

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 890**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2020** **PCT/US2020/019135**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2020** **WO20172482**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2020** **E 20715521 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2024** **EP 3927365**

54 Título: **Proteínas de fusión de dominio extracelular de CD80-Fc para tratar tumores PD-L1 negativos**

30 Prioridad:

22.02.2019 US 201962809319 P
07.03.2019 US 201962815249 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.11.2024

73 Titular/es:

FIVE PRIME THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
111 Oyster Point Boulevard
South San Francisco, CA 94080, US

72 Inventor/es:

BARBEE, SUSANNAH D.;
BRENNAN, THOMAS y
SENNINO, BARBARA

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 989 890 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión de dominio extracelular de CD80-Fc para tratar tumores PD-L1 negativos

5 **Descripción****Campo**

10 Como se demuestra en este documento, las proteínas de fusión que comprenden un dominio extracelular (ECD) de CD80 (B7-1) humana y un dominio de fragmento de inmunoglobulina G1 (IgG1) humana cristalizable (Fc) son eficaces en el tratamiento de tumores, independientemente del estado de PD-L1. Por consiguiente, dichas proteínas de fusión pueden usarse ventajosamente para tratar tumores PD-L1 negativos.

Antecedentes

15 PD-1 (proteína 1 de muerte celular programada) es un punto de control inmunológico que se expresa en linfocitos T activados. La ruta de PD-1 es importante en el microentorno tumoral, donde PD-L1 (ligando de proteína 1 de muerte celular programada) expresado por tumores interactúa con PD-1 para suprimir las funciones efectoras de los linfocitos T, superando de ese modo la vigilancia inmunitaria y la destrucción de células tumorales. Además de en células tumorales, PD-L1 también puede expresarse por células presentadoras de antígeno en el microentorno tumoral. Se han aprobado antagonistas tanto de PD-1 como de PD-L1 para el tratamiento de cánceres.

25 Se ha informado que PD-L1 se une a CD80 (B7-1) e induce la señalización inhibidora bidireccional en ausencia de los receptores CD28 y CTLA-4 para CD80 (Li *et al.*, *JBC* 292:6799-6809 (2017)). Por lo tanto, se ha propuesto que las proteínas CD80 podrían actuar terapéuticamente antagonizando la ruta de PD-L1/PD-1 inhibidora para dirigir la potente inmunidad antitumoral (Swanson *et al.*, *Cancer Research* 78: Abstract 4550 (2018)). De hecho, las proteínas de fusión del dominio extracelular (ECD) de CD80-Fc han demostrado provocar una potente actividad antitumoral.

30 Sin embargo, PD-L1 no se expresa en todos los tumores. Como resultado, se requiere ensayo de PD-L1 para el tratamiento de determinadas indicaciones con inhibidores de PD-1 o PD-L1, de modo que los tumores que no expresan PD-L1 no pueden ser elegibles para el tratamiento. Por consiguiente, se necesitan métodos de tratamiento para tumores PD-L1 negativos, porque los cánceres PD-L1-negativos son difíciles de tratar; véase, por ejemplo: Paz-Ares (2017); *Annals Onc.* 28(S2):ii50-ii51.

35 **Sumario**

40 Como se demuestra en este documento, el efecto antitumoral provocado por proteínas de fusión que comprenden el dominio extracelular (ECD) del grupo de diferenciación humano 80 (CD80) y el dominio de fragmento cristalizable (Fc) de inmunoglobulina G1 (IgG1) humana está mediado mediante CD28 y CTLA-4, pero no mediante PD-L1. Por lo tanto, estas proteínas de fusión sorprendentemente pueden tratar tumores, independientemente de su estado PD-L1. Por consiguiente, en este documento se proporcionan usos médicos de composiciones que comprenden moléculas de fusión que comprenden un ECD CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana para tratar tumores PD-L1 negativos.

45 La presente invención se refiere a una composición que comprende moléculas de fusión de ECD de CD80 para su uso en el tratamiento de un tumor PD-L1 negativo en un sujeto, en donde las moléculas de fusión de ECD de CD80 comprenden un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana.

50 En determinadas realizaciones, el tumor es un tumor sólido. En algunas realizaciones, el sujeto está afectado con cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer pulmonar no microcítico, melanoma, carcinoma escamocelular de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer pancreático, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, cáncer de vejiga o cáncer endometrial. En algunas realizaciones, el sujeto está afectado con un cáncer que es recidivante o progresivo después de cirugía, quimioterapia, radioterapia o una combinación de las mismas.

55 En algunas realizaciones, la composición comprende moléculas de fusión de ECD de CD80 sialiladas. En una realización preferida, las moléculas de fusión de ECD de CD80 sialiladas comprenden 15-30 moles de ácido siálico (SA) por mol de proteína de fusión.

60 En algunas realizaciones, el dominio Fc de IgG1 humana se liga al extremo carboxílico del ECD de CD80 humana. En otras realizaciones, las moléculas de fusión de ECD de CD80 comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5.

65 En algunas realizaciones, el tratamiento comprende la administración de 0,07 mg a 70 mg de las moléculas de fusión de ECD de CD80. En realizaciones preferidas, el tratamiento comprende la administración de 0,07 mg, 0,21 mg, 0,7 mg, 2,1 mg, 7 mg, 21 mg, 42 mg o 70 mg de las moléculas de fusión de ECD de CD80. En determinadas realizaciones, el tratamiento comprende la administración de la composición una vez cada tres semanas.

En algunas realizaciones, el sujeto no ha recibido tratamiento previo con un antagonista de PD-1/PD-L1. En otras realizaciones, el sujeto ha recibido tratamiento previo con al menos un agente antiangiogénico. En una realización preferida, el agente antiangiogénico es sunitinib, sorafenib, pazopanib, axitinib, tivozanib, ramucirumab o bevacizumab.

En algunas realizaciones, el sujeto está afectado con un melanoma que tiene una mutación BRAF y ha recibido tratamiento previo con al menos un inhibidor de BRAF. En una realización preferida, el inhibidor de BRAF es vemurafenib o dabrafenib.

En una realización específica, la composición comprende de 0,07 mg a 70 mg de moléculas de fusión de ECD de CD80 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5. En una realización preferida, las moléculas de fusión de ECD de CD80 comprenden 15-60 moles de SA por mol de proteína de fusión.

Breve descripción de los dibujos

Figuras **1A** y **1B**: Se evaluaron esplenocitos de ratón para el acoplamiento de mCD80-Fc y la ocupación del receptor. **(A)** Se identificaron subconjuntos de inmunocitos esplénicos como DC CD11b+ (B220-Thy1.2-CD49b-CD11c+CD11b+), DC CD11b- (B220-Thy1.2-CD49b-CD11c+CD11b-), macrófagos (B220-Thy1.2-CD49b-CD11c-CD11b+), linfocitos NK (B220-Thy1.2-CD49b+) y linfocitos T (CD3+CD4+ o CD3+CD8+) por citometría de flujo. Los diagramas de citometría de flujo representativos representan la estrategia de sincronización. **(B)** Se incubaron concentraciones crecientes de mCD80-Fc con esplenocitos de ratón (cepa BALB/c fila superior; cepa C57Bl/6 fila inferior), y se midió el acoplamiento de mCD80-Fc tanto mediante anti-mIgG marcado con biotina seguido de estreptavidina Alexa488 ("fármaco unido") como mediante detección de ligandos de CD80 con clones de Ab competitivos (PD-L1 o CD28 "libre") enumerados como valores de capacidad de unión de anticuerpo (ABC). No se detectó CTLA-4 en ningún inmunocito evaluado (datos no mostrados). L.D., límite de detección de ABC. Los gráficos representan la media $\pm$ DT de $n = 3$ animales/cepa medida en duplicados técnicos. Se realizó ensayo estadístico basado en ANOVA para las concentraciones de fármaco frente a ausencia de fármaco (0 μ g/ml) donde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ se consideró significativo. (Véase el ejemplo 1.)

Figuras **2A** y **2B**: se realizaron experimentos de ocupación de receptor de hCD80-Fc en células CHO transducidas con lentivirus que expresan CTLA-4, PD-L1, CD28 o los tres ligandos de CD80 (CHO-CTLA4/PDL1/CD28; "CHO-3") humanos. Se usaron células CHO no transducidas parentales como control negativo. **(A)** Se evaluó la expresión del ligando de CD80 en líneas celulares CHO por citometría de flujo. Se muestran histogramas escalonados representativos, y se enumeran los valores de capacidad de unión de anticuerpo (ABC) para determinar el número de sitios de unión de Ab por célula en gráficos de barras a la derecha. **(B)** Se incubaron células CHO con concentraciones crecientes de hCD80-Fc (formas rellenas) o hlgG1-Fc de control (formas vacías). La unión de hCD80-Fc se detectó tanto mediante anti-hlgG-Fc marcado con biotina seguido de estreptavidina BV605 ("fármaco unido") como mediante detección de ligandos de CD80 con clones de Ab competitivos (CTLA-4, PD-L1, CD28 "libre"). L.D., límite de detección de ABC. Los gráficos representan la media $\pm$ ETM de réplicas técnicas. Se realizó ensayo estadístico basado en ANOVA para las concentraciones de fármaco frente a ausencia de fármaco (0 μ g/ml) donde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ se consideró significativo. (Véase el ejemplo 2.)

