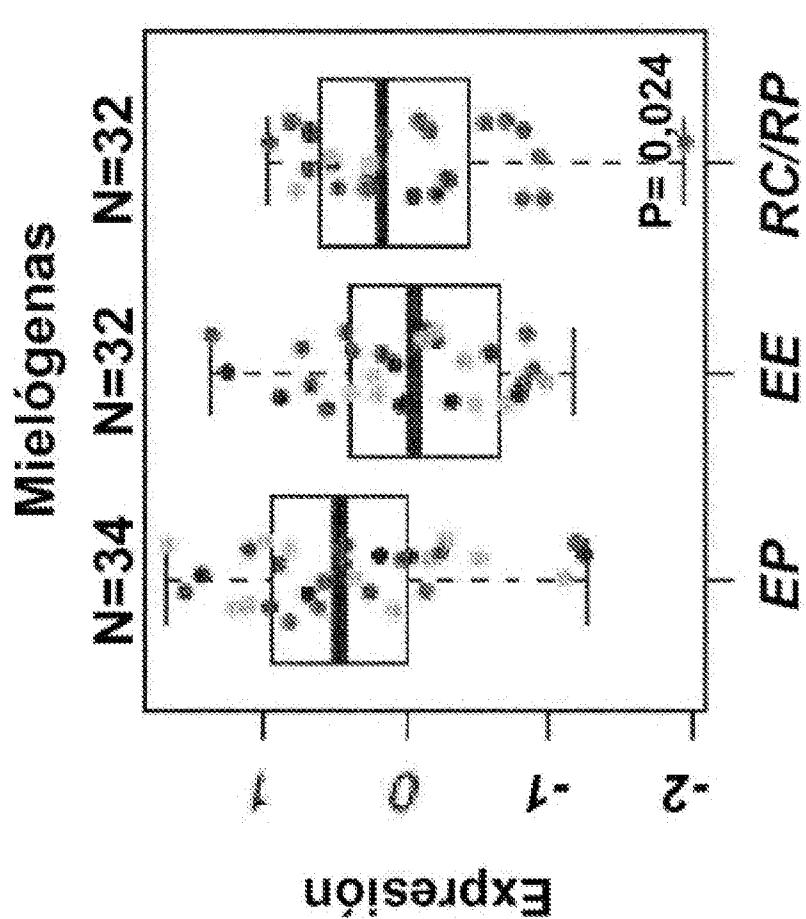
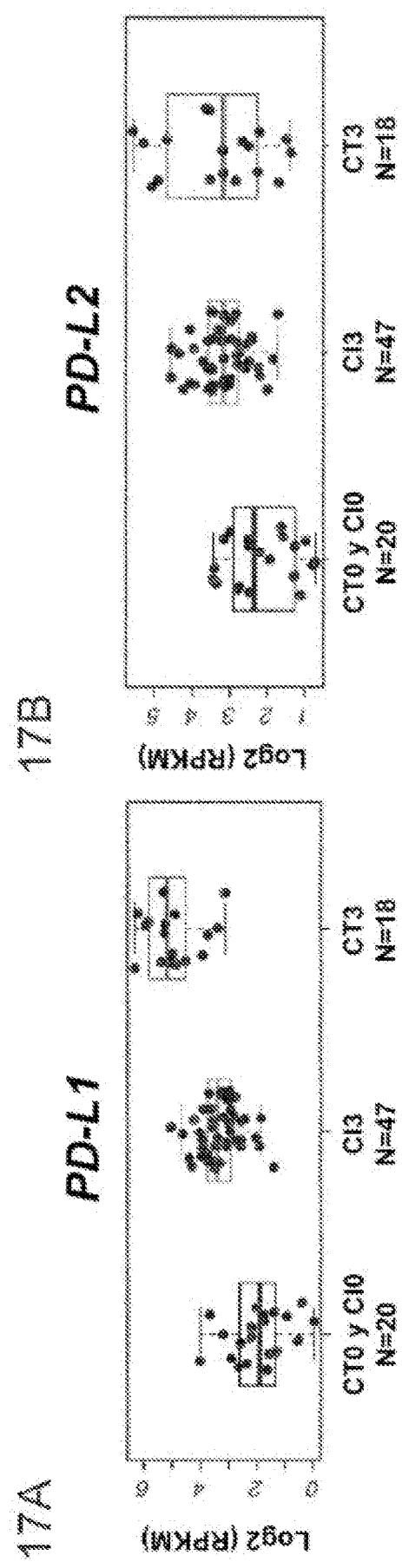


Figura 16B



Figuras 17A-17B



Figuras 18A-18B

