

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 992 668**

51 Int. Cl.:

C07K 14/71 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2015** **E 21165709 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2024** **EP 3889172**

54 Título: **Inhibición dirigida de TGF Beta**

30 Prioridad:

10.02.2014 US 201461938048 P

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

16.12.2024

73 Titular/es:

MERCK PATENT GMBH (100.0%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE

72 Inventor/es:

LO, KIN-MING

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 992 668 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

Inhibición dirigida de TGF Beta

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a moléculas bifuncionales que incluyen (a) un TGFβRII o un fragmento del mismo capaz de unirse al TGFβ y (b) un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une al ligando 1 de muerte programada (PD-L1), a los usos de dichas moléculas (por ejemplo, para tratar el cáncer) y a los métodos para fabricar dichas moléculas.

Antecedentes

En el tratamiento del cáncer, se ha reconocido desde hace mucho tiempo que la quimioterapia se asocia con una alta toxicidad y puede conducir a la aparición de variantes de células cancerosas resistentes. Incluso con la terapia dirigida contra oncoproteínas sobreexpresadas o activadas importantes para la supervivencia y el crecimiento del tumor, las células cancerosas invariablemente mutan y se adaptan para reducir la dependencia de la vía dirigida, tal como mediante la utilización de una vía redundante. La inmunoterapia contra el cáncer es un nuevo paradigma en el tratamiento del cáncer que, en lugar de dirigirse a las células cancerosas, se centra en la activación del sistema inmunitario. Su principio es rearmar la respuesta inmunitaria del hospedador, especialmente la respuesta adaptativa de los linfocitos T, para proporcionar vigilancia inmunitaria para destruir a las células cancerosas, en particular, la enfermedad mínima residual que ha escapado a otras formas de tratamiento, logrando así una inmunidad protectora duradera.

La aprobación de la FDA del anticuerpo anti-CTLA-4 ipilimumab para el tratamiento del melanoma en 2011 marcó el comienzo de una nueva era de inmunoterapia contra el cáncer. La demostración de que la terapia anti-PD-1 o anti-PD-L1 indujo respuestas duraderas en el melanoma, el riñón y el cáncer de pulmón en ensayos clínicos significa aún más su mayoría de edad (Pardoll, D.M., Nat Immunol. 2012; 13:1129-32). Sin embargo, la terapia con ipilimumab está limitada por su perfil de toxicidad, presumiblemente porque el tratamiento anti-CTLA-4, interfiriendo con el punto de control inhibitor de linfocitos T primarios, puede conducir a la generación de nuevos linfocitos T autorreactivos. Si bien la inhibición de la interacción PD-L1/PD-1 da como resultado la desinhibición de las respuestas inmunitarias crónicas existentes en los linfocitos T agotados que son en su mayoría de naturaleza antivírica o anticancerígena (Wherry, E. J., Nat Immunol. 2011; 12:492-9), la terapia anti-PD-1, no obstante, a veces puede dar como resultado eventos adversos autoinmunes relacionados con los pulmones potencialmente letales. A pesar de las prometedoras actividades clínicas de anti-PD1 y anti-PD-L1 hasta ahora, aumentar el índice terapéutico, ya sea aumentando la actividad terapéutica o disminuyendo la toxicidad, o ambos, sigue siendo un objetivo central en el desarrollo de agentes inmunoterapéuticos.

El documento WO2011/109789 desvela composiciones y métodos para anticuerpos inmunomoduladores dirigidos y proteínas de fusión.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de que una proteína bifuncional que contiene al menos una porción del Receptor II del TGFβ (TGFβRII) que es capaz de unir TGFβ y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une a la proteína humana de ligando de muerte programada 1 (PD-L1) puede ser un agente terapéutico eficaz contra el tumor y el cáncer. La proteína puede presentar un efecto sinérgico en el tratamiento del cáncer, en comparación con el efecto de administrar los dos agentes por separado. La invención se define mediante las reivindicaciones.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención presenta una proteína que incluye (a) TGFβRII humano, o un fragmento del mismo capaz de unirse a TGFβ (por ejemplo, un fragmento soluble); y (b) un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une al PD-L1 y comprende: (i) una región variable de cadena pesada que incluye un HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SYIMM, SIYPSGGITFYADTVKG e IKLGTVTVDY, respectivamente, y (ii) una región variable de cadena ligera que incluye un HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que tiene las secuencias de aminoácidos de TGTSSDVGGYNYVS, DVSNRPS y SSYTSSSTRV, respectivamente.

En un aspecto relacionado, la invención presenta un polipéptido que incluye (a) al menos un dominio variable de una cadena pesada de un anticuerpo que se une a PD-L1 (por ejemplo, los aminoácidos 1-120 del SEQ ID NO:2); y (b) TGFβRII humano, o un fragmento soluble del mismo capaz de unirse a TGFβ (por ejemplo, un dominio extracelular (DEC) de TGFβRII humano, los aminoácidos 24-159 del SEQ ID NO: 9, o cualquiera de los descritos en el presente documento). El polipéptido puede incluir además un enlazador de aminoácidos que conecta el extremo C-terminal del dominio variable al extremo N-terminal del TGFβRII humano o un fragmento soluble del mismo capaz de unirse al TGFβ. El polipéptido puede incluir la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 3 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica al SEQ ID NO: 3. El fragmento de inmunoglobulina puede ser un fragmento scFv, Fab, F(ab')₂

o Fv.

En ciertas realizaciones, la proteína o el polipéptido incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que incluye el SEQ ID NO: 2 y TGFβRII humano. El anticuerpo puede incluir opcionalmente una región constante modificada (por ejemplo, incluyendo una sustitución de Lys → Ala en C-terminal, una mutación de la secuencia Leu-Ser-Leu-Ser (SEQ ID NO: 19) a Ala-Thr-Ala-Thr (SEQ ID NO: 20), o una región constante híbrida que incluye una región de bisagra de IgG1 y un dominio CH2 de IgG2).

En ciertas realizaciones, la proteína o polipéptido incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que incluye el SEQ ID NO: 2 y un fragmento de TGFβRII humano capaz de unirse a TGFβ (por ejemplo, un fragmento soluble). El anticuerpo puede incluir opcionalmente una región constante modificada (por ejemplo, incluyendo una sustitución Lys → Ala en C-terminal, una mutación de la secuencia Leu-Ser-Leu-Ser (SEQ ID NO: 19) a Ala-Thr-Ala-Thr (SEQ ID NO: 20), o una región constante híbrida que incluye una región de bisagra de IgG1 y un dominio CH2 de IgG2).

En ciertas realizaciones, la proteína o el polipéptido incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que incluye el SEQ ID NO: 2 y un DEC de TGFβRII humano. El anticuerpo puede incluir una región constante modificada (por ejemplo, incluyendo una sustitución Lys → Ala en C-terminal, una mutación de la secuencia Leu-Ser-Leu-Ser (SEQ ID NO: 19) a Ala-Thr-Ala-Thr (SEQ ID NO: 20), o una región constante híbrida que incluye una región de bisagra de IgG1 y un dominio CH2 de IgG2).

En ciertas realizaciones, la proteína o el polipéptido incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que incluye los aminoácidos 1-120 del SEQ ID NO: 2 y TGFβRII humano. El anticuerpo puede incluir una región constante modificada (por ejemplo, incluyendo una sustitución Lys → Ala en C-terminal, una mutación de la secuencia Leu-Ser-Leu-Ser (SEQ ID NO: 19) a Ala-Thr-Ala-Thr (SEQ ID NO: 20), o una región constante híbrida que incluye una región de bisagra de IgG1 y un dominio CH2 de IgG2).

En ciertas realizaciones, la proteína o polipéptido incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que incluye los aminoácidos 1-120 del SEQ ID NO: 2 y un fragmento de TGFβRII humano capaz de unirse a TGFβ (por ejemplo, un fragmento soluble). El anticuerpo puede incluir una región constante modificada (por ejemplo, incluyendo una sustitución Lys → Ala en C-terminal, una mutación de la secuencia Leu-Ser-Leu-Ser (SEQ ID NO: 19) a Ala-Thr-Ala-Thr (SEQ ID NO: 20), o una región constante híbrida que incluye una región de bisagra de IgG1 y un dominio CH2 de IgG2).

En ciertas realizaciones, la proteína o el polipéptido incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que incluye los aminoácidos 1-120 del SEQ ID NO: 2 y un DEC de TGFβRII humano. El anticuerpo puede incluir una región constante modificada (por ejemplo, incluyendo una sustitución Lys → Ala en C-terminal, una mutación de la secuencia Leu-Ser-Leu-Ser (SEQ ID NO: 19) a Ala-Thr-Ala-Thr (SEQ ID NO: 20), o una región constante híbrida que incluye una región de bisagra de IgG1 y un dominio CH2 de IgG2).

En ciertas realizaciones, la proteína o el polipéptido incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que incluye las regiones hipervariables presentes en el SEQ ID NO: 2 y TGFβRII humano. El anticuerpo puede incluir una región constante modificada (por ejemplo, incluyendo una sustitución Lys → Ala en C-terminal, una mutación de la secuencia Leu-Ser-Leu-Ser (SEQ ID NO: 19) a Ala-Thr-Ala-Thr (SEQ ID NO: 20), o una región constante híbrida que incluye una región de bisagra de IgG1 y un dominio CH2 de IgG2).

En ciertas realizaciones, la proteína o polipéptido incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que incluye las regiones hipervariables presentes en el SEQ ID NO: 2 y un fragmento de TGFβRII humano capaz de unirse a TGFβ (por ejemplo, un fragmento soluble). El anticuerpo puede incluir una región constante modificada (por ejemplo, incluyendo una sustitución Lys → Ala en C-terminal, una mutación de la secuencia Leu-Ser-Leu-Ser (SEQ ID NO: 19) a Ala-Thr-Ala-Thr (SEQ ID NO: 20), o una región constante híbrida que incluye una región de bisagra de IgG1 y un dominio CH2 de IgG2).

En ciertas realizaciones, la proteína o el polipéptido incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que incluye las regiones hipervariables presentes en el SEQ ID NO: 2 y un DEC de TGFβRII humano. El anticuerpo puede incluir una región constante modificada (por ejemplo, incluyendo una sustitución Lys → Ala en C-terminal, una mutación de la secuencia Leu-Ser-Leu-Ser (SEQ ID NO: 19) a Ala-Thr-Ala-Thr (SEQ ID NO: 20), o una región constante híbrida que incluye una región de bisagra de IgG1 y un dominio CH2 de IgG2).

La invención también presenta un ácido nucleico que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido descrito anteriormente (por ejemplo, TGFβRII humano o un fragmento del mismo y un dominio variable de una cadena pesada de un anticuerpo que, cuando se combina con el polipéptido, forma un sitio de unión a antígeno que se une a PD-L1). En ciertas realizaciones, el ácido nucleico incluye además una segunda secuencia de nucleótidos que codifica al menos un dominio variable de una cadena ligera de un anticuerpo que, cuando se combina con el polipéptido, forma un sitio de unión a antígeno que se une a PD-L1 (por ejemplo, que incluye los aminoácidos 1-110 del SEQ ID NO: 1). La segunda secuencia de nucleótidos puede codificar la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 (cadena ligera

lambda anti-PD-L1 secretada) o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica al SEQ ID NO: 1.