Figuras **3A** y **3B**: Se evaluaron PBMC para el acoplamiento de hCD8-Fc y la ocupación del receptor. **(A)** Se identificaron subconjuntos de inmunocitos periféricos como linfocitos B (CD19+), monocitos (CD14+), linfocitos NK (CD56+CD3-) y linfocitos T (CD56-CD3+ y CD4+ o CD8+) por citometría de flujo. Los diagramas de citometría de flujo representativos representan la estrategia de sincronización. **(B)** Se incubaron concentraciones crecientes de hCD80-Fc con PBMC, y se midió el acoplamiento de hCD80-Fc tanto mediante anti-hlgG-Fc marcado con biotina seguido de estreptavidina Alexa488 ("fármaco unido") como mediante detección de ligandos de CD80 con clones de Ab competitivos (PD-L1 o CD28 "libre") enumerados como valores de capacidad de unión de anticuerpo (ABC). No se detectó CTLA-4 en ningún inmunocito evaluado (datos no mostrados). L.D., límite de detección de ABC. Los gráficos representan la media $\pm$ DT de $n = 3$ donadores. Se realizó ensayo estadístico basado en ANOVA para las concentraciones de fármaco frente a ausencia de fármaco (0 μ g/ml) donde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ se consideró significativo. (Véase el ejemplo 2.)

Figuras **4A** y **4B**: Se evaluaron CD4+Teff y CD4+Treg expandidos *in vitro* para el acoplamiento de hCD80-Fc y la ocupación del receptor. **(A)** Se evaluó la expresión del ligando de CD80 por citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos que comparan la expresión de ligando entre linfocitos T no teñidos, CD4+Teff y CD4+Treg. **(B)** Se incubaron concentraciones crecientes de hCD80-Fc con linfocitos T, y se midió el acoplamiento de hCD80-Fc tanto mediante unión de anti-hlgG-Fc marcado con biotina seguido de estreptavidina Alexa488 ("fármaco unido") como mediante detección de ligandos de CD80 con clones de Ab competitivos (CTLA-4, PD-L1 o CD28 "libre") enumerados como valores de capacidad de unión de anticuerpo (ABC). L.D., límite de detección de ABC. Los gráficos representan la media $\pm$ DT de $n = 2-3$ donadores. Se realizó ensayo estadístico basado en ANOVA para las concentraciones de fármaco frente a ausencia de fármaco (0 μ g/ml) donde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ se consideró significativo. (Véase el ejemplo 2.)

Figura **5** Se muestra el crecimiento promedio del tumor en todos los grupos y volúmenes individuales del tumor en el

día 21. Se inocularon ratones BALB/c inmunocompetentes con células tumorales CT26 PD-L1 KO. El tratamiento se inició 4 días después de la inoculación, cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 80 mm³. Los ratones se trataron con mCD80-Fc a 0,3 mg/kg en los días 4, 7 y 11. mCD80-Fc inhibió significativamente el crecimiento tumoral ($p = 0,0004$ sobre mlgG2a de control; $p < 0,0001$ sobre el grupo sin tratar). (Véase el ejemplo 3.)

Descripción detallada

1. Definiciones

Salvo que se definan de otro modo, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente invención tendrán los significados que entienden normalmente los expertos en la materia. Como se usa en este documento, la expresión "uso médico" tiene que entenderse como una forma abreviada para un producto con finalidad limitada en el sentido del Art. 54(5) EPC ("producto X para su uso en un método de tratamiento de la enfermedad Y").

Una "molécula de fusión", como se usa en este documento, se refiere a una molécula compuesta por dos o más moléculas diferentes que no existen juntas en la naturaleza, que se unen covalente o no covalentemente para formar una nueva molécula. Por ejemplo, las moléculas de fusión pueden estar compuestas por un polipéptido y un polímero tal como PEG, o por dos polipéptidos diferentes. Una "proteína de fusión" se refiere a una molécula de fusión compuesta por dos o más polipéptidos que no existen en una molécula individual en la naturaleza.

Un "dominio extracelular de CD80" o "ECD de CD80" se refiere a un polipéptido de dominio extracelular de CD80. Un ECD de CD80, por ejemplo, puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1 o 2. Un "una molécula de fusión de ECD de CD80" se refiere a una molécula que comprende un ECD de CD80 y un compañero de fusión. El compañero de fusión puede estar unido covalentemente, por ejemplo, al extremo N o C del ECD de CD80 o en una ubicación interna. Una "proteína de fusión de ECD de CD80" es una molécula de fusión de ECD de CD80 que comprende un ECD de CD80 y otro polipéptido que no está asociado de forma natural con el ECD de CD80, tal como un dominio Fc. Una proteína de fusión de ECD de CD80, por ejemplo, puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4 o 5.

El término "aislada", como se usa en este documento, se refiere a una molécula que se ha separado de al menos algunos de los componentes con que se encuentra típicamente en la naturaleza. Por ejemplo, un polipéptido se denomina "aislado" cuando se separa de al menos algunos de los componentes de la célula en que se produjo. Cuando se secreta un polipéptido mediante una célula después de la expresión, la separación física del sobrenadante que contiene el polipéptido de la célula que lo produce se considera que es "aislar" el polipéptido. Asimismo, un polinucleótido se denomina "aislado" cuando no es parte del polinucleótido más grande (tal como, por ejemplo, ADN genómico o ADN mitocondrial, en el caso de un polinucleótido de ADN) en que se encuentra típicamente en la naturaleza, o se separa de al menos algunos de los componentes de la célula en que se produjo, por ejemplo, en el caso de un polinucleótido de ARN. Por tanto, un polinucleótido de ADN que está contenido en un vector dentro de una célula hospedadora puede denominarse "aislado" siempre que el polinucleótido no se encuentra en ese vector en la naturaleza.

Los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en este documento para hacer referencia a un ser humano. También se proporcionan usos médicos para el tratamiento de otros mamíferos incluyendo, aunque sin limitación, roedores, simios, félidos, cánidos, équidos, bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, animales mamíferos de laboratorio, animales mamíferos de granja, animales mamíferos deportivos y mascotas mamíferas.

El término "cáncer" se usa en este documento para hacer referencia a un grupo de células que muestran niveles anómalamente altos de proliferación y crecimiento. Un cáncer puede un tumor sólido, por ejemplo, un cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer pulmonar no microcítico, cáncer pulmonar microcítico, melanoma, carcinoma escamocelular de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer pancreático, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, cáncer de vejiga o cáncer endometrial.

Expresiones tales como "que trata", "tratamiento" y "tratar" se refieren a medidas terapéuticas que curan, ralentizan, reducen los síntomas de y/o detienen la progresión de una afección o trastorno patológico. Por tanto, los que necesitan tratamiento incluyen los ya diagnosticados con o sospechosos de tener el trastorno. En determinadas realizaciones, un sujeto se "trata" satisfactoriamente para cáncer de acuerdo con los usos médicos de la presente invención si el paciente muestra uno o más de los siguientes: una reducción en el número de o ausencia completa de células cancerosas; una reducción en el tamaño del tumor; inhibición de o ausencia de infiltración de células cancerosas en órganos periféricos incluyendo, por ejemplo, la propagación del cáncer en tejido blando y hueso; inhibición o ausencia de metástasis tumoral; inhibición o ausencia de crecimiento del tumor; alivio de uno o más síntomas asociados con el cáncer específico; morbilidad y mortalidad reducidas; mejora en la calidad de vida; reducción en la oncogenia, frecuencia oncogénica o capacidad oncogénica, de un tumor; reducción en el número o frecuencia de células madre cancerosas en un tumor; diferenciación de células oncogénicas a un estado no oncogénico; aumento en la supervivencia sin progresión (PFS), supervivencia sin enfermedad (DFS), supervivencia global (OS), respuesta completa (CR), respuesta parcial (PR), enfermedad estable (SD), una disminución en la enfermedad progresiva (PD), un tiempo

reducido hasta la progresión (TTP) o cualquier combinación de los mismos.

Los términos "administrar", "administrando", "administración" y similares, como se usan en este documento, se refieren a métodos que pueden usarse para posibilitar la administración de un fármaco, por ejemplo, una proteína de fusión de ECD de CD80 al sitio deseado de acción biológica (por ejemplo, administración intravenosa). Las técnicas de administración que pueden emplearse con los agentes y usos médicos descritos en este documento se encuentran, por ejemplo, en Goodman y Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, edición actual, Pergamon; y Remington's, *Pharmaceutical Sciences*, edición actual, Mack Publishing Co., Easton, Pa.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco, por ejemplo, una proteína de fusión de ECD de CD80, eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño o carga del tumor; inhibir, en alguna medida, la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir, en alguna medida, la metástasis del tumor; inhibir, en alguna medida, el crecimiento del tumor; aliviar, en alguna medida, uno o más de los síntomas asociados con el cáncer; y/o provocar una respuesta favorable tal como aumento en la supervivencia sin progresión (PFS), supervivencia sin enfermedad (DFS), supervivencia global (OS), respuesta completa (CR), respuesta parcial (PR) o, en algunos casos, enfermedad estable (SD), una disminución en la enfermedad progresiva (PD), un tiempo reducido hasta la progresión (TTP) o cualquier combinación de los mismos.

Los términos "resistente" o "insensible", cuando se usan en el contexto de tratamiento con un agente terapéutico, significa que el sujeto muestra respuesta disminuida o ausencia de respuesta a una dosis convencional del agente terapéutico, con respecto a la respuesta del sujeto a la dosis convencional del agente terapéutico en el pasado, o con respecto a la respuesta esperada de un sujeto similar con un trastorno similar a la dosis convencional del agente terapéutico. Por tanto, en algunas realizaciones, un sujeto puede ser resistente a un agente terapéutico, aunque al sujeto no se le haya administrado previamente el agente terapéutico, o el sujeto puede desarrollar resistencia al agente terapéutico después de haber respondido al agente en una o más ocasiones previas.

Un cáncer "refractario" es uno que progresa aunque se administre un tratamiento antitumoral, tal como quimioterapia, al paciente con cáncer.