La invención también presenta una célula que comprende en los mismos o diferentes ácidos nucleicos una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende (a) al menos un dominio variable de una cadena pesada de un anticuerpo que se une a PD-L1 humano; y (b) TGFβRII humano, o un fragmento soluble del mismo capaz de unirse a TGFβ, en donde el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo incluye un HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SYIMM, SIYPSGGITFYADTVKG e IKLGTVTVDY, respectivamente; y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica al menos un dominio variable de una cadena ligera de un anticuerpo que, cuando se combina con el polipéptido, forma un sitio de unión a antígeno que se une al PD-L1, en donde el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo incluye un HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que tiene las secuencias de aminoácidos de TGTSSDVGGYNYVS, DVSNRPS y SSYTSSSTRV, respectivamente.

La invención también presenta un método para producir una proteína que incluye (a) el dominio extracelular del TGFβRII humano, o un fragmento del mismo capaz de unirse al TGFβ (por ejemplo, un fragmento soluble), y (b) un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a PD-L1 humano y comprende: (i) una región variable de cadena pesada que incluye un HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SYIMM, SIYPSGGITFYADTVKG e IKLGTVTVDY, respectivamente, y (ii) una región variable de una cadena ligera que incluye un HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que tiene las secuencias de aminoácidos de TGTSSDVGGYNYVS, DVSNRPS y SSYTSSSTRV, respectivamente. El método incluye mantener una célula descrita en condiciones que permitan la expresión de la proteína. El método puede incluir además recolectar la proteína.

Se desvelan en el presente documento proteínas que incluyen el polipéptido descrito anteriormente y al menos un dominio variable de una cadena ligera de un anticuerpo que, cuando se combina con el polipéptido, forma un sitio de unión a antígeno que se une a PD-L1. La proteína puede incluir (a) dos polipéptidos, cada uno con una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 3, y (b) dos polipéptidos adicionales, cada uno con una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1.

La invención también presenta una proteína que incluye (a) TGFβRII humano, o un fragmento del mismo capaz de unirse a TGFβ (por ejemplo, un fragmento soluble); y (b) un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a PD-L1 y comprende: (i) una región variable de cadena pesada que incluye un HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SYIMM, SIYPSGGITFYADTVKG e IKLGTVTVDY, respectivamente, y (ii) una región variable de una cadena ligera que incluye un HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que tiene las secuencias de aminoácidos de TGTSSDVGGYNYVS, DVSNRPS y SSYTSSSTRV, respectivamente; para usar en métodos de inhibición del crecimiento tumoral en un paciente y/o para usar en métodos de tratamiento del cáncer en un paciente, comprendiendo dichos métodos administrar la proteína al paciente. Los métodos pueden incluir además la administración de radiación o la administración de un agente quimioterapéutico, biológico o una vacuna.

También se desvelan en el presente documento proteínas para su uso en la promoción del agotamiento local de TGFβ en un tumor, o para su uso en la inhibición de la fosforilación de SMAD3 en una célula (por ejemplo, una célula tumoral o una célula inmunitaria). También se desvelan métodos para promover el agotamiento local de TGFβ, comprendiendo dichos métodos administrar una proteína descrita anteriormente, en donde la proteína se une al TGFβ en solución, se une a PD-L1 en la superficie celular y transporta el TGFβ unido al interior de la célula (por ejemplo, una célula cancerosa). De manera similar, se desvelan en el presente documento métodos para inhibir la fosforilación de SMAD3 en una célula (por ejemplo, una célula cancerosa o una célula inmunitaria), que comprenden exponer una célula en el microambiente tumoral a una proteína descrita anteriormente.

El cáncer o el tumor se pueden seleccionar del grupo que consiste en colorrectal, de mama, de ovario, de páncreas, gástrico, de próstata, riñón, de cuello del útero, mieloma, linfoma, leucemia, de tiroides, endometrial, de útero, de vejiga, neuroendocrino, de cabeza y cuello, de hígado, nasofaríngeo, testicular, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, melanoma, cáncer de piel de células basales, cáncer de piel de células escamosas, dermatofibrosarcoma protuberante, carcinoma de células de Merkel, glioblastoma, glioma, sarcoma, mesotelioma y síndromes mielodisplásicos.

Todas las referencias en la siguiente descripción a métodos de tratamiento se realizan solo para facilitar la divulgación de compuestos, composiciones farmacéuticas y/o medicamentos de la invención, para usar en métodos de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia. La invención está definida por las reivindicaciones.

La expresión "TGFβRII" o "receptor de TGFβ II" significa un polipéptido que tiene la secuencia de la isoforma A de tipo 2 del receptor de TGFβ humano de tipo silvestre (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la secuencia de referencia del NCBI (RefSeq) de n.º de registro NP_001020018 (SEQ ID NO: 8)), o un polipéptido que tiene la secuencia de isoforma B del receptor de TGFβ de tipo 2 humano de tipo silvestre (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de NCBI RefSeq n.º de registro NP_003233 (SEQ ID NO: 9)) o que tiene una secuencia sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 8 o del SEQ ID NO: 9. El TGFβRII puede conservar al menos un 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 %, 25 %, 35 %, 50 %, 75 %, 90 %, 95 % o 99 % de la actividad de unión a TGFβ de la secuencia de tipo silvestre. El polipéptido del TGFβRII expresado carece de la secuencia señal.

La expresión "fragmento de TGFβRII capaz de unirse a TGFβ" significa cualquier porción de la RefSeq del NCBI de N.º de registro NP_001020018 (SEQ ID NO: 8) o de la RefSeq del NCBI de N.º de registro NP_003233 (SEQ ID NO: 9), o una secuencia sustancialmente idéntica al SEQ ID NO: 8 o el SEQ ID NO: 9 que es de al menos 20 (por ejemplo, al menos 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 175 o 200) aminoácidos de longitud que conserva al menos parte de la actividad de unión de TGFβ (por ejemplo, al menos el 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 %, 25 %, 35 %, 50 %, 75 %, 90 %, 95 % o el 99 %) del receptor de tipo silvestre o del fragmento de tipo silvestre correspondiente. Normalmente, tal fragmento es un fragmento soluble. Un ejemplo de tal fragmento es un dominio extracelular de TGFβRII que tiene la secuencia del SEQ ID NO: 10.

La expresión "sustancialmente idéntico" significa un polipéptido que presenta al menos un 50 %, deseablemente el 60 %, 70 %, 75 % o el 80 %, más deseablemente el 85 %, 90 % o 95 %, y lo más deseablemente el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia. La longitud de las secuencias de comparación será generalmente de al menos 10 aminoácidos, deseablemente al menos 15 aminoácidos contiguos, más deseablemente al menos 20, 25, 50, 75, 90, 100, 150, 200, 250, 300 o 350 aminoácidos contiguos, y más deseablemente la secuencia de aminoácidos de longitud completa.

El término "paciente" significa un animal humano o no humano (por ejemplo, un mamífero).

El término "tratar" una enfermedad, trastorno o afección (por ejemplo, un cáncer) en un paciente significa reducir al menos un síntoma de la enfermedad, trastorno o afección mediante la administración de un agente terapéutico al paciente.

El término "cáncer" significa una colección de células que se multiplican de manera anómala.

Otras realizaciones y detalles de la invención se presentan a continuación en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

La **FIG. 1A** es un dibujo esquemático de una molécula de anti-PD-L1/trampa de TGFβ que comprende un anticuerpo anti-PD-L1 fusionado a dos dominios extracelulares (DEC) del receptor II de TGFβ a través de un enlazador (Gly₄Ser)₄Gly. La **FIG. 1B** es una fotografía de un análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) de la anti-PD-L1/trampa de TGFβ en condiciones reductoras y no reductoras.

La **FIG. 2** es una fotografía de un gel SDS-PAGE que muestra el análisis del grado de recorte de la anti-PD-L1/trampa de TGFβ expresada por el clon 02B15 a varios niveles de duplicación de la población. La anti-PD-L1/trampa de TGFβ del clon 02B15 después de una única etapa de cromatografía de proteína A se analizó mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras. Carriles 1 y 10, véase el PM estándar Blue Plus 2; carril 2, referencia de anti-PD-L1/trampa de TGFβ purificada; carril 3, clon 02B15 a PDL0; carril 4, clon 02B15 a PDL30; carril 5, clon 02B15 a PDL60; y carril 6, clon 02B15 a PDL90. (PDL, nivel de duplicación de la población).

La **FIG. 3** es un gráfico que muestra el análisis FACS de la unión de la anti-PD-L1/trampa de TGFβ a células HEK transfectadas para expresar PD-L1 humano.

La **FIG. 4** es un gráfico que muestra la capacidad de la anti-PD-L1/trampa de TGFβ para inhibir la fosforilación inducida por TGFβ de SMAD3 utilizando una línea celular indicadora de pSMAD3-luciferasa (círculo relleno: anti-PD-L1; X: anti-PD-L1(mut); cuadrado relleno: anti-PD-L1/trampa de TGFβ; triángulo relleno: anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGFβ; +: anticuerpo anti-TGFβ 1D11; estrella: TGFβ RII-Fc).

Las **FIG. 5A** y **5B** son gráficos que muestran la farmacocinética de la anti-PD-L1/trampa de TGFβ administrada por vía intravenosa y proteínas relacionadas en ratones.

La **FIG. 6A** es un gráfico que muestra la endocitosis mediada por diana de PD-L1 de la anti-PD-L1/trampa de TGFβ. La **FIG. 6B** es un gráfico que muestra la endocitosis de anti-PD-L1 mediada por diana de PD-L1. La **FIG. 6C** es un gráfico que muestra el porcentaje de internalización de anti-PD-L1/trampa de TGFβ y anti-PD-L1 unido en células HEK/PD-L1.

Las **FIG. 7A-7C** son gráficos que muestran la eficacia antitumoral de la anti-PD-L1/trampa de TGFβ y proteínas relacionadas en el modelo subcutáneo de carcinoma de mama EMT-6 (Ejemplo 7). La **FIG. 7A** muestra las curvas de crecimiento tumoral de los volúmenes tumorales promedio de los ratones supervivientes en diferentes grupos de tratamiento (estrella: Grupo 1; círculo relleno: Grupo 2; triángulo relleno: Grupo 3; cuadrado relleno: Grupo 4; cuadrado blanco: Grupo 5; cuadrado relleno/línea discontinua: Grupo 6; cuadrado relleno/línea punteada: Grupo 7). La **FIG. 7B** muestra las curvas de crecimiento tumoral de los volúmenes tumorales individuales en diferentes grupos de tratamiento. La **FIG. 7C** es un gráfico de Kaplan-Meier del porcentaje de supervivencia en diferentes grupos de tratamiento (símbolos como en 7A).

La **FIG. 8** es un gráfico que muestra la eficacia antitumoral de la anti-PD-L1/trampa de TGFβ y proteínas

relacionadas en el modelo de tumor subcutáneo de carcinoma colorrectal MC38 (Ejemplo 8; estrella: Grupo 1; círculo relleno: Grupo 2; círculo relleno/línea discontinua: Grupo 3; triángulo relleno: Grupo 4; triángulo relleno/línea discontinua: Grupo 5; cuadrado relleno: Grupo 6; cuadrado relleno/línea discontinua: Grupo 7).

La **FIG. 9** es un gráfico que muestra la eficacia antitumoral de la anti-PDL1/trampa de TGF β y proteínas relacionadas en un modelo de cáncer de mama EMT-6 ortotópico (Ejemplo 9; estrella: Grupo 1; círculo relleno/línea discontinua: Grupo 2; triángulo relleno: Grupo 3; triángulo relleno/línea discontinua: Grupo 4; diamante relleno: Grupo 5).

La **FIG. 10** es un gráfico que muestra la eficacia antitumoral de la anti-PDL1/trampa de TGF β y proteínas relacionadas en un modelo de carcinoma colorrectal MC38 intramuscular (Ejemplo 10; estrella: Grupo 1; círculo relleno: Grupo 2; círculo relleno/línea discontinua: Grupo 3; diamante relleno/línea discontinua: Grupo 4; cuadrado relleno: Grupo 5; cuadrado relleno/línea discontinua: Grupo 6; diamante relleno: Grupo 7).

La **Figura 11** es un gráfico que muestra la eficacia antitumoral de la anti-PD-L1/trampa de TGF β y la combinación de control de anti-PD-L1 y trampa de TGF β de control administrada para dar una exposición *in vivo* en un modelo de tumor de mama EMT-6 ortotópico (Ejemplo 11; estrella: Grupo 1; cuadrado relleno: Grupo 2; cuadrado blanco: Grupo 3; diamante relleno: Grupo 4; diamante blanco: Grupo 5).

Las **FIG. 12A-12C** son gráficos que muestran la eficacia antitumoral de la anti-PD-L1/trampa de TGF- β y la combinación de anti-PD-L1 y trampa de TGF β de control administrada para dar una exposición equivalente *in vivo* en un modelo de carcinoma colorrectal MC38 intramuscular (Ejemplo 12). La **FIG. 12A** muestra las curvas de crecimiento tumoral de ratones tratados con dosis intermedias y bajas de las proteínas (estrella: Grupo 1; cuadrados rellenos: Grupo 2; cuadrados blancos: Grupo 3; diamantes rellenos: Grupo 4; diamantes blancos: Grupo 5). **FIG. 12B** (estrella: Grupo 1; cuadrado relleno: Grupo 2; diamante relleno: Grupo 4; *: $p < 0,0001$ en comparación con el Grupo 1; **: $p < 0,0001$ en comparación con el Grupo 2) y **12C** (estrella: Grupo 1; cuadrado relleno: Grupo 3; diamante relleno: Grupo 5; *: $p < 0,0001$ en comparación con el Grupo 1; **: $p < 0,0001$ en comparación con el Grupo 3) muestran un análisis estadístico de las curvas de crecimiento tumoral de ratones tratados con dosis intermedias y bajas de las proteínas, respectivamente.

Las **FIG. 13A-13B** son gráficos que muestran la eficacia antitumoral de la anti-PD-L1 (YW)/trampa de TGF- β y proteínas relacionadas en un modelo de tumor de mama EMT-6 ortotópico (Ejemplo 13; estrella: Grupo 1; círculo relleno: Grupo 2; triángulo relleno: Grupo 3; cuadrado relleno: Grupo 4; diamante relleno: Grupo 5). La **FIG. 13A** muestra curvas de crecimiento tumoral de ratones en diferentes grupos de tratamiento. La **FIG. 13B** es un gráfico de Kaplan-Meier del porcentaje de supervivencia en diferentes grupos de tratamiento.

Las **FIG. 14A-14B** son gráficos que muestran la eficacia antitumoral de la anti-PD-L1 (YW)/trampa de TGF- β y proteínas relacionadas basadas en (A) los volúmenes tumorales y (B) los pesos tumorales, en un modelo de carcinoma colorrectal MC38 intramuscular (Ejemplo 14; estrella: Grupo 1; círculo relleno: Grupo 2; triángulo relleno: Grupo 3; cuadrado relleno: Grupo 4; diamante relleno: Grupo 5).

La **FIG. 15** es un gráfico que compara la eficacia antitumoral de un tratamiento con anticuerpo anti-PD-1 con y sin trampa de TGF β de control en un modelo de tumor de mama EMT-6 ortotópico (Ejemplo 15; estrella: Grupo 1; cuadrado relleno: Grupo 2; triángulo invertido relleno: Grupo 3; triángulo invertido blanco: Grupo 4).

La **FIG. 16** es un gráfico que compara la eficacia antitumoral de un tratamiento con anticuerpo anti-PD-1 con y sin trampa de TGF β de control en un modelo de tumor colorrectal MC38 intramuscular (Ejemplo 16; estrella: Grupo 1; cuadrado relleno: Grupo 2; triángulo invertido relleno: Grupo 3; triángulo invertido blanco: Grupo 4).

La **FIG. 17** es un gráfico que compara la eficacia antitumoral de un tratamiento con anticuerpos anti-LAG3 o anti-TIM3 con y sin trampa de TGF β de control en un modelo de tumor de mama EMT-6 ortotópico (Ejemplo 17; estrella: Grupo 1; cuadrado relleno: Grupo 2; triángulo relleno: Grupo 3; triángulo invertido relleno: Grupo 4; triángulos blancos: Grupo 5; triángulo invertido blanco: Grupo 6).

La **FIG. 18** es un gráfico que compara la eficacia antitumoral de un tratamiento con anticuerpos anti-LAG3 o anti-TIM3 con y sin trampa de TGF β de control en un modelo de tumor colorrectal MC38 intramuscular (Ejemplo 18; estrella: Grupo 1; cuadrado relleno: Grupo 2; triángulo relleno: Grupo 3; triángulo invertido relleno: Grupo 4; triángulos blancos: Grupo 5; triángulo invertido blanco: Grupo 6).

Descripción detallada

La invención actual permite la reducción localizada de TGF β en un microambiente tumoral capturando el TGF β usando un receptor de citocina soluble (TGF β RII) anclado a un resto de anticuerpo dirigido a un PD-L1 que se encuentra en la superficie exterior de ciertas células tumorales o células inmunitarias. Esta molécula bifuncional, a veces citada en el presente documento como una "trampa de anticuerpos-citocinas", es eficaz precisamente porque el anticuerpo anti-PD-L1 y la trampa de citocinas están físicamente unidos. La ventaja resultante (sobre, por ejemplo, administración del

anticuerpo y el receptor como moléculas separadas) se debe en parte a que las citocinas funcionan predominantemente en el entorno local a través de funciones autocrinas y paracrinas. El resto del anticuerpo dirige la trampa de citocinas al microambiente del tumor donde puede ser más eficaz, neutralizando los efectos inmunosupresores locales autocrinos o paracrinos. Además, en los casos en los que la diana del anticuerpo se internaliza tras la unión del anticuerpo, se proporciona un mecanismo eficaz para la eliminación del complejo citocina/receptor de citocina. Se ha demostrado la internalización de la diana mediada por anticuerpos para PD-L1. Esta es una clara ventaja sobre el uso de un anticuerpo anti-TGF β porque primero, un anticuerpo anti-TGF β podría no ser completamente neutralizante; y en segundo lugar, el anticuerpo puede actuar como un vehículo prolongando la vida media de la citocina, y los complejos de anticuerpo/citocina a menudo actúan como un sumidero en circulación que se acumula y finalmente se disocia para liberar la citocina de regreso a la circulación (Montero-Julian *et al.*, Blood. 1995; 85:917-24). El uso de una trampa de citocinas para neutralizar el ligando también puede ser una mejor estrategia que bloquear el receptor con un anticuerpo, como en el caso de CSF-1. Debido a que el CSF-1 se elimina de la circulación por endocitosis mediada por receptores, un bloqueo de anticuerpos anti-receptor de CSF-1 provocó un aumento significativo en la concentración de CSF-1 en circulación (Hume *et al.*, Blood. 2012; 119:1810-20).

De hecho, tal como se describe a continuación, el tratamiento con anti-PD-L1/ trampa de TGF β provoca un efecto antitumoral sinérgico debido al bloqueo simultáneo de la interacción entre PD-L1 en las células tumorales y PD-1 en las células inmunes, y la neutralización de TGF β en el microambiente tumoral. Tal como se demuestra en los siguientes ejemplos, el anti-PDL1/trampa de TGF β tiene una eficacia superior a la del control de la anti-PD-L1 o trampa de TGF β como agente único. Sin quedar limitados por la teoría, esto presumiblemente se debe a un efecto sinérgico obtenido del bloqueo simultáneo de los dos principales mecanismos de escape inmunitario y, además, el agotamiento dirigido del TGF β en el microambiente tumoral por una sola entidad molecular. Este agotamiento se logra mediante (1) el direccionamiento anti-PD-L1 de las células tumorales; (2) la unión del TGF β autocrino/paracrino en el microambiente tumoral por la Trampa de TGF β ; y (3) destrucción del TGF β unido a través de la endocitosis mediada por el receptor PD-L1. Los mecanismos de acción mencionados anteriormente no se pueden lograr mediante la terapia de combinación de los dos agentes únicos anti-PD-L1 y trampa de TGF β . Además, el TGF β RII fusionado al extremo C-terminal de Fc (fragmento de cristalización de IgG) fue varias veces más potente que el TGF β RII-Fc que coloca al TGF β RII en el extremo N-terminal de Fc (véase el Ejemplo 3). La excelente eficacia obtenida con anti-PDL1/trampa de TGF β también disipa algunas preocupaciones de que el TGF β RII no atrapa al TGF β 2. Como señalaron Yang *et al.*, Trends Immunol. 2010; 31:220-227, aunque algunos tipos de tumores secretan TGF β 2 inicialmente, a medida que avanza el tumor, el TGF β en el microambiente tumoral es secretado predominantemente por células supresoras derivadas del mieloide, que secretan TGF β 1. Además de ser muy prometedor como agente terapéutico inmunooncológico eficaz, el tratamiento con TGF β RII soluble puede reducir potencialmente los problemas de cardiotoxicidad de las terapias dirigidas al TGF β , especialmente los inhibidores de la cinasa TGF β RI. Esto se debe al importante papel que juega el TGF β 2 en el desarrollo embrionario del corazón, así como en la reparación del daño miocárdico después de una lesión por isquemia y reperusión (Roberts *et al.*, J Clin Invest. 1992; 90:2056-62).