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

Las expresiones "ligando 1 de muerte celular programada 1" y "PD-L1" se refieren a uno de dos ligandos glucoproteínicos de superficie celular para PD-1 (siendo el otro PD-L2) que regula por disminución la activación de linfocitos T y la secreción de citocinas tras la unión a PD-1. El término "PD-L1", como se usa en este documento, incluye PD-L1 humano (hPD-L1), variantes de origen natural e isoformas de hPD-1, y homólogos de especie de hPD-L1. Una secuencia de hPD-L1 maduro se proporciona como SEQ ID NO:6.

La expresión "tumor PD-L1 negativo" se refiere a un tumor que no expresa significativamente PD-L1 en la superficie celular. La presencia o ausencia de PD-L1 puede determinarse, por ejemplo, usando inmunohistoquímica, que puede cuantificarse usando una puntuación de proporción de tumor (TPS). Una TPS (%) es igual a [número de células tumorales teñidas con PD-L1/número total de células tumorales viables] x 100. Por consiguiente, un tumor PD-L1 negativo puede ser un tumor con una puntuación TPS de menos de un 5 % o menos de un 1 %.

La expresión "antagonista de PD-1/PD-L1" se refiere a un resto que altera la ruta de señalización de PD-1/PD-L1. En algunas realizaciones, el antagonista inhibe la ruta de señalización de PD-1/PD-L1 por la unión a PD-1 y/o PD-L1. En algunas realizaciones, el antagonista de PD-1/PD-L1 también se une a PD-L2. En algunas realizaciones, un antagonista de PD-1/PD-L1 bloquea la unión de PD-1 a PD-L1 y opcionalmente PD-L2. Antagonistas de PD-1/PD-L1 ejemplares no limitantes incluyen antagonistas de PD-1, tales como anticuerpos que se unen a PD-1 (por ejemplo, nivolumab y pembrolizumab); antagonistas de PD-L1, tales como anticuerpos que se unen a PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab, durvalumab y avelumab); proteínas de fusión, tales como AMP-224; y péptidos, tales como AUR-012.

Un "agente antiangiogénico" o "inhibidor de la angiogénesis" se refiere a un agente tal como una sustancia de pequeño peso molecular, un polinucleótido (incluyendo, por ejemplo, un ARN inhibidor (iARN o ARNip)), un polipéptido, una proteína aislada, una proteína recombinante, un anticuerpo o conjugados o proteínas de fusión de los mismos, que inhibe la angiogénesis, vasculogénesis o permeabilidad vascular indeseable, directa o indirectamente. Debe entenderse que un agente antiangiogénico incluye aquellos agentes que se unen a y bloquean la actividad angiogénica del factor angiogénico o su receptor. Por ejemplo, un agente antiangiogénico es un anticuerpo contra u otro antagonista de un agente angiogénico, por ejemplo, anticuerpos contra VEGF-A (por ejemplo, bevacizumab (Avastin®)) o contra el receptor de VEGF-A (por ejemplo, receptor KDR o receptor de Flt-1), inhibidores anti-PDGFR tales como Gleevec® (mesilato de imatinib), moléculas pequeñas que bloquean la señalización del receptor de VEGF (por ejemplo, PTK787/ZK2284, SU6668, Sutent®/SU11248 (malato de sunitinib), AMG706, o los descritos en, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 2004/113304). Los agentes antiangiogénicos también incluyen inhibidores naturales de la angiogénesis, por ejemplo, angiostatina, endostatina, *etc.* Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore (1991) *Annu. Rev. Physiol.* 53:217-39; Streit y Detmar (2003) *Oncogene* 22:3172-3179 (por ejemplo, tabla 3 que

enumera el tratamiento antiangiogénico en melanoma maligno); Ferrara y Alitalo (1999) *Nature Medicine* 5(12):1359-1364; Tonini *et al.* (2003) *Oncogene* 22:6549-6556 (por ejemplo, tabla 2 que enumera factores antiangiogénicos conocidos); Sato (2003) *Int. J. Clin. Oncol.* 8:200-206 (por ejemplo, tabla 1 que enumera agentes antiangiogénicos usados en ensayos clínicos), y Jayson (2016) *Lancet* 338(10043):518-529.

La expresión "composición farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica del ingrediente activo sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación. La formulación puede ser estéril. Una composición farmacéutica puede contener un "vehículo farmacéutico", que se refiere a un vehículo que es atóxico para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas y es compatible con otros ingredientes de la formulación. El vehículo farmacéuticamente aceptable es apropiado para la formulación empleada. Por ejemplo, si el agente terapéutico tiene que administrarse por vía intravenosa, idealmente el vehículo no es irritable para la piel y no provoca reacción en el sitio de inyección.

Como se usa en este documento, el término "aproximadamente", cuando se usa para modificar un valor numérico o intervalo numérico, indica que desviaciones de un 5 % a un 10 % por encima y de un 5 % a un 10 % por debajo del valor o intervalo permanecen dentro del significado pretendido del valor o intervalo indicado.

Cualquier composición o uso médico proporcionado en este documento puede combinarse con uno o más de cualquiera de las otras composiciones y usos médicos proporcionados en este documento.

2. Proteínas de fusión de dominio extracelular de CD80 y Fc

En este documento se proporcionan usos médicos de proteínas de fusión de ECD de CD80 que comprenden un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana (una "proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1"). Proteínas de fusión de ECD de CD80 ejemplares se proporcionan, por ejemplo, en el documento WO 2017/079117.

De acuerdo con la presente invención, el ECD de CD80 es un ECD de CD80 humana. En determinados aspectos, el ECD de CD80 humana comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:1.

De acuerdo con la presente invención, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1 humana. En determinados aspectos, el dominio Fc de IgG1 humana comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:4.

El ECD de CD80 humana y el dominio Fc de IgG1 humana pueden ligarse directamente, de modo que el aminoácido del extremo N del dominio Fc siga inmediatamente al aminoácido del extremo C del ECD de CD80. En determinados aspectos, el ECD de CD80 humana y el dominio Fc de IgG1 humana se traducen como un solo polipéptido a partir de una secuencia codificante que codifica tanto el ECD de CD80 y como el dominio Fc. De acuerdo con la presente invención, la proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc comprende un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana. En determinados aspectos, la proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:5.

Las proteínas de fusión de ECD de CD80 y Fc pueden tener, dependiendo de la manera en que se producen, diferentes niveles de modificaciones particulares de glucosilación. Por ejemplo, una proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc puede sialilarse y puede tener diferentes cantidades de residuos de ácido siálico (SA).

En determinados aspectos, una proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprende un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprende SEQ ID NO:5) comprende de 10 a 60 moléculas de SA. En determinados aspectos, una proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprende un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprende SEQ ID NO:5) comprende de 15 a 60 moléculas de SA. En determinados aspectos, una proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprende un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprende SEQ ID NO:5) comprende de 10 a 40 moléculas de SA. En determinados aspectos, una proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprende un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprende SEQ ID NO:5) comprende de 15 a 30 moléculas de SA. En determinados aspectos, una proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprende un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprende SEQ ID NO:5) comprende de 15 a 25 moléculas de SA. En determinados aspectos, una proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprende un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprende SEQ ID NO:5) comprende de 20 a 40 moléculas de SA. En determinados aspectos, una proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprende un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprende SEQ ID NO:5) comprende de 20 a 30 moléculas de SA. En determinados aspectos, una proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprende un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprende SEQ ID NO:5) comprende de 30 a 40 moléculas de SA. En determinados aspectos, una proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprende un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprende SEQ ID NO:5) comprende 10, 15, 20, 25, 30, 35 o 40 moléculas de SA. En determinados aspectos, una proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprende

un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprende SEQ ID NO:5) comprende de al menos 15 moléculas de SA. En determinados aspectos, una proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprende un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprende SEQ ID NO:5) comprende de al menos 20 moléculas de SA. En determinados aspectos, una proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprende un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprende SEQ ID NO:5) comprende de al menos 25 moléculas de SA. En determinados aspectos, una proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprende un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprende SEQ ID NO:5) comprende de al menos 30 moléculas de SA. En determinados aspectos, una proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprende un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprende SEQ ID NO:5) comprende de al menos 35 moléculas de SA. En determinados aspectos, una proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprende un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprende SEQ ID NO:5) comprende de al menos 40 moléculas de SA.

3. Composiciones farmacéuticas que comprenden proteínas de fusión de dominio extracelular de CD80 y Fc

En este documento se proporcionan usos médicos de composiciones farmacéuticas que comprenden proteínas de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1, por ejemplo, que tienen el grado deseado de pureza en un vehículo, excipiente o estabilizante fisiológicamente aceptable (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA). Vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables son atóxicos para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas. (Véase, por ejemplo, Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, 20.^a ed. (2003); Ansel *et al.*, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7.^a ed., Lippencott Williams y Wilkins (2004); Kibbe *et al.*, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3.^a ed., Pharmaceutical Press (2000)). Las composiciones a usar para administración *in vivo* pueden ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de, por ejemplo, membranas de filtración estériles.

En determinados aspectos, una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprende un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprende SEQ ID NO:5) se formula para administración intravenosa.

En determinados aspectos, una composición farmacéutica comprende 70 mg de una proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprende un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprende SEQ ID NO:5). En determinados aspectos, una composición farmacéutica comprende 42 mg de una proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprende un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprende SEQ ID NO:5). En determinados aspectos, una composición farmacéutica comprende 21 mg de una proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprende un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprende SEQ ID NO:5). En determinados aspectos, una composición farmacéutica comprende 7 mg de una proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprende un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprende SEQ ID NO:5). En determinados aspectos, una composición farmacéutica comprende 2,1 mg de una proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprende un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprende SEQ ID NO:5). En determinados aspectos, una composición farmacéutica comprende 0,7 mg de una proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprende un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprende SEQ ID NO:5). En determinados aspectos, una composición farmacéutica comprende 0,21 mg de una proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprende un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprende SEQ ID NO:5). En determinados aspectos, una composición farmacéutica comprende 0,07 mg de una proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprende un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprende SEQ ID NO:5).