TGF β como diana del cáncer

El TGF β había sido una diana algo cuestionable en la inmunoterapia contra el cáncer debido a sus papeles paradójicos como Jekyll y Hyde moleculares del cáncer (Bierie *et al.*, Nat Rev Cancer. 2006; 6:506-20). Como algunas otras citocinas, la actividad de TGF β depende de la etapa de desarrollo y del contexto. De hecho, el TGF β puede actuar como promotor de tumores o supresor de tumores, afectando a la iniciación del tumor, a la progresión y a la metástasis. Los mecanismos que subyacen a esta función doble del TGF β siguen sin estar claros (Yang *et al.*, Trends Immunol. 2010; 31:220-227). Aunque se ha postulado que la señalización dependiente de Smad media la inhibición del crecimiento de la señalización de TGF β , mientras que las vías independientes de Smad contribuyen a su efecto promotor de tumores, también hay datos que muestran que las vías dependientes de Smad están implicadas en la progresión tumoral (Yang *et al.*, Cancer Res. 2008; 68:9107-11).

Tanto el ligando de TGF β como el receptor se han estudiado intensamente como dianas terapéuticas. Hay tres isoformas de ligando, TGF β 1, 2 y 3, todas las cuales existen como homodímeros. También hay tres receptores de TGF β (TGF β R), que se denominan TGF β R tipo I, II y III (López-Casillas *et al.*, J Cell Biol. 1994; 124:557-68). TGF β RI es la cadena de señalización y no puede unirse al ligando. TGF β RII se une al ligando TGF β 1 y 3, pero no a TGF β 2, con alta afinidad. El complejo TGF β RII/TGF β recluta TGF β RI para formar el complejo de señalización (Von *et al.*, Cancer Res. 1999; 59:1273-7). TGF β RIII es un regulador positivo de la unión de TGF β a sus receptores de señalización y une las 3 isoformas de TGF β con alta afinidad. En la superficie celular, el complejo TGF β /TGF β RIII se une a TGF β RII y luego recluta TGF β RI, que desplaza a TGF β RIII para formar el complejo de señalización.

Aunque las tres isoformas de TGF β diferentes envían señales a través del mismo receptor, se sabe que tienen patrones de expresión diferencial y funciones que no se superponen *in vivo*. Los tres ratones con inactivación de la isoforma de TGF- β diferentes tienen fenotipos distintos, lo que indica numerosas funciones no compensadas (Bujak *et al.*, Cardiovasc Res. 2007; 74:184-95). Mientras que los ratones sin TGF β 1 tienen defectos de hematopoyesis y vasculogénesis y los ratones sin TGF β 3 muestran desarrollo pulmonar y palatogénesis defectuosa, los ratones sin TGF β 2 muestran diversas anomalías del desarrollo, siendo las más prominentes, las deformidades cardíacas múltiples (Bartram *et al.*, Circulation. 2001; 103:2745-52; Yamagishi *et al.*, Anat Rec. 2012; 295:257-67). Además, El TGF β está implicado para desempeñar un papel importante en la reparación del daño miocárdico después de la lesión por

isquemia y reperusión. En un corazón adulto, los cardiomiocitos secretan TGF β , que actúa como un autocrino para mantener la frecuencia de latidos espontáneos. Notablemente, el 70-85 % del TGF β secretado por cardiomiocitos es TGF β 2 (Roberts *et al.*, J Clin Invest. 1992; 90:2056-62). En resumen, dados los roles predominantes de TGF β 1 y TGF β 2 en el microambiente tumoral y la fisiología cardíaca, respectivamente, un agente terapéutico que neutraliza TGF β 1 pero no TGF β 2 podría proporcionar un índice terapéutico óptimo minimizando la cardiotoxicidad sin comprometer la actividad antitumoral. Esto es consistente con los hallazgos de los presentes inventores, que observaron una falta de toxicidad, incluyendo cardiotoxicidad, para anti-PD-L1/trampa de TGF β en monos.

Los enfoques terapéuticos para neutralizar TGF β incluyen el uso de los dominios extracelulares de los receptores de TGF β como trampas de receptores solubles y anticuerpos neutralizantes. Del enfoque de la trampa del receptor, el TGF β RIII soluble puede parecer la opción obvia ya que se une a los tres ligandos de TGF β . Sin embargo, TGF β RIII, que se produce naturalmente como glucosaminoglicano (GAG)-glucoproteína de 280-330 kD, con dominio extracelular de 762 restos de aminoácidos, es una proteína muy compleja para el desarrollo bioterapéutico. El TGF β RIII soluble desprovisto de GAG podría producirse en células de insectos y se demostró que es un potente agente neutralizante de TGF β (Vilchis-Landeros *et al.*, Biochem J 355:215, 2001). Los dos dominios de unión separados (el relacionado con la endoglina y el relacionado con la uromodulina) de TGF β RIII podrían expresarse de forma independiente, pero se demostró que tenían afinidades de 20 a 100 veces menores que las del TGF β RIII soluble y una actividad neutralizante muy disminuida (Mendoza *et al.*, Biochemistry. 2009; 48:11755-65). Por otra parte, el dominio extracelular de TGF β RII tiene solo 136 restos de aminoácidos de longitud y se puede producir como una proteína glucosilada de 25-35 kD. Se demostró además que el TGF β RII soluble recombinante se une al TGF β 1 con una K_D de 200 pM, que es bastante similar a la K_D de 50 pM para el TGF β RII de longitud completa en las células (Lin *et al.*, J Biol Chem. 1995; 270:2747-54). Se probó el TGF β RII-Fc soluble como agente anticanceroso y se demostró que inhibe el crecimiento de mesotelioma maligna murina establecido en un modelo tumoral (Suzuki *et al.*, Clin Cancer Res. 2004; 10:5907-18). Dado que TGF β RII no se une a TGF β 2, y TGF β RIII se une a TGF β 1 y 3 con menor afinidad que TGF β RII, se produjo una proteína de fusión del dominio de endoglina de TGF β RIII y el dominio extracelular de TGF β RII en bacterias y se demostró que inhibe la señalización de TGF β 1 y 2 en ensayos basados en células de manera más eficaz que TGF β RII o RIII (Verona *et al.*, Protein Eng Des Sel. 2008; 21:463-73). A pesar de algunas actividades antitumorales alentadoras en modelos tumorales, hasta donde saben los presentes inventores, no se ha probado en la clínica ninguna proteína recombinante de trampa de receptor de TGF β .

Otro enfoque más para neutralizar las tres isoformas de los ligandos de TGF β es seleccionar un anticuerpo anti-TGF β panneutralizante, o un anticuerpo anti-receptor que bloquea la unión del receptor a TGF β 1, 2 y 3. GC1008, un anticuerpo humano específico para todas las isoformas de TGF β , estaba en un estudio de fase I/II en pacientes con melanoma maligno avanzado o carcinoma de células renales (Morris *et al.*, J Clin Oncol 2008; 26:9028 (Resumen de reunión)). Aunque se descubrió que el tratamiento era seguro y bien tolerado, solo se observó una eficacia clínica limitada y, por lo tanto, fue difícil interpretar la importancia de la terapia anti-TGF β sin una caracterización adicional de los efectos inmunológicos (Flavell *et al.*, Nat Rev Immunol. 2010; 10:554-67). También se probaron en la clínica anticuerpos específicos de isoforma de TGF β . Metelimumab, un anticuerpo específico para TGF β 1, se probó en un ensayo clínico de fase 2 como tratamiento para prevenir la cicatrización posoperatoria excesiva de la cirugía de glaucoma; y Lerdelumab, un anticuerpo específico para TGF β 2, se descubrió que era seguro pero ineficaz para mejorar las cicatrices después de la cirugía ocular en un estudio de fase 3 (Khaw *et al.*, Ophthalmology 2007; 114:1822-1830). Los anticuerpos anti-TGF β RII que bloquean la unión del receptor a las tres isoformas de TGF β , tales como el anticuerpo anti-TGF β RII humano TR1 y el anticuerpo anti-TGF β RII de ratón MT1, también han demostrado cierta eficacia terapéutica contra el crecimiento de tumores primarios y la metástasis en modelos de ratón (Zhong *et al.*, Clin Cancer Res. 2010; 16:1191-205). Hasta la fecha, la gran mayoría de los estudios sobre el tratamiento contra el cáncer dirigido a TGF β , incluidos los inhibidores de moléculas pequeñas de la señalización de TGF β que a menudo son bastante tóxicos, se encuentran mayoritariamente en fase preclínica y la eficacia antitumoral obtenida ha sido limitada (Calone *et al.*, Exp Oncol. 2012; 34:9-16; Connolly *et al.*, Int J Biol Sci. 2012; 8:964-78).

El anticuerpo-trampa de TGF β de la invención es una proteína bifuncional que contiene al menos una porción de un Receptor II de TGF β humano (TGF β RII) que es capaz de unirse a TGF β . En una realización, el polipéptido de trampa de TGF β es una porción soluble de la isoforma A del receptor de TGF β de tipo 2 humano (SEQ ID NO: 8) que es capaz de unirse a TGF β . En una realización adicional, el polipéptido de trampa de TGF β contiene al menos los aminoácidos 73-184 del SEQ ID NO: 8. En una realización adicional, el polipéptido de trampa de TGF β contiene los aminoácidos 24-184 del SEQ ID NO: 8. En otra realización, el polipéptido de trampa de TGF β es una porción soluble de la isoforma B del receptor de TGF β de tipo 2 humano (SEQ ID NO: 9) que es capaz de unirse a TGF β . En una realización adicional, el polipéptido de trampa de TGF β contiene al menos los aminoácidos 48-159 del SEQ ID NO: 9. En una realización adicional, el polipéptido de trampa de TGF β contiene los aminoácidos 24-159 del SEQ ID NO: 9. En una realización adicional, el polipéptido de trampa de TGF β contiene los aminoácidos 24-105 del SEQ ID NO: 9.

Desinhibición del punto de control inmunitario

El enfoque del direccionamiento de los puntos de control de inhibición de linfocitos T para la desinhibición con anticuerpos terapéuticos es un área de intensa investigación (para una revisión, véase Pardoll, Nat Rev Cancer. 2012; 12:253-264). El resto de anticuerpo se dirige a PD-L1, el contrarreceptor de las células presentadoras de antígenos y las células tumorales (que cooptan este contrarreceptor para su propia evasión inmunitaria).

La invención contempla anticuerpo - trampa de TGFβ que se dirige a, a través de su resto de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, puntos de control de inhibición de linfocitos T para la desinhibición. Con ese fin, los presentes inventores han probado la eficacia antitumoral de combinar una trampa de TGFβ con anticuerpos dirigidos a diversas proteínas receptoras del punto de control de inhibición de linfocitos T, tal como anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-TIM-3 y anti-LAG3. Los resultados experimentales se detallan más en los Ejemplos 7-18. Los presentes inventores descubrieron que la combinación de una trampa de TGFβ con un anticuerpo anti-PD-L1 presentaba una actividad antitumoral notable más allá de lo observado con las monoterapias. En cambio, ninguna de las otras combinaciones con anticuerpos contra las dianas enumeradas anteriormente mostró una eficacia superior. En particular, uno podría haber esperado que un tratamiento combinado de una trampa de TGFβ con un anticuerpo anti-PD-1 demostraría una actividad similar a la observada con anti-PD-L1, ya que PD-1/PD-L1 son receptores afines que se unen entre sí para efectuar la inhibición del punto de control inmunitario. Sin embargo, esto no es lo que han descubierto los presentes inventores.

Anticuerpos anti-PD-L1

Los restos de anticuerpos de proteínas de la invención puede comprender cualquier anticuerpo anti-PD-L1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito en la materia que comprende: (i) una región variable de cadena pesada que incluye un HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SYIMM, SIYPSGGITFYADTVKG e IKLGTVTTVDY, respectivamente, y (ii) una región variable de cadena ligera que incluye un HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que tiene las secuencias de aminoácidos de TGTSSDVGGYNYVS, DVSNRPS y SSYTSSSTRV, respectivamente. Los anticuerpos anti-PD-L1 están disponibles comercialmente, por ejemplo, el anticuerpo 29E2A3 (Biolegend, N.º de Cat. 329701). Los anticuerpos pueden ser monoclonales, quiméricos, humanizado o humano. Los fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, F(ab')₂, fragmentos scFv y Fv, que se describen con más detalle a continuación.

Los anticuerpos ilustrativos pueden comprender secuencias marco de cadena pesada de región variable yuxtapuestas entre los HVR de acuerdo con la fórmula: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4). Por ejemplo, en un aspecto, las secuencias marco pueden derivar de secuencias marco consenso humanas o secuencias marco de la línea germinal humana.

En otro aspecto, al menos una de las secuencias marco es la siguiente:

HC-FR1 es EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS;

HC-FR2 es WVRQAPGKGLEWVS;

HC-FR3 es RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR;

HC-FR4 es WGQGTLVTVSS.

Los anticuerpos ilustrativos también pueden comprender secuencias marco de cadena ligera de región variable yuxtapuestas entre los HVR de acuerdo con la fórmula: (LC-FR1MHVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4).

Por ejemplo, en un aspecto, las secuencias marco de cadena ligera pueden derivar de secuencias marco consenso humanas o secuencias marco de la línea germinal humana.

En otro aspecto, las secuencias marco de cadena ligera son secuencias de cadena ligera lambda.

En un aspecto adicional, al menos una de las secuencias marco es la siguiente:

LC-FR1 es QSALTQPASVSGSPGQSITISC;

LC-FR2 es WYQQHPGKAPKLMIIY;

LC-FR3 es GVSNRFSKSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC;

LC-FR4 es FGTGTVTL.

En un aspecto adicional, la región variable de cadena pesada incluye una o más secuencias marco yuxtapuestas entre las HVR como: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4) y las regiones variables de cadena ligera incluyen una o más secuencias marco yuxtapuestas entre las HVR como: (LC-FR1 HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4).

En aún otro aspecto más, el polipéptido de la región variable de la cadena pesada, el anticuerpo, o el fragmento de

anticuerpo incluye además al menos un dominio C_H1.

En un aspecto más específico, el polipéptido de la región variable de la cadena pesada, el anticuerpo, o el fragmento de anticuerpo además incluye un dominio C_H1, un C_H2 y un C_H3.

En aún otro aspecto más, la cadena ligera de la región variable, el anticuerpo, o el fragmento de anticuerpo además incluye un dominio C_L.

En aún otro aspecto más, el anticuerpo además incluye un dominio C_H1, un C_H2, un C_H3 y un C_L.

En un aspecto aún más específico, el anticuerpo incluye además una región constante humana o murina.

En aún otro aspecto más, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4.

En un aspecto aún más específico, la región constante humana o murina es IgG1.

La invención presenta un anticuerpo anti-PD-L1 que incluye una secuencia de región variable de cadena pesada y cadena ligera, en donde:

(a) la cadena pesada incluye una HVR-H1, un HVR-H2 y un HVR-H3, que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia total con SYIMM, SIYPSGGITFYADTVKG, e IKLGTVTTVDY, respectivamente, y

(b) la cadena ligera incluye una HVR-L1, un HVR-L2 y un HVR-L3, que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia total con TGTSSDVGGYNYVS, DVSNRPS y SSYTSSSTRV, respectivamente.

En aún otra realización más, la invención presenta un anticuerpo anti-PD-L1 que incluye una secuencia de región variable de cadena pesada y cadena ligera, en donde:

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

(b) la secuencia de cadena ligera tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de cadena ligera:
QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFGSGSKSGNTAS
LTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVFGTGTKVTVL.

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

Los anticuerpos desvelados en el presente documento pueden unirse al PD-L1 humano, de ratón o de mono cinomolgo. En un aspecto específico, el anticuerpo puede ser capaz de bloquear la interacción entre PD-L1 humano, de ratón o de mono cinomolgo y los respectivos receptores de PD-1 de humano, ratón o mono cinomolgo.

Los anticuerpos desvelados en el presente documento pueden unirse al PD-L1 humano con una K_D de 5x10⁻⁹ M o menos, preferentemente con una K_D de 2x10⁻⁹ M o menos, y aún más preferentemente con una K_D de 1x10⁻⁹ M o menos.

Los anticuerpos desvelados en el presente documento pueden unirse a un epítipo funcional que incluye los restos Y56 y D61 de PD-L1 humano.

El epítipo funcional puede incluir además E58, E60, Q66, R113 y M115 de PD-L1 humano.

Específicamente, los anticuerpos desvelados en el presente documento pueden unirse a un epítipo conformacional, incluidos los restos 54-66 y 112-122 de PD-L1 humano.

Se desvelan en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden proteínas y polipéptidos que incluyen cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 descritos anteriormente en combinación con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización adicional más, la invención presenta un ácido nucleico aislado que codifica una secuencia de región variable de cadena ligera o cadena pesada de un anticuerpo anti-PD-L1, en donde:

(a) la cadena pesada incluye una secuencia de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que tiene al menos un 80 % de

identidad de secuencia con SYIMM, SIYPSGGITFYADTVKG, e IKLGTVTTVDY, respectivamente, o

(b) la cadena ligera incluye una secuencia HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con TGTSSDVGGYNYVS, DVSNRPS y SSYTSSSTRV, respectivamente.

5

En un aspecto adicional de la divulgación, la secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada es:

```

atggagttgc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttcttctag ctccagcgag      60
gtgcagctgc tgggaatccgg cggaggactg gtgcagcctg gcggctccct gagactgtct      120
tgcgccgcct cgggcttcac cttctccagc tacatcatga tgtgggigcg acaggccccct      180
ggcaaggggcc tgggaatgggt gtctcccatc taccctctcg gcggcatcac cttctacgcc      240
gacaccgtga agggccgggt caccatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg      300
cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gatcaagctg      360
ggcaccgtga ccaccgtgga ctactggggc cagggcaccc tggtgacagt gtctccgcc      420

tccaccaagg gcccatcggc cttccccctg gcaccctctt ccaagagcac ctctgggggc      480
acaagcgccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg      540
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcttaca gtctcagga      600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac      660
atctgcaacg tgaatcaca gcccagcaac accaagggtg acaagaaagt tgagcccaa      720
tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg      780
tcagtcttcc tcttccccc aaaaaccaag gacacctca tgatctccg gacctctgag      840
gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac      900
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa gaaaagccgc gggaggagca gtacaacagc      960
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag      1020
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa      1080
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc cccatcacg ggatgagctg      1140
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc      1200
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg      1260
gactccgacg gctccctctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag      1320
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag      1380
aagagcctct ccctgtcccc gggtaaa      1407

```

10 y la secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera es:

```

atggagttgc cgtttaggct gttgggtgctg argtcttggg ttcttgcctc ctttaagccag      60
tccgccctga cccagcctgc ctccgtgtct ggcctccctg gccagtecat caccatcagc      120
tgcaccggca cctccagcga cgtgggctggc tacaactacg tgctctggta tcagcagcac      180
cccggaagg cccccaagct gatgatctac gacgtgtcca accggccctc cggcgtgtcc      240
aacagattct ccggtccaa gtccggcaac accgcctccc tgaccatcag cggactgcag      300
gcagaggacg aggccgacta ctactgtctc tcttacacct cctccagcac cagagtgttc      360
ggcaccggca caaaagtgc cgtgtctggc cagcccaagg ccaaccacac cgtgacactg      420
ttccccccat cctccgagga actgcaggcc aacaaggcca ccttggctctg cctgatctca      480
gatttctatc caggcgccgt gaccgtggcc tggaaaggct atggctccc agtgaaggcc      540
ggcgtggaaa ccaccaagcc ctccaagcag tccaacaaca aatacgcgc ctcctctac      600
ctgtccctga cccccagca gtggaagtcc caccggtcct acagctgcca ggtcacacac      660
gagggtcca ccgtggaaaa gaccgtgcc cccaccgagt gctca      705

```

En la publicación de solicitud de patente de EE.UU. US 2010/0203056 se describen anticuerpos anti-PD-L1 ilustrativos adicionales que se pueden usar en un anti-PD-L1/trampa de TGFβ. En un aspecto de la divulgación, el resto de anticuerpo es YW243.55S70. En otro aspecto de la divulgación, el resto de anticuerpo es MPDL3280A.

En un aspecto adicional de la divulgación, se presenta un resto de anticuerpo anti-PD-L1 que incluye una secuencia de región variable de cadena pesada y cadena ligera, en donde:

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

```

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYY
ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGITLVTVSS

```

15 (SEQ ID NO: 12),

y

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

20

```

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFVSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR

```

(SEQ ID NO: 13).

25 La identidad de secuencia puede ser del 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %.

Un aspecto adicional de la divulgación presenta un resto de anticuerpo anti-PD-L1 que incluye una secuencia de región variable de cadena pesada y cadena ligera, en donde:

30

(a) la secuencia de la región variable de la cadena pesada es:

```

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYY
ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGITLVTVSS

```

35 (SEQ ID NO: 12),

y

(b) la secuencia de la región variable de la cadena ligera es:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR

5 (SEQ ID NO: 13).

Un aspecto adicional de la divulgación es un resto de anticuerpo anti-PD-L1 que incluye una secuencia de región variable de cadena pesada y de cadena ligera, en donde:

10 (a) la secuencia de la región variable de la cadena pesada es:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSV
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWFGGFDYWGQGTILTVSA

(SEQ ID NO: 14),

15

y
(b) la secuencia de la región variable de la cadena ligera es:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR

20

(SEQ ID NO: 13).

Aún otros anticuerpos anti-PD-L1 ilustrativos que se pueden usar en un anti-PD-L1/trampa de TGF β se describen en la publicación de patente de EE.UU. US 7.943.743.

25

En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo anti-PD-L1 es MDX-1105.

En un aspecto adicional de la divulgación, el anticuerpo anti-PD-L1 es MEDI-4736.