En determinados aspectos, una composición farmacéutica comprende de 0,07 a 70 mg de una proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprende un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprende SEQ ID NO:5). En determinados aspectos, una composición farmacéutica comprende de 7 a 70 mg de una proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprende un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprende SEQ ID NO:5).

En determinados aspectos, una composición farmacéutica comprende proteínas de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprenden un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprenden SEQ ID NO:5) que comprenden de 10 a 60 moles de SA por mol de proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1. En determinados aspectos, una composición farmacéutica comprende proteínas de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprenden un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprenden SEQ ID NO:5) que comprenden de 15 a 60 moles de SA por mol de proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1. En determinados aspectos, una composición farmacéutica comprende proteínas de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprenden un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprenden SEQ ID NO:5) que comprenden de 10 a 40 moles de SA por mol de proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1. En determinados aspectos, una composición farmacéutica comprende proteínas de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprenden un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprenden SEQ ID NO:5) que comprenden de 15 a 30 moles de SA por mol de proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1. En determinados

aspectos, una composición farmacéutica comprende proteínas de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprenden un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprenden SEQ ID NO:5) que comprenden de 15 a 25 moles de SA por mol de proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1. En determinados aspectos, una composición farmacéutica comprende proteínas de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprenden un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprenden SEQ ID NO:5) que comprenden de 20 a 40 moles de SA por mol de proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1. En determinados aspectos, una composición farmacéutica comprende proteínas de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprenden un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprenden SEQ ID NO:5) que comprenden de 20 a 30 moles de SA por mol de proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1. En determinados aspectos, una composición farmacéutica comprende proteínas de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprenden un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprenden SEQ ID NO:5) que comprenden de 30 a 40 moles de SA por mol de proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1. En determinados aspectos, una composición farmacéutica comprende proteínas de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprenden un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprenden SEQ ID NO:5) que comprenden 10, 15, 20, 25, 30, 35 o 40 moles de SA por mol de proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1. En determinados aspectos, una composición farmacéutica comprende proteínas de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprenden un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprenden SEQ ID NO:5) que comprenden al menos 15 moles de SA por mol de proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1. En determinados aspectos, una composición farmacéutica comprende proteínas de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprenden un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprenden SEQ ID NO:5) que comprenden al menos 20 moles de SA por mol de proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1. En determinados aspectos, una composición farmacéutica comprende proteínas de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprenden un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprenden SEQ ID NO:5) que comprenden al menos 25 moles de SA por mol de proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1. En determinados aspectos, una composición farmacéutica comprende proteínas de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprenden un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprenden SEQ ID NO:5) que comprenden al menos 30 moles de SA por mol de proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1. En determinados aspectos, una composición farmacéutica comprende proteínas de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprenden un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprenden SEQ ID NO:5) que comprenden al menos 35 moles de SA por mol de proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1. En determinados aspectos, una composición farmacéutica comprende proteínas de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 (que comprenden un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, o que comprenden SEQ ID NO:5) que comprenden al menos 40 moles de SA por mol de proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1.

4. Métodos y usos de proteínas de fusión de dominio extracelular de CD80 y Fc

En este documento se presentan usos médicos para tratar un tumor PD-L1 negativo (por ejemplo, en un ser humano) que comprenden administrar a un sujeto que lo necesita una composición que comprende proteínas de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 que comprenden el dominio extracelular de CD80 humana y el dominio Fc de IgG1 humana. En algunas realizaciones, la proteína de fusión de ECD de CD80 y Fc de IgG1 comprende la secuencia de SEQ ID NO:5.

La presencia o ausencia de PD-L1 puede determinarse usando un agente que pueda detectar la proteína PD-L1, tal como un anticuerpo anti-PD-L1. Por tanto, en algunas realizaciones, un tumor puede identificarse como tumor PD-L1 negativo sometiendo una muestra de tumor a transferencia de Western, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) o inmunohistoquímica (IHC) usando dicho agente.

En algunas realizaciones, puede usarse IHC para cuantificar la cantidad de PD-L1 en una muestra de tumor, usando, por ejemplo, una puntuación de proporción de tumor (TPS). Una TPS (%) es igual a [número de células tumorales teñidas con PD-L1/número total de células tumorales viables] x 100. Como se proporciona en este documento, un tumor PD-L1 negativo puede ser un tumor con una puntuación TPS de menos de un 5 %. Como se proporciona en este documento, un tumor PD-L1 negativo puede ser un tumor con una puntuación TPS de menos de un 1 %.

La presencia o ausencia de PD-L1 puede determinarse usando un agente que pueda detectar ARNm de PD-L1. Por tanto, en algunas realizaciones, un tumor puede identificarse como tumor PD-L1 negativo sometiendo una muestra de tumor a reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con retrotranscriptasa (RT) cuantitativa, RNA-Seq o micromatriz.

En un aspecto, un uso médico para tratar un tumor PD-L1 negativo en un paciente comprende administrar al paciente aproximadamente 70 mg de una proteína de fusión de ECD de CD80 que comprende un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:5), por ejemplo, una vez cada tres semanas. En un aspecto, un uso médico para tratar un tumor PD-L1 negativo en un paciente comprende administrar al paciente aproximadamente 42 mg de una proteína de fusión de ECD de CD80 que comprende un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:5), por ejemplo, una vez cada tres semanas. En un aspecto, un uso médico para tratar un tumor PD-L1 negativo en un paciente comprende administrar al paciente aproximadamente 21 mg de una proteína de fusión de ECD de CD80 que comprende un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana

En determinados casos, el tumor PD-L1 negativo es un melanoma.

En determinados casos, el tumor PD-L1 negativo es un cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer pulmonar no microcítico, cáncer pulmonar microcítico, melanoma, carcinoma escamocelular de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer pancreático, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, cáncer de vejiga o cáncer endometrial.

El paciente a tratar de acuerdo con los usos médicos proporcionados en este documento puede haber recibido tratamiento previo con al menos un antagonista de PD-1/PD-L1 seleccionado de un antagonista de PD-1 y un antagonista de PD-L1. El antagonista de PD-1/PD-L1 puede ser, por ejemplo, nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab, durvalumab o avelumab. El antagonista de PD-1/PDL-1 puede haberse administrado en un entorno avanzado o metastásico. En algunas realizaciones, el tumor es insensible a dicho tratamiento o recidivante durante o después de dicho tratamiento. En otros casos, el paciente a tratar de acuerdo con los usos médicos proporcionados en este documento no ha recibido tratamiento previo con un antagonista de PD-1/PDL-1.

El paciente a tratar de acuerdo con los usos médicos proporcionados en este documento puede haber recibido tratamiento previo con un agente antiangiogénico. El agente antiangiogénico puede ser, por ejemplo, sunitinib, sorafenib, pazopanib, axitinib, tivozanib, ramucirumab o bevacizumab. El agente antiangiogénico puede haberse administrado en un entorno avanzado o metastásico.

El paciente a tratar de acuerdo con los usos médicos proporcionados en este documento, por ejemplo, un paciente con un melanoma, puede tener una mutación BRAF. El paciente puede haber recibido tratamiento previo con un inhibidor de BRAF. El inhibidor de BRAF puede ser, por ejemplo, vemurafenib y dabrafenib. El inhibidor de BRAF puede haberse administrado en un entorno avanzado o metastásico.

El tumor a tratar de acuerdo con los usos médicos proporcionados en este documento puede ser recidivante o progresivo después de un tratamiento seleccionado de cirugía, quimioterapia, radioterapia y una combinación de los mismos.

El tumor a tratar de acuerdo con los usos médicos proporcionados en este documento puede ser resistente o insensible a un antagonista de PD-1/PD-L1, tal como nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab, durvalumab o avelumab. El tumor a tratar de acuerdo con los usos médicos proporcionados en este documento puede ser resistente o insensible a un agente antiangiogénico, tal como sunitinib, sorafenib, pazopanib, axitinib, tivozanib, ramucirumab o bevacizumab. El tumor a tratar de acuerdo con los usos médicos proporcionados en este documento puede ser resistente o insensible a un inhibidor de BRAF, tal como vemurafenib o dabrafenib.

El tumor a tratar de acuerdo con los usos médicos proporcionados en este documento puede ser refractario a un antagonista de PD-1/PD-L1, tal como nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab, durvalumab o avelumab. El tumor a tratar de acuerdo con los usos médicos proporcionados en este documento puede ser refractario a un agente antiangiogénico, tal como sunitinib, sorafenib, pazopanib, axitinib, tivozanib, ramucirumab o bevacizumab. El tumor a tratar de acuerdo con los usos médicos proporcionados en este documento puede ser refractario a un inhibidor de BRAF, tal como vemurafenib o dabrafenib.

El tumor a tratar de acuerdo con los usos médicos proporcionados en este documento puede ser recidivante después de tratamiento con un antagonista de PD-1/PD-L1, tal como nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab, durvalumab o avelumab. El tumor a tratar de acuerdo con los usos médicos proporcionados en este documento puede ser recidivante después de tratamiento con un agente antiangiogénico, tal como sunitinib, sorafenib, pazopanib, axitinib, tivozanib, ramucirumab o bevacizumab. El tumor a tratar de acuerdo con los usos médicos proporcionados en este documento puede ser recidivante después de tratamiento con un inhibidor de BRAF, tal como vemurafenib o dabrafenib.

Ejemplos

Los ejemplos analizados a continuación están destinados a ser simplemente ejemplares de la invención y no debe considerarse que limiten las reivindicaciones.