30 **Región constante**

Las proteínas y péptidos desvelados en el presente documento pueden incluir una región constante de una inmunoglobulina o un fragmento, un análogo, una variante, un mutante o un derivado de la región constante. En aspectos preferidos de la divulgación, la región constante se obtiene de una cadena pesada de inmunoglobulina humana, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 u otras clases. En un aspecto de la divulgación, la región constante incluye un dominio CH2. En otro aspecto de la divulgación, la región constante incluye dominios CH2 y CH3 o incluye bisagra-CH2-CH3. Como alternativa, la región constante puede incluir la totalidad o una parte de la región bisagra, del dominio CH2 y/o del dominio CH3.

35

40 En un aspecto de la divulgación, la región constante contiene una mutación que reduce la afinidad por un receptor Fc o reduce la función efectora de Fc. Por ejemplo, la región constante puede contener una mutación que elimina el sitio de glucosilación dentro de la región constante de una cadena pesada de IgG. En algunos aspectos de la divulgación, la región constante contiene mutaciones, deleciones o inserciones en una posición de aminoácido correspondiente a Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Asn297 o Pro331 de IgG1 (los aminoácidos están numerados según la nomenclatura de la UE). En un aspecto particular de la divulgación, la región constante contiene una mutación en una posición de aminoácido correspondiente a Asn297 de IgG1. En aspectos alternativos de la divulgación, la región constante contiene mutaciones, deleciones o inserciones en una posición de aminoácido correspondiente a Leu281, Leu282, Gly283, Gly284, Asn344, o Pro378 de IgG1.

45

50 En algunos aspectos de la divulgación, la región constante contiene un dominio CH2 que proviene de una cadena pesada de IgG2 o IgG4 humana. Preferentemente, el dominio CH2 contiene una mutación que elimina el sitio de glucosilación de dentro del dominio CH2. En un aspecto de la divulgación, la mutación altera la asparagina dentro de la secuencia de aminoácidos Gln-Phe-Asn-Ser (SEQ ID NO: 15) dentro del dominio CH2 de la cadena pesada de IgG2 o IgG4. Preferentemente, la mutación cambia la asparagina a glutamina. Como alternativa, la mutación altera tanto la fenilalanina como la asparagina dentro de la secuencia de aminoácidos Gln-Phe-Asn-Ser (SEQ ID NO: 15). En un aspecto de la divulgación, la secuencia de aminoácidos Gln-Phe-Asn-Ser (SEQ ID NO: 15) se reemplaza por una secuencia de aminoácidos Gln-Ala-Gln-Ser (SEQ ID NO: 16). La asparagina dentro de la secuencia de aminoácidos Gln-Phe-Asn-Ser (SEQ ID NO: 15) se corresponde con Asn297 de IgG1.

55

En otro aspecto de la divulgación, la región constante incluye un dominio CH2 y al menos una parte de una región bisagra. La región bisagra puede derivarse de una cadena pesada de inmunoglobulina, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 u otras clases. Preferentemente, la región de la bisagra se obtiene de la IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 humana u otras clases adecuadas. Más preferentemente, la región bisagra se obtiene de una cadena pesada de IgG1 humana. En un aspecto de la divulgación, la cisteína en la secuencia de aminoácidos de Pro-Lys-Ser-Cys-Asp-Lys (SEQ ID NO: 17) de la región bisagra de IgG1 está alterada. En un aspecto preferido de la divulgación, la secuencia de aminoácidos de Pro-Lys-Ser-Cys-Asp-Lys (SEQ ID NO: 17) se reemplaza con una secuencia de aminoácidos de Pro-Lys-Ser-Ser-Asp-Lys (SEQ ID NO: 18). En un aspecto de la divulgación, la región constante incluye un dominio CH2 derivado de un primer isotipo de anticuerpo y una región bisagra derivada de un segundo isotipo de anticuerpo. En un aspecto específico de la divulgación, el dominio CH2 se deriva de una cadena pesada de IgG2 o IgG4 humana, mientras que la región bisagra se deriva de una cadena pesada de IgG1 humana alterada.

La alteración de los aminoácidos cerca de la unión de la parte Fc y la parte no Fc puede aumentar espectacularmente la semivida en suero de la proteína de fusión Fc (publicación PCT WO 01/58957). Por consiguiente, la región de unión de una proteína o de un polipéptido de la presente divulgación puede contener alteraciones que, en relación con las secuencias naturales de una cadena pesada de inmunoglobulina y eritropoyetina, preferentemente, se encuentran dentro de aproximadamente 10 aminoácidos del punto de unión. Estos cambios de aminoácidos pueden causar un aumento en la hidrofobicidad. En un aspecto de la divulgación, la región constante se deriva de una secuencia de IgG en la que se reemplaza el resto de lisina C-terminal. Preferentemente, la lisina C-terminal de una secuencia de IgG se reemplaza por un aminoácido distinto de la lisina, tal como alanina o leucina, para aumentar aún más la semivida en suero. En otro aspecto de la divulgación, la región constante se obtiene de una secuencia de IgG en la que la secuencia de aminoácidos Leu-Ser-Leu-Ser (SEQ ID NO: 19) cerca del extremo C-terminal de la región constante está alterada para eliminar posibles epítomos de linfocitos T de unión. Por ejemplo, en un aspecto de la divulgación, la secuencia de aminoácidos Leu-Ser-Leu-Ser se reemplaza con una secuencia de aminoácidos Ala-Thr-Ala-Thr (SEQ ID NO: 20). En otro aspecto de la divulgación, los aminoácidos dentro del segmento Leu-Ser-Leu-Ser (SEQ ID NO: 19) se reemplazan con otros aminoácidos tales como glicina o prolina. Los métodos detallados para generar sustituciones de aminoácidos del segmento Leu-Ser-Leu-Ser (SEQ ID NO: 19) cerca del extremo C-terminal de una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 u otra molécula de la clase de inmunoglobulinas, se han descrito en la publicación de patente de EE.UU. n.º 2003/0166877.

Las regiones de bisagra adecuadas para los anticuerpos de la divulgación se pueden obtener de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y otras clases de inmunoglobulinas. La región bisagra de IgG1 tiene tres cisteínas, dos de los cuales participan en enlaces disulfuro entre las dos cadenas pesadas de la inmunoglobulina. Estas mismas cisteínas permiten la formación eficaz y consistente de enlaces disulfuro entre las partes Fc. Por lo tanto, una región de bisagra preferida de la presente invención se obtiene de IgG1, más preferentemente, de IgG1 humana. En algunos aspectos de la divulgación, la primera cisteína de dentro de la región bisagra de IgG1 humana está mutada a otro aminoácido, preferentemente, a serina. La región bisagra del isotipo IgG2 tiene cuatro enlaces disulfuro que tienden a potenciar la oligomerización y posiblemente un enlace disulfuro incorrecto durante la secreción en sistemas recombinantes. Una región bisagra adecuada se puede derivar de una bisagra de IgG2; las dos primeras cisteínas están cada una preferentemente mutadas a otro aminoácido. Se sabe que la región bisagra de IgG4 forma enlaces disulfuro entre cadenas de manera ineficaz. Sin embargo, una región bisagra adecuada para la presente divulgación se puede obtener de la región de bisagra de IgG4, que contiene preferentemente una mutación que potencia la formación correcta de enlaces disulfuro entre restos derivados de la cadena pesada (Angal S., *et al.* (1993) *Mol. Immunol.*, 30:105-8).

De conformidad con la presente divulgación, la región constante puede contener dominios CH2 y/o CH3 y una región bisagra que se derive de diferentes isotipos de anticuerpos, es decir, una región constante híbrida. Por ejemplo, en un aspecto de la divulgación, la región constante contiene dominios CH2 y/o CH3 derivados de IgG2 o IgG4 y una región bisagra mutante derivada de IgG1. Como alternativa, se usa una región bisagra mutante de otra subclase de IgG en una región constante híbrida. Por ejemplo, se puede usar una forma mutante de la bisagra de IgG4 que permita una unión disulfuro eficaz entre las dos cadenas pesadas. Una bisagra mutante también puede derivarse de una bisagra de IgG2 en la que las dos primeras cisteínas estén mutadas a otro aminoácido. El ensamblaje de dichas regiones constantes híbridas se ha descrito en la publicación de patente de EE.UU. n.º 2003/0044423.

De acuerdo con la presente divulgación, la región constante puede contener una o más mutaciones descritas en el presente documento. Las combinaciones de mutaciones en la porción Fc pueden tener efectos aditivos o sinérgicos sobre la semivida sérica prolongada y el aumento *in vivo* de la potencia de la molécula bifuncional. Por lo tanto, en un aspecto ilustrativo de la divulgación, la región constante puede contener (i) una región que proviene de una secuencia de IgG en la que la secuencia de aminoácidos Leu-Ser-Leu-Ser (SEQ ID NO: 19) se reemplaza con una secuencia de aminoácidos Ala-Thr-Ala-Thr (SEQ ID NO: 20); (ii) un resto de alanina en C-terminal en lugar de lisina; (iii) un dominio CH2 y una región de bisagra que se obtienen de diferentes isotipos de anticuerpos, por ejemplo, un dominio CH2 de IgG2 y una región de bisagra de IgG1 alterada; y (iv) una mutación que elimina el sitio de glucosilación dentro del dominio CH2 que proviene de IgG2, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos Gln-Ala-Gln-Ser (SEQ ID NO: 16) en lugar de la secuencia de aminoácidos Gln-Phe-Asn-Ser (SEQ ID NO: 15) dentro del dominio CH2 que proviene de IgG2.

Fragmentos de anticuerpo

Las proteínas y polipéptidos de la divulgación también pueden incluir fragmentos de anticuerpos de unión a antígenos. Los fragmentos de anticuerpos ilustrativos incluyen scFv, Fv, Fab, F(ab')₂ y fragmentos VHH de dominio único, tal como los de origen camélido.

Los fragmentos de anticuerpos monocatenarios, también conocidos como anticuerpos monocatenarios (scFv), son polipéptidos recombinantes que normalmente se unen a antígenos o receptores; estos fragmentos contienen al menos un fragmento de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable de anticuerpo (V_H) unido al menos a un fragmento de una secuencia de cadena ligera variable de anticuerpo (V_L) con o sin uno o más enlazadores de interconexión. Tal enlazador puede ser un péptido flexible y corto seleccionado para asegurar que el plegado tridimensional adecuado de los dominios V_L y V_H se produce una vez que se unen para mantener la especificidad de unión a la molécula diana del anticuerpo completo del que se obtiene el fragmento de anticuerpo monocatenario. Generalmente, el extremo carboxilo terminal de la secuencia de V_L o V_H está unida covalentemente por tal enlazador peptídico al extremo aminoácido de una secuencia de V_L y V_H complementaria. Los fragmentos de anticuerpos monocatenarios se pueden generar mediante clonación molecular, biblioteca de presentación de anticuerpos en fagos o técnicas similares. Estas proteínas pueden producirse tanto en células eucariotas como en células procariotas, incluyendo bacterias.

Los fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla contienen secuencias de aminoácidos que tienen al menos una de las regiones variables o CDR de los anticuerpos completos descritos en la presente memoria descriptiva, pero carecen de algunos o todos los dominios constantes de esos anticuerpos. Estos dominios constantes no son necesarios para la unión del antígeno, pero constituyen una parte importante de la estructura de los anticuerpos completos. Por lo tanto, los fragmentos de anticuerpos monocatenarios pueden superar algunos de los problemas asociados con el uso de anticuerpos que contienen parte o la totalidad de un dominio constante. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos monocatenarios tienden a estar libres de interacciones no deseadas entre moléculas biológicas y la región constante de cadena pesada, u otra actividad biológica no deseada. De manera adicional, los fragmentos de anticuerpos monocatenarios son considerablemente más pequeños que los anticuerpos completos y, por lo tanto, pueden tener una mayor permeabilidad capilar que los anticuerpos completos, permitiendo que los fragmentos de anticuerpos monocatenarios se localicen y se unan a los sitios de unión al antígeno diana de manera más eficaz. También, los fragmentos de anticuerpos se pueden producir a una escala relativamente grande en células procariotas, facilitando así su producción. Además, el tamaño relativamente pequeño de los fragmentos de anticuerpos monocatenarios los hace menos propensos que los anticuerpos completos a provocar una respuesta inmune en un receptor.

También se desvelan fragmentos de anticuerpos que tienen características de unión iguales o comparables a las del anticuerpo completo. Dichos fragmentos pueden contener uno o ambos fragmentos Fab o el fragmento F(ab')₂. Los fragmentos de anticuerpos pueden contener las seis CDR del anticuerpo completo, aunque los fragmentos que contienen menos de todas esas regiones, tal como tres, cuatro o cinco CDR, también son funcionales.

Producción de proteína

Las proteínas de anticuerpo-trampa de citocina se producen generalmente de forma recombinante, utilizando células de mamífero que contienen un ácido nucleico diseñado genéticamente para expresar la proteína. Aunque en los Ejemplos 1 y 2 se describe un ejemplo de una línea celular y un método de producción de proteínas adecuados, se han utilizado una amplia variedad de vectores adecuados, líneas celulares y métodos de producción de proteínas para producir productos biofarmacéuticos basados en anticuerpos y podrían utilizarse en la síntesis de estas proteínas de anticuerpos y trampa de citocinas.

Indicaciones terapéuticas

Las proteínas trampa anti-PD-L1/TGFβ descritas en la solicitud se pueden usar para tratar el cáncer o reducir el crecimiento tumoral en un paciente. Los cánceres ilustrativos incluyen colorrectal, de mama, de ovario, de páncreas, gástrico, de próstata, riñón, de cuello del útero, mieloma, linfoma, leucemia, de tiroides, endometrial, de útero, de vejiga, neuroendocrino, de cabeza y cuello, de hígado, nasofaríngeo, testicular, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, melanoma, cáncer de piel de células basales, cáncer de piel de células escamosas, dermatofibrosarcoma protuberante, carcinoma de células de Merkel, glioblastoma, glioma, sarcoma, mesotelioma y síndromes mielodisplásicos.

El cáncer o tumor que se va a tratar con un anti-PD-L1/trampa de TGFβ puede seleccionarse basándose en la expresión o expresión elevada de PD-L1 y TGFβ en el tumor, la correlación de sus niveles de expresión con el pronóstico o la progresión de la enfermedad, y la experiencia clínica y preclínica sobre la sensibilidad del tumor a los tratamientos dirigidos a PD-L1 y TGFβ. Dichos cánceres o tumores incluyen, entre otros, colorrectal, de mama, de ovario, de páncreas, gástrico, de próstata, riñón, de cuello del útero, de vejiga, de cabeza y cuello, de hígado, cáncer de pulmón no microcítico, melanoma, carcinoma de células de Merkel y mesotelioma.

Composiciones farmacéuticas

La presente invención también presenta composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína descrita en el presente documento. La composición se puede formular para su uso en varios sistemas de administración de fármacos. También se pueden incluir en la composición uno o más excipientes o vehículos fisiológicamente aceptables para una formulación adecuada. Las formulaciones adecuadas para su uso en la presente invención se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17ª ed., 1985. Para una breve revisión de los métodos para suministro de fármacos, véanse, *por ejemplo*, Langer (Science 249:1527-1533, 1990).

Las composiciones farmacéuticas están pensadas para administración parenteral, intranasal, tópica, oral o local, tal como por un medio transdérmico, para el tratamiento terapéutico. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por vía parenteral (por ejemplo, mediante inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea), o por ingestión oral, o por aplicación tópica o inyección intraarticular en áreas afectadas por la enfermedad vascular o cancerosa. Las vías de administración adicionales incluyen la administración intravascular, intraarterial, intratumoral, intraperitoneal, intraventricular, intraepidural, así como nasal, oftálmica, intraescleral, intraorbital, rectal, tópica o por inhalación de aerosol. Por lo tanto, la divulgación proporciona composiciones para administración parenteral que comprenden los agentes mencionados anteriormente disueltos o suspendidos en un vehículo aceptable, preferentemente un vehículo acuoso, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina, PBS y similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario, para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y tamponantes, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, detergentes y similares. La divulgación también proporciona composiciones para administración oral, que pueden contener ingredientes inertes tales como aglutinantes o cargas para la formulación de un comprimido, una cápsula y similares. Además, la presente divulgación proporciona composiciones para la administración local, que pueden contener ingredientes inertes como disolventes o emulsionantes para la formulación de una crema, un ungüento y similares.

Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales o pueden esterilizarse por filtración. Las soluciones acuosas resultantes se pueden envasar para su uso tal cual, o liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con un vehículo acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones estará normalmente entre 3 y 11, más preferentemente entre 5 y 9 o entre 6 y 8, y lo más preferentemente entre 7 y 8, tal como del 7 al 7,5. Las composiciones resultantes en forma sólida se pueden empaquetar en múltiples unidades de dosis única, conteniendo, cada uno, una cantidad fija del agente o agentes mencionados anteriormente, tal como en un paquete sellado de comprimidos o cápsulas. La composición en forma sólida también se puede envasar en un recipiente para una cantidad flexible, tal como en un tubo comprimible diseñado para una crema o ungüento de aplicación tópica.

La dosis óptima de anticuerpo-trampa de TGFβ se basa en el porcentaje de ocupación del receptor por parte de la fracción de anticuerpo para lograr el efecto terapéutico máximo porque la trampa de citocina se usa en un gran exceso. Por ejemplo, la dosis terapéutica para un anticuerpo monoclonal dirigido a un receptor celular se determina de manera que el nivel mínimo sea de alrededor de 10 a 100 µg/ml, *es decir*, 60 a 600 nM (para anticuerpos con una constante de disociación (K_D) de 6 nM, este nivel mínimo aseguraría que entre el 90 y el 99 % de los receptores diana en las células estén ocupados por el anticuerpo). Esto es un gran exceso de citocinas, que normalmente están presentes en pg a ng/ml en circulación.

La dosis óptima de polipéptido de anticuerpo-trampa de TGFβ dependerá de la enfermedad que se esté tratando, de la gravedad de la enfermedad y de la existencia de efectos secundarios. La dosis óptima se puede determinar mediante experimentación de rutina. Para administración parenteral una dosis entre 0,1 mg/kg y 100 mg/kg, alternativamente entre 0,5 mg/kg y 50 mg/kg, alternativamente, entre 1 mg/kg y 25 mg/kg, alternativamente entre 2 mg/kg y 10 mg/kg, alternativamente se administran y pueden administrarse entre 5 mg/kg y 10 mg/kg, por ejemplo, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez al mes por ciclo de tratamiento.

Ejemplos

La invención, que se está describiendo ahora en líneas generales, se entenderá más completamente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen simplemente con fines de ilustración de determinados aspectos de la presente divulgación.

EJEMPLO 1 - Construcción de ADN y expresión de proteínas

El anti-PD-L1/Trampa de TGFβ es una proteína de fusión anticuerpo anti-PD-L1-Receptor de TGFβ II. La cadena ligera de la molécula es idéntica a la cadena ligera del anticuerpo anti-PD-L1 (SEQ ID NO: 1). La cadena pesada de la molécula (SEQ ID NO: 3) es una proteína de fusión que comprende la cadena pesada del anticuerpo anti-PD-L1 (SEQ ID NO: 2) fusionado genéticamente a través de un enlazador flexible (Gly₄Ser)₄Gly (SEQ ID NO: 11) al extremo N-terminal del Receptor de TGFβ II soluble (SEQ ID NO: 10). En la unión de fusión, el resto de lisina C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo se mutó a alanina para reducir la escisión proteolítica. Para la expresión de anti-PD-L1/trampa de TGFβ, el ADN que codifica la cadena ligera anti-PD-L1 (SEQ ID NO: 4) y el ADN que codifica el anti-PD-L1/Receptor de TGFβ II (SEQ ID NO: 5) en el mismo vector de expresión o en vectores de expresión separados se

usaron para transfectar células de mamífero usando protocolos estándar para transfección transitoria o estable. Los medios de cultivo acondicionados se recogieron y la proteína de fusión anti-PD-L1/trampa de TGFβ se purificó mediante cromatografía de proteína A en sefarsa estándar. La proteína purificada que comprende un anticuerpo anti-PD-L1 y dos moléculas del Receptor II de TGFβ soluble (Figura 1A) tiene un peso molecular estimado (PM) de aproximadamente 190 kilodaltons en cromatografía de exclusión por tamaño y electroforesis de poliacrilamida-SDS en condiciones no reductoras. En condiciones reductoras, las cadenas ligeras y pesadas tienen PM aparentes de 28 y 75 kilodaltons, respectivamente (FIG. 1B).

La proteína de fusión anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGFβ, que contiene un polipéptido de fusión de cadena pesada análogo (SEQ ID NO: 7) y una cadena ligera con las mutaciones A31G, D52E, R99Y se preparó de forma similar en la región variable que anula la unión a PD-L1 (SEQ ID NO: 6). Se utilizó en experimentos posteriores como control de trampa de TGFβ.

EJEMPLO 2 - Producción de anti-PD-L1/trampa de TGFβ como agente bioterapéutico

Se descubrió que la anti-PD-L1/trampa de TGFβ producida por la transfección transitoria de células 293 de riñón embrionario humano (HEK) contenía diversos grados de una especie recortada, que apareció como una banda tenue con un PM aparente de aproximadamente 60 kD en SDS-PAGE en condiciones reductoras (Figura 1B). Se confirmó que esta banda era la cadena pesada de la anti-PD-L1/trampa de TGFβ escindida en un sitio en la porción N-terminal de TGFβRII cerca de la unión de fusión.