No se pretende que los ejemplos representen que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos por garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero deben tenerse en cuenta algunos errores experimentales y desviaciones. Salvo que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura es en grados Celsius y la presión no está en o cerca de la atmosférica.

Ejemplo 1: Moléculas de fusión de ECD de CD80 murina (mCD80-Fc) no acoplan con PD-L1

Se usaron esplenocitos murinos adultos de las cepas BALB/c y C57Bl/6 para determinar si una proteína de fusión equivalente de ratón que comprende el dominio extracelular (ECD) de CD80 murina ligado al dominio Fc de IgG2a natural de ratón (mCD80-Fc) se acopla a ligandos de CD80.

Los esplenocitos de ratón se prepararon a partir de ratones BALB/c y C56Bl/6 adultos por métodos conocidos por los expertos en la materia. Los esplenocitos ($2-4 \times 10^6$ células/ml) se sedimentaron por centrifugación y se descartó el medio. La mCD80-Fc se añadió a diversas concentraciones (0-1000 µg/ml) y se incubó durante 40 minutos en hielo. Se añadió paraformaldehído (4 %) a los esplenocitos y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los esplenocitos se lavaron y se sedimentaron por centrifugación, seguida de la adición de anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con biotina en tampón FACS e incubación adicional durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se añadió una mezcla de estreptavidina-Alexa488 y anticuerpos dirigidos a CTLA-4, PD-L1 y CD28. Se usaron microesferas Quantum Simply Cellular Bang para desarrollar una curva de patrón para las moléculas mCD80-Fc. Los datos de las muestras se adquirieron en un BD LSRII o BD LSRFortessa y se analizaron usando FlowJo, Excel y Graphpad Prism.

Se realizó análisis FACS para determinar el acoplamiento de mCD80-Fc a células dendríticas CD11b+, células dendríticas CD11b-, macrófagos, linfocitos NK, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+. La figura 1A muestra un ejemplo de la estrategia de sincronización usada en este ejemplo.

La figura 1B demuestra que mCD80-Fc se unía, de una manera dependiente de la concentración, principalmente a linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ en ambos tipos de esplenocitos. Sin embargo, mCD80-Fc no se unía a una proporción mayor de linfocitos T de esplenocitos derivados de BALB/c que los esplenocitos derivados de C57Bl/6. Además, hubo una pequeña proporción de mCD80-Fc que se unía a macrófagos en ambos tipos de esplenocitos. Por tanto, se mostró que mCD80-Fc se unía a linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y macrófagos, pero no se une a células dendríticas CD11b+ o CD11b-.

Se detectó PD-L1 en todos los inmunocitos ensayados, con la expresión más alta en macrófagos. No hubo cambios en la cantidad de PD-L1 libre, incluso con concentraciones crecientes de mCD80-Fc, lo que demuestra que no hay interacción entre mCD80-Fc y PD-L1 (figura 1B).

En contraste, los linfocitos T CD4+ y CD8+ son los únicos inmunocitos evaluados que presentaron expresión de CD28. Con concentraciones crecientes de mCD80-Fc, hubo una disminución significativa en la cantidad de CD28 libre, lo que demuestra que mCD80-Fc se une a CD28 (figura 1B). No se detectó CTLA-4 en ningún tipo de inmunocito evaluado.

Estos resultados demuestran que mCD80-Fc se une principalmente a linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ de esplenocitos de BALB/c y C57Bl/6 mediante acoplamiento de CD28 y no acoplamiento de PD-L1.

Ejemplo 2: Moléculas de fusión de ECD de CD80 humana (hCD80-Fc) no acoplan con PD-L1

Se evaluaron células de ovario de hámster chino ("CHO") para el acoplamiento de hCD80-Fc de ligandos de CD80 humana. Las células CHO se manipularon para que expresaran CTLA-4, PD-L1, CD28 humanos, o los tres ligandos de CD80 (es decir, CHO-CTLA4/PD-L1/CD28; "CHO-3"). El protocolo para determinar el acoplamiento de hCD80-Fc a ligandos es el mismo que se realizó en el ejemplo 1.

La figura 2A muestra la expresión de ligando de CD80 en todas las líneas celulares CHO por citometría de flujo. Se muestran histogramas escalonados representativos y se enumeran los valores de capacidad de unión de anticuerpo (ABC) para determinar el número de sitios de unión de Ab por célula en gráficos de barras a la derecha. La figura 2B muestra hCD80-Fc unida a células CHO-CTLA4, CHO-CD28 y CHO-3 de una manera dependiente de la concentración, con unión de hCD80-Fc a ligandos de CD80 a tan poco como 0,5 µg/ml. Además, la unión de hCD80-Fc a los ligandos CD80 provocó una disminución en CTLA-4 y CD28 libres en las líneas celulares respectivas (figura 2B). Sin embargo, hCD80-Fc no se unió a células CHO-PD-L1 o CHO parentales, lo que demuestra que hCD80-Fc no acopla con PD-L1.

Estos resultados muestran que hCD80-Fc acopla con CTLA-4 y CD28, pero no PD-L1. Con respecto a la línea celular CHO-3, hCD80-Fc se unió tanto a CTLA-4 como a CD28 a niveles similares que en las líneas celulares CHO de expresión individual.

Se evaluaron PBMC humanos para el acoplamiento de hCD80-Fc en linfocitos B (CD19+), monocitos (CD14+), linfocitos NK (CD56+) y linfocitos T (CD3+CD4+ o CD3+CD8+). La figura 3A demuestra una estrategia de sincronización de FACS de ejemplo para este estudio.

Se detectó PD-L1 en linfocitos T y monocitos, pero CD28 se detectó principalmente en linfocitos T CD4+ y CD8+. La figura 3B muestra que hCD80-Fc se unía, de una manera dependiente de la concentración, tanto a linfocitos T CD4+ como a CD8+, con detección significativa de fármaco unido a concentraciones tan bajas como 100 µg/ml. La unión de hCD80-Fc reveló una disminución en CD28 libre en linfocitos T CD4+ y CD8+, pero no se detectaron cambios en los niveles de PD-L1 en linfocitos T o monocitos. No se detectó CTLA-4 en ningún tipo de inmunocito evaluado. Por tanto, estos resultados demuestran que hCD80-Fc se une principalmente a linfocitos T CD4+ y CD8+ de PBMC humanos a través de acoplamiento de CD28.

Se evaluaron CD4+Teff y CD4+Treg expandidos *in vitro* humanos para el acoplamiento de hCD80-Fc de CTLA-4, PD-

L1 y CD28. Se ha mostrado que CD4+Teff y CD4+Treg expandidos *in vitro* humanos expresan CTLA-4, PD-L1 y CD28 (figura 4A). hCD80-Fc se unió tanto a CD4+Teff como a Treg de una manera dependiente de la concentración, detectándose la unión de hCD80-Fc a tan poco como 50 µg/ml y con unión saturante a aproximadamente 400 µg/ml (figura 4B). Esta unión provocó una disminución de tendencia en CTLA-4 libre en CD4+Treg solamente, mientras se detectó una disminución de CD28 libre en linfocitos CD4+Teff y Treg (figura 4B). Los niveles de PD-L1 libre no cambiaron incluso con exposición a concentraciones crecientes de hCD80-Fc (figura 4B). Estos datos demuestran que hCD80-Fc acopla tanto con CTLA-4 como con CD28 en linfocitos CD4+Teff y CD4+Treg.

Ejemplo 3: mCD80-Fc inhibe el crecimiento de tumores que no expresan PD-L1 en un modelo de ratón singénico CT26

Los datos de los ejemplos 1 y 2 demuestran que CD80 no acopla con PD-L1. Por tanto, para determinar si el acoplamiento de PD-L1 es necesario para que mCD80-Fc ejerza su actividad antitumoral, se usaron células tumorales con inactivación de PD-L1 CT26 en un modelo de ratón singénico *in vivo*. A diferencia de los modelos de xenoinjerto, los modelos de ratón singénicos poseen un sistema inmunitario funcional y, por lo tanto, son útiles en la evaluación de inmunoterapias contra el cáncer, que funcionan potenciando la respuesta inmunitaria endógena. CT26 es un carcinoma colorrectal murino derivado de ratones BALB/c que expresa niveles elevados de PD-L1. En este estudio, se usó un tumor CT26 genomanipulado (CT26 PD-L1 KO) que no expresa PD-L1. Se inocularon ratones BALB/c inmunocompetentes con células tumorales CT26 PD-L1 KO. Los ratones se pusieron en tres grupos para tratamiento con lo siguiente: (1) IgG2a de ratón (control); (2) mCD80-Fc; o (3) control sin tratar. Los ratones se trataron con 0,3 mg/kg de IgG2a de ratón (grupo 1) o 0,3 mg/kg de mCD80-Fc (grupo 2) en los días 4, 7 y 11 (días después de la inoculación) por inyección intravenosa. Véase la tabla 1. El promedio del tamaño del tumor cuando el tratamiento comenzó era de 90 mm³. El estudio concluyó en el día 21.

Tabla 1

Grupo	Tratamiento	Dosificación (mg/kg, pauta, vía)	Ratones (n)
1	IgG2a de ratón	0,3 mg/kg en D4, D7, D11 200 µl IV	15
2	mCD80-Fc	0,3 mg/kg en D4, D7, D11 200 µl IV	15
3	n/a	n/a	15

La figura 5 muestra que el promedio del volumen del tumor aumentaba en los grupos de mIgG2a y de control sin tratar, pero el grupo de mCD80-Fc mostró inhibición significativa del crecimiento del tumor ($p = 0,0004$ sobre IgG2a de ratón de control; $p < 0,0001$ sobre grupo sin tratar). Además, no se detectaron efectos adversos del tratamiento con mIgG2a o mCD80-Fc, incluyendo cambios en el peso corporal (datos no mostrados). Estos datos proporcionan una demostración *in vivo* de que el tratamiento con mCD80-Fc sorprendentemente no es dependiente de la expresión de PD-L1 en células tumorales.

Tabla de secuencias

La tabla a continuación proporciona una lista de determinadas secuencias mencionadas en este documento.

SEQ. ID. NO.	Descripción	Secuencia
1	Secuencia de ECD de CD80 humana (sin secuencia señal)	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSV EELAQTRIYWQ KEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLS IVILALRPSDEGTYESCVVLKYEKDAFKREHLAEV TLSVKADFEPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPH LSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDF NMTTNHSFMCLIKYGHILRVNQTFNWNNTTKQEH FPDN
2	Secuencia de ECD de CD80 de ratón (sin secuencia señal)	VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYW QKHKDKVLSVIAGKLKVWPEYKNRTLYDNTTY SLIILGLVLSDRGTYSCVVQKKERGTYEVKHLAL VKLSIKADFSTPNITESGNPSADTKRITCFASGGFP KPRFSWLENGRELPGINTTISQDPESELYTISSQLD FNTTRNHTIKCLIKYGDAHVSEDFTWKPPEDPP DSKN
3	Fc de IgG1 humana	

		EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
4	ECD de CD80 de ratón con Fc de IgG2a de ratón (parte Fc subrayada)	VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYW QKHDKVVLVSIAGKLKVWPEYKNRTLYDNTTY SLIILGLVLSDRGTYSVVQKKERGTYEVKHLAL VKLSIKADFSTPNITESGNPSADTKRITCFASGGFP KPRFSWLENGRELPGINTTISQDPESELYTISSQLD FNTTRNHTIKCLIKYGDAHVSEDFTWEKPPEDPP DSKNEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPK <u>IKDVLMI</u> <u>SLSPIVTCVVDVSEDDPDVQISW</u> <u>FEVN</u> <u>NVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH</u> <u>QDW</u> <u>MSGKEFKCKVNNKDL</u> <u>PAPIERTISKPKGSVRAPQ</u> <u>VYVLPPPEEEMTKQVTLTCMVTDFMPEDIYVE</u> <u>WTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRV</u> <u>EKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTP</u> <u>GK</u>
5	ECD de CD80 humana con Fc de IgG1 humana WT (parte Fc subrayada)	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVVEELAQTRIYWQ KEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNLS IVILALRPSDEGTYESVVLKYEKDAFKREHLAEV TLSVKADEPTPSISDFEIPSTNIRRIICSTSGGFPEPH LSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDF NMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTFNWNNTTKQEH FPDNEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP <u>GK</u>
6	PD-L1 humano (maduro, sin secuencia señal)	FT VTPKDIYVV FYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNHQQFVIIG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPVISE HELLTCQAEGY PKAEVIWISS DHQVLSGKTT TTNKSKREEKL ENVISTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAEIPIELP LAIPPNERTH LVILGAILLC LGVAITFIFR LRKGRMMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende moléculas de fusión de dominio extracelular (ECD) de CD80 para su uso en el tratamiento de un tumor PD-L1 negativo en un sujeto, en donde las moléculas de fusión de ECD de CD80 comprenden un ECD de CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana.
2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde el tumor es un tumor sólido.
3. La composición para el uso de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde el sujeto está afectado con cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer pulmonar no microcítico, melanoma, carcinoma escamocelular de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer pancreático, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, cáncer de vejiga o cáncer endometrial.
4. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el sujeto está afectado con un cáncer que es recidivante o progresivo después de cirugía, quimioterapia, radioterapia o una combinación de las mismas.
5. a composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la composición comprende moléculas de fusión de ECD de CD80 sialiladas.
6. La composición para el uso de la reivindicación 5, en donde las moléculas de fusión de ECD de CD80 sialiladas comprenden 15-30 moles de ácido siálico (SA) por mol de proteína de fusión.
7. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el dominio Fc de IgG1 humana está ligado al extremo carboxílico del ECD de CD80 humana.
8. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde las moléculas de fusión de ECD de CD80 comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5.
9. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el tratamiento comprende la administración de 0,07 mg a 70 mg de las moléculas de fusión de ECD de CD80.
10. La composición para el uso de la reivindicación 9, en donde el tratamiento comprende la administración de 0,07 mg, 0,21 mg, 0,7 mg, 2,1 mg, 7 mg, 21 mg, 42 mg o 70 mg de las moléculas de fusión de ECD de CD80.
11. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el tratamiento comprende la administración de la composición una vez cada tres semanas.
12. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el sujeto no ha recibido tratamiento previo con un antagonista de PD-1/PD-L1.
13. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el sujeto ha recibido tratamiento previo con al menos un agente antiangiogénico, opcionalmente en donde el agente antiangiogénico es sunitinib, sorafenib, pazopanib, axitinib, tivozanib, ramucirumab o bevacizumab.
14. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el sujeto está afectado con un melanoma que tiene una mutación BRAF y ha recibido tratamiento previo con al menos un inhibidor de BRAF, opcionalmente en donde el inhibidor de BRAF es vemurafenib o dabrafenib.
15. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o 7-14, que comprende de 0,07 mg a 70 mg de moléculas de fusión de dominio extracelular (ECD) de CD80, que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5, opcionalmente en donde las moléculas de fusión de ECD de CD80 comprenden 15-60 moles de ácido siálico (SA) por mol de proteína de fusión.

Figura 1A

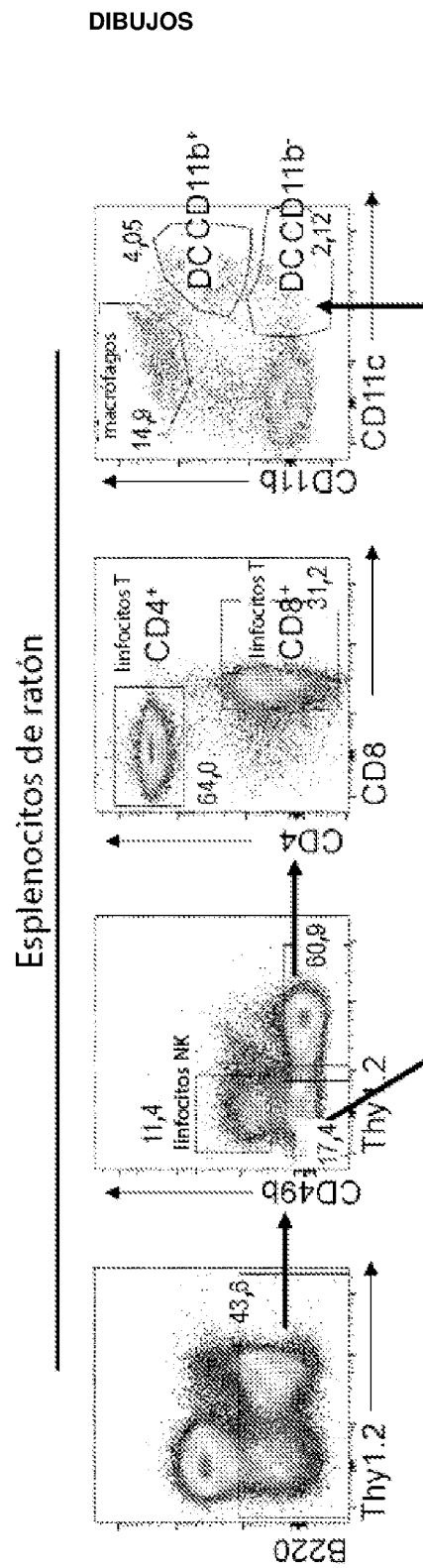


Figura 1B

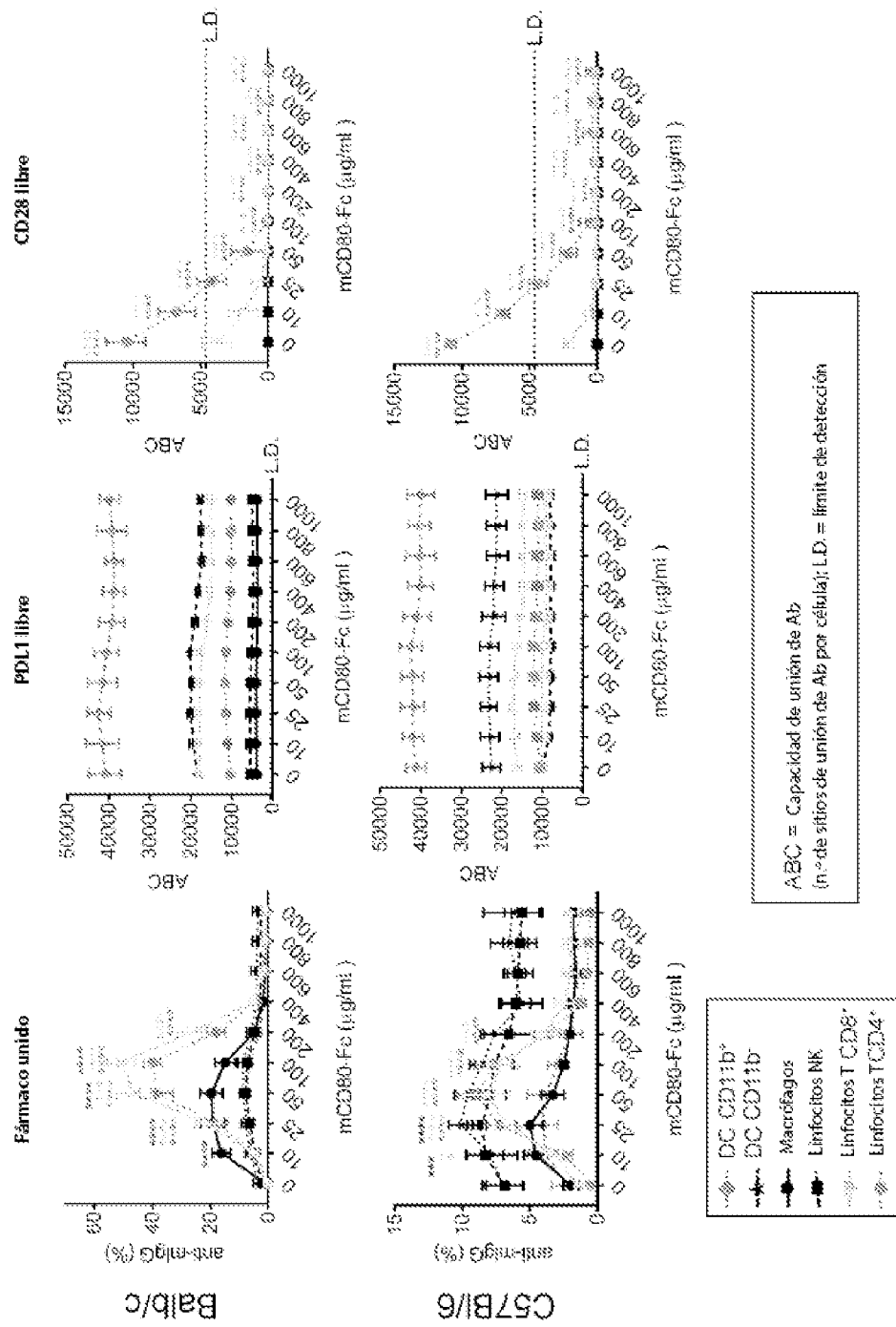


Figura 2A

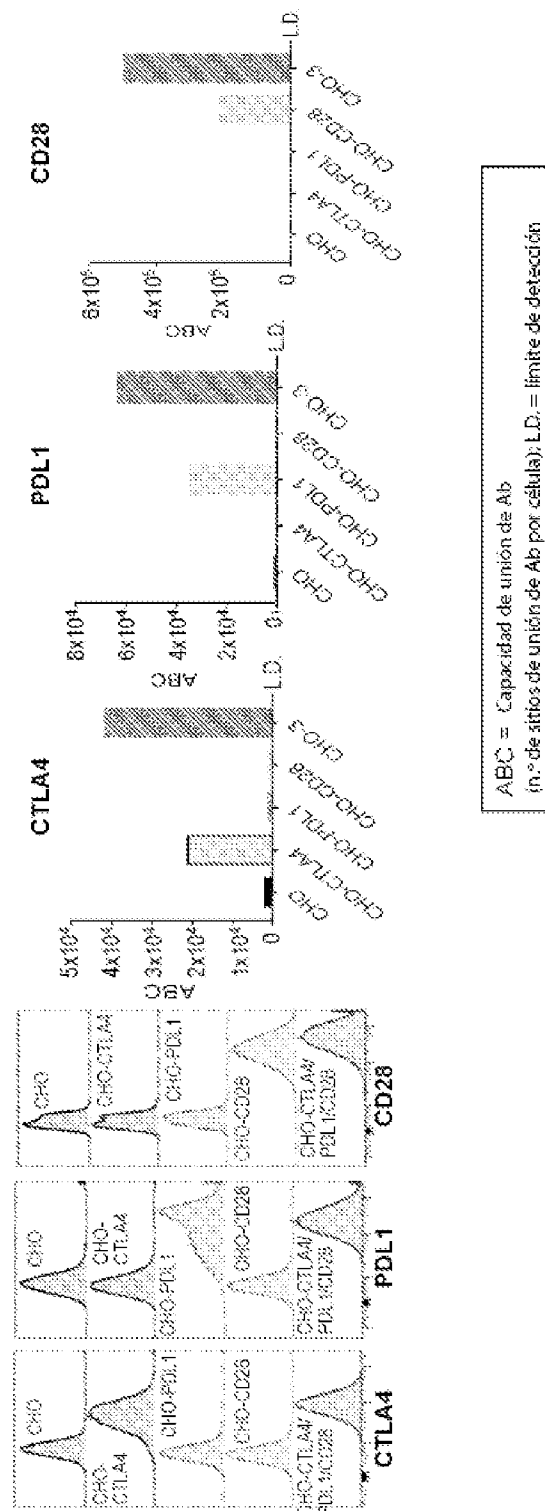


Figura 28

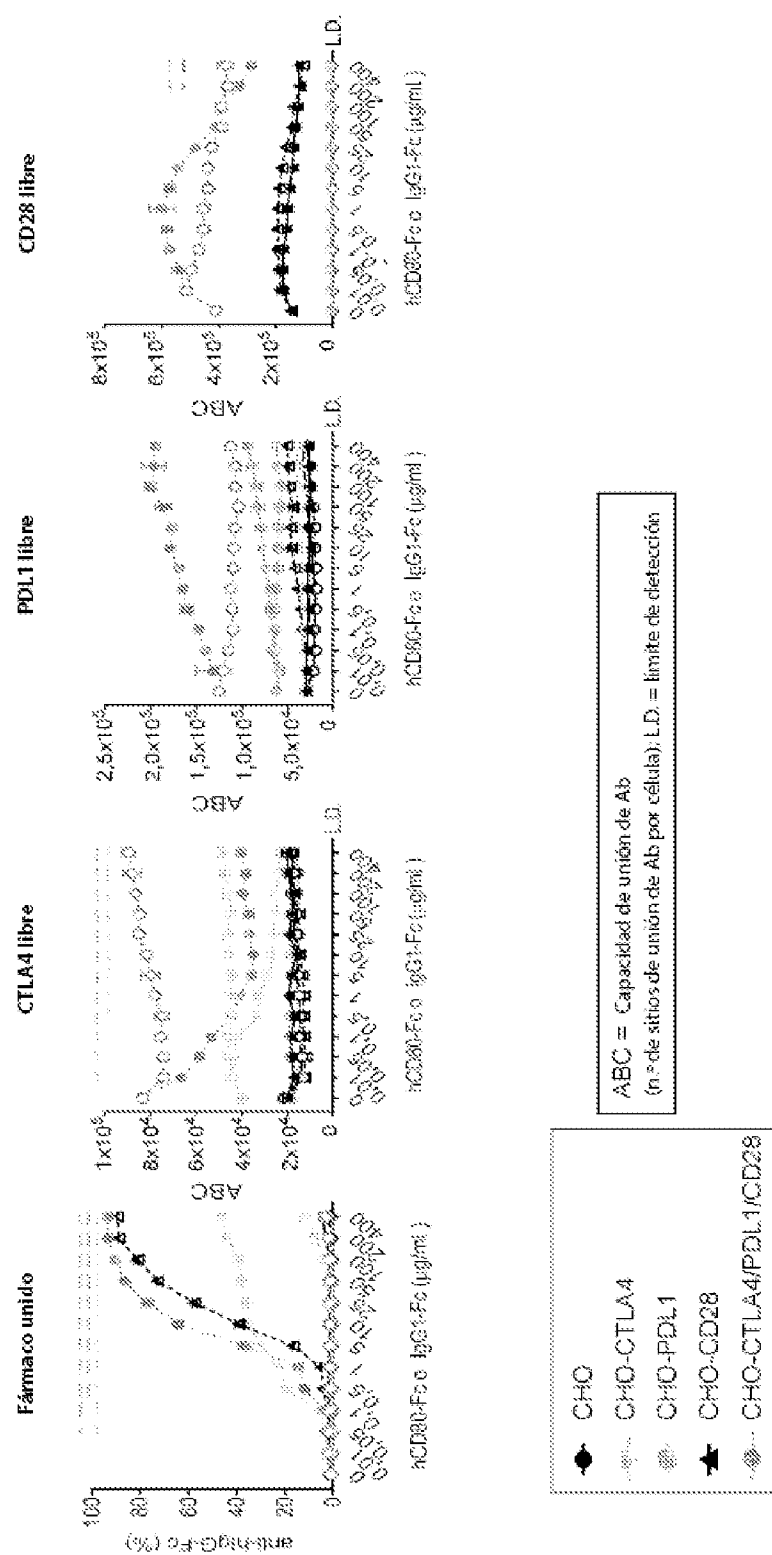


Figura 3A

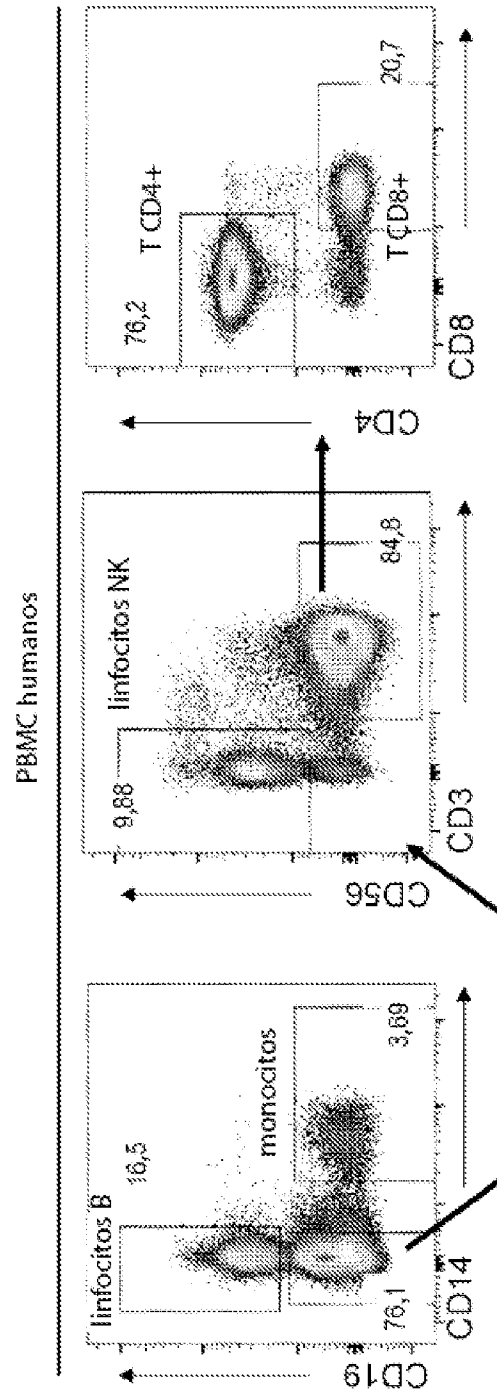


Figura 3B

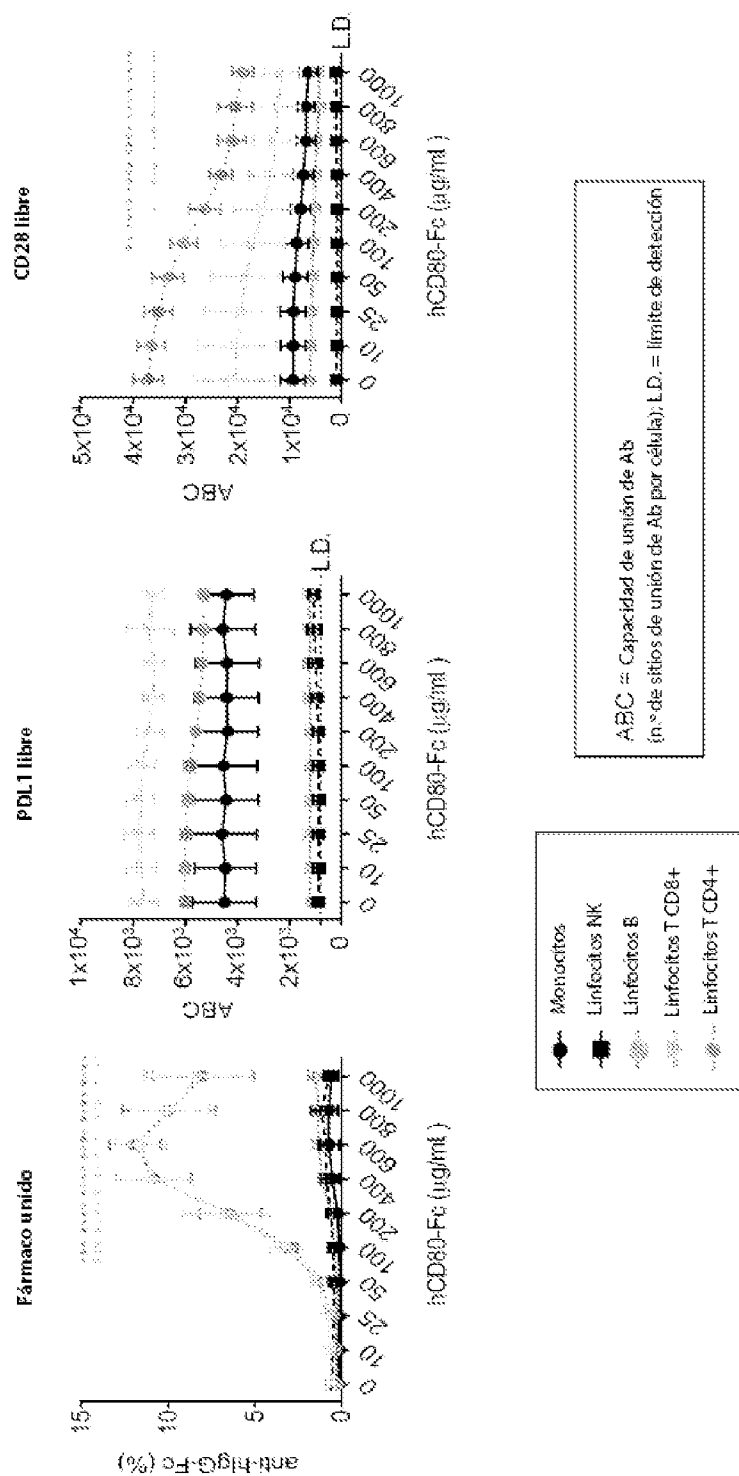


Figura 4A

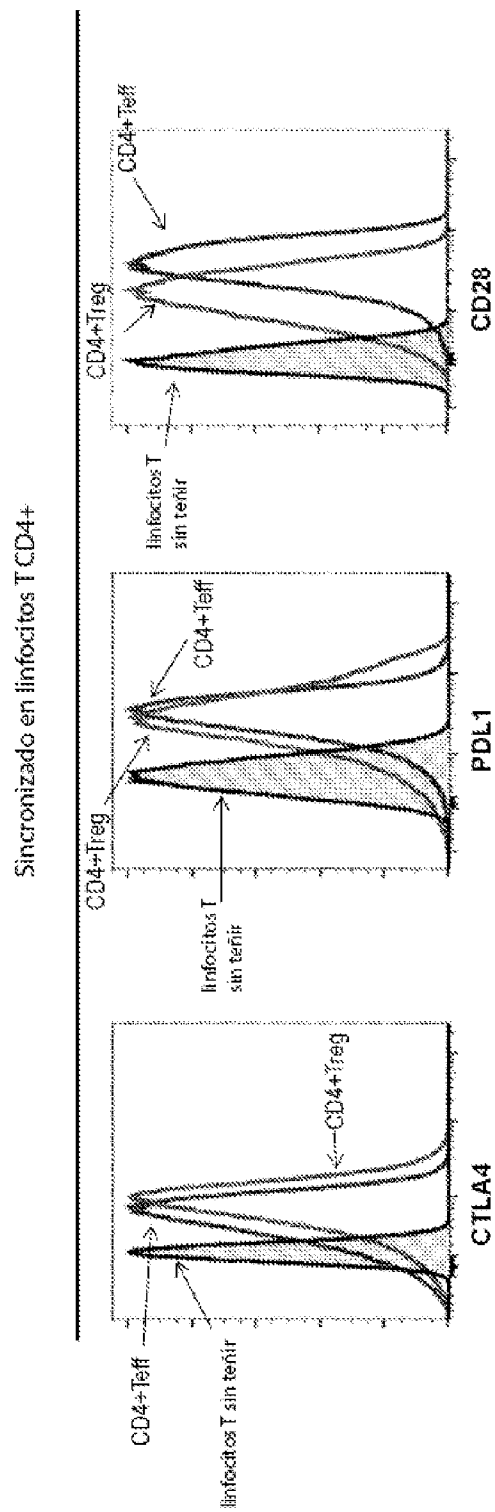


Figura 4B

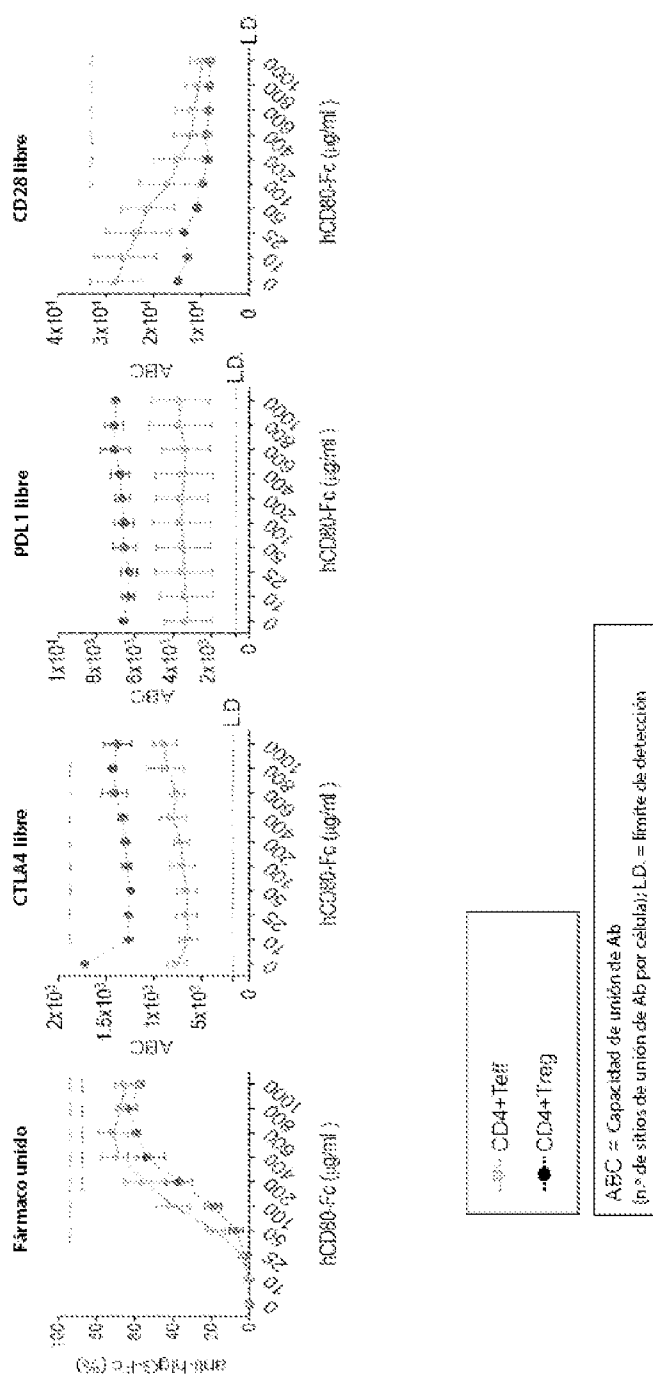


Figura 5