Se generaron clones estables que expresan la anti-PD-L1/trampa de TGFβ en la línea de células hospedadoras CHO-S, que fue preadaptada para el crecimiento en medio sin suero en cultivo en suspensión. Las células se transfectaron con un vector de expresión que contenía un gen que codifica la proteína anti-PD-L1-TGFβRII y un marcador de selección de glutamina sintetasa. La selección posterior de integrantes estables se realizó con L-metionina sulfoximina (MSX). Se generaron líneas celulares que expresan la anti-PD-L1/trampa de TGFβ usando un enfoque de miniagrupación, seguido de la deposición de células individuales en placas de 384 pocillos, utilizando un clasificador de células activado por fluorescencia de Beckton-Dickinson (FACS Aria II). El crecimiento, la productividad y la calidad de las proteínas se evaluaron en un ensayo de lote alimentado con plataforma genérica. Basándose en estos análisis, se seleccionaron 14 clones como candidatos principales para estudios adicionales. Se llevó a cabo un estudio de estabilidad con los clones a ~ 90 PDL (nivel de duplicación de la población) de los bancos de células de investigación establecidos durante la ampliación de los clones. Al concluir el desarrollo del minigrupo, se descubrió que la subunidad de cadena pesada-enlazador-TGFβRII sufrió un recorte, tal como se vio en la expresión transitoria. Todos los clones del estudio de estabilidad produjeron la especie recortada, aunque se demostró en el material purificado con proteína A que el porcentaje de especies recortadas en relación con la subunidad intacta variaba con cada clon. Además, se desarrolló un proceso de purificación mejorado que consiste en una cromatografía de proteína A seguida de un fuerte intercambio catiónico para reducir la copurificación de las especies recortadas. Incluso con el proceso mejorado, el material purificado con los niveles finales requeridos de especies recortadas de < 5 % solo se puede lograr utilizando clones que produzcan niveles bajos de recorte. Basándose en estos análisis combinados, el clon 02B15 se seleccionó como el clon candidato final. El análisis de la anti-PD-L1/trampa de TGFβ expresada por este clon a cero PDL, treinta PDL, sesenta PDL y noventa PDL muestra que el porcentaje de recorte no aumentó con los niveles de duplicación de la población (FIG. 2).

EJEMPLO 3 - Análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) de la unión de anti-PD-L1/trampa de TGFβ y controles al PD-L1 humano en las células

Se estudió la unión del anticuerpo anti-PD-L1 y las proteínas de fusión en células HEK transfectadas de forma estable para expresar PD-L1 humano usando el siguiente procedimiento.

Se utilizó el siguiente procedimiento de ejemplo para determinar la unión de PD-L1 mediante FACS:

- a. Se prepararon 50 µl de diluciones en serie de las muestras de prueba en tampón FACS.
- b. Se dispensaron 50 µl de células HEK transfectadas de forma estable para expresar PD-L1 humana a 5×10^6 células/ml a los pocillos con muestras de prueba y se mezclaron.
- c. Las placas se incubaron en la oscuridad sobre hielo durante 1 hora.
- d. Las células se sedimentaron a 300 x g durante 5 minutos.
- e. El sobrenadante se decantó y las células se resuspendieron en 300 µl de tampón FACS y se volvieron a sedimentar a 300 x g durante 5.
- f. Se repitió el enjuague de la muestra.
- g. Las células se resuspendieron en 100 µl de tampón FACS que contenía anti-IgG humana en cabra de IgG completa conjugada con DyLight 488, Fcy (diluida a 1:300).
- h. La placa o las placas se incubaron en la oscuridad sobre hielo durante 45 minutos.
- i. Las células se sedimentaron a 300 x g durante 5.
- j. El sobrenadante se decantó y las células se resuspendieron en 300 µl de tampón FACS y se volvieron a sedimentar a 300 x g durante 5 minutos.
- k. Se repitió el enjuague de la muestra y finalmente se resuspendieron las células en 200 µl de tampón FACS.

I. Los datos se adquirieron en FACS Caliber y se analizaron con Microsoft Excel. La CE50 se calculó mediante regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidea) con Graphpad Prism5.

Tal como se muestra en la Fig. 3, el análisis FACS mostró que la proteína de fusión anti-PD-L1/trampa de TGFβ conserva una afinidad de unión similar a la del anticuerpo anti-PD-L1 de control positivo en células HEK transfectadas de forma estable para expresar PD-L1 humana (células HEK/PD-L1). Las CE50 para anti-PD-L1/trampa de TGFβ y anti-PD-L1 son 0,116 μg/ml (0,64 nM) y 0,061 μg/ml (0,41 nM), respectivamente. La IFM (intensidad de fluorescencia media) observada fue específica para la unión a PD-L1 humana ya que no se observó IFM en las células HEK parentales que no se transfectaron. El control negativo anti-PD-L1(mut)/trampa de TGFβ no mostró ninguna unión a las células HEK transfectadas de manera estable para expresar PD-L1 humana.

EJEMPLO 4 - Determinación de la capacidad de anti-PD-L1/trampa de TGFβ para inhibir la fosforilación inducida por TGFβ de SMAD3

La capacidad de la anti-PD-L1/trampa de TGFβ para neutralizar TGFβ se determinó usando células 4T1 que llevaban un indicador de luciferasa SMAD3. En el ensayo que se detalla a continuación, la inhibición de la fosforilación de SMAD3 inducida por TGFβ se midió usando un indicador de luciferasa bajo el control del promotor de SMAD3.

Se realizó un ensayo ilustrativo para evaluar la potencia para inhibir la actividad informadora inducida por TGFβ como sigue.

1. Un día antes del estudio, se alimentaron células 4T1 que portaban el indicador de SMAD3-luciferasa.
2. El día 0, las células se sembraron en una placa Biocoat de 96 pocillos a una concentración de 5×10^4 células/pocillo en 100 μl de medio fresco y se incubaron durante la noche a 37 °C y 5 % de CO₂.
3. El día 1:

- i. Se añadieron a los pocillos 50 μl de medio completo reciente que contenía la concentración indicada de muestras de anti-PD-L1/trampa de TGFβ a ensayar o sus controles y se incubaron durante una hora. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

- ii. Se añadieron a cada pocillo 50 μl de medio completo reciente que contenía 20 ng/ml de TGFβ humano y las muestras se incubaron durante la noche (la concentración final en el pocillo es de 5 ng/ml).

4. El día 2:

- i. Se eliminaron 100 μl de sobrenadante de cultivo y se añadieron 100 μl de medio completo fresco, que contenía 150 μg/ml de D-luciferina, y las muestras se incubaron durante al menos cinco minutos.
- ii. La luminiscencia se midió usando un lector de placas Envision 2104 registrando CPM.

5. Los datos se analizaron utilizando MS Excel o Graphpad prism 5. La actividad de luciferasa se registró como CPM. La actividad inhibidora de (%) se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición (\%)} = (1 - \text{CPM de la muestra} / \text{CPM máx de la muestra tratada con anti-PD-L1}) \times 100$$

6. El ajuste de regresión no lineal se llevó a cabo utilizando dosis-respuesta sigmoidea (pendiente variable) de Graphpad prism 5. Se calcularon los valores de CI50.

La FIG. 4 muestra que la anti-PD-L1/trampa de TGFβ inhibe la actividad indicadora de pSMAD3 inducida por TGFβ de una manera dependiente de la dosis. El hecho de que el control de la anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGFβ tuviera una potencia y CI50 (concentración requerida para inhibir el 50 % de la actividad máxima) más el hecho de que el anticuerpo anti-PD-L1 no tuviera ningún efecto mostró que esta inhibición de la señalización es independiente de la actividad anti-PD-L1. Sorprendentemente, la anti-PD-L1/trampa de TGFβ fue varias veces más potente que TGFβRII-Fc (R&D Systems), que coloca el TGFβRII en el extremo N-terminal en lugar del extremo C-terminal de la proteína de fusión. También es digno de mención que la anti-PD-L1/trampa de TGFβ es significativamente más potente que 1D11 (GC1008), el anticuerpo anti-TGFβ que se probó en pacientes con melanoma maligno avanzado o carcinoma de células renales (Morris *et al.*, J Clin Oncol 2008; 26:9028 (Resumen de reunión)). En este ensayo, 1D11 y TGFβRII-Fc mostraron una actividad similar.

EJEMPLO 5 - Análisis farmacocinético (PK) en ratones

Dieciocho ratones macho C57BL/6, de 5-6 semanas de vida, fueron asignados aleatoriamente a 3 grupos (N = 6/grupo), y cada grupo recibió una de las tres proteínas (anti-PD-L1/trampa de TGFβ, anti-PD-L1(mut)/trampa de TGFβ y anti-PD-L1). Se registró el peso corporal del ratón antes de la dosificación. Después de un breve calentamiento bajo una lámpara calefactora, cada ratón recibió 120 μg de proteína en 200 μl por vía intravenosa (IV) a través de la vena de la cola independientemente de su peso corporal. Cada grupo al que se le administró la misma proteína se dividió en 2 subgrupos (n=3). Se tomaron alternativamente muestras de sangre de cada uno de los dos subgrupos, es decir, se retiró un subgrupo para las muestras de sangre a 1 h, 24 h, 72 h y 168 h, mientras que otro subgrupo fue para

muestras de sangre a 7 h, 48 h, 120 h y 240 h. En cada momento, se recogieron aproximadamente 50 µl de muestras de sangre de cada ratón a través de la vena de la cola usando un capilar de microvidrio heparinizado (100 µl de capacidad). La muestra de sangre se transfirió luego a un tubo prerrevestido con Li-Heparina y se mantuvo a 4 °C. Dentro de los 10 minutos posteriores a la recolección, las muestras de sangre se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 min. Se transfirieron al menos 20 µl de muestra de plasma a un nuevo conjunto de tubos preetiquetados y se almacenaron a -20 °C hasta el día del análisis.

El ELISA para medir la IgG humana total utilizó anti-IgG humana (H+L) de cabra (cadenas pesadas y ligeras) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) recubiertos de pocillos para captura y anti-IgG humana de ratón AffiniPure con peroxidasa, F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch Laboratories) para la detección. El ELISA para medir el anticuerpo anti-PD-L1 completamente funcional y/o la proteína de fusión utilizó pocillos recubiertos con PD-L1-Fc (dominio extracelular de PD-L1 humano fusionado a Fc) (recubiertos a 1,25 µg/ml) para captura y peroxidasa-anti-IgG humana en ratón AffiniPure, F(ab')₂ para la detección. El ELISA para medir anti-PD-L1 completamente funcional y TGFβRII intacto utilizó pocillos recubiertos con PD-L1-Fc para la captura y anti-TGFβRII humano biotinilado (R&D Systems) para la detección.

La FIG. 5A muestra que la proteína de fusión anti-PD-L1/trampa de TGFβ tenía un perfil de PK muy similar al del anticuerpo anti-PD-L1. Por ejemplo, tal como se mide por el ELISA de IgG humana total, las concentraciones séricas en el momento de 168 horas de anti-PD-L1/trampa de TGFβ y anti-PD-L1 fueron de 16,8 y 16,2 µg/ml, respectivamente, y el área bajo la curva (ABC) respectiva de 0 a 168 h fueron 4102 y 3841 h-µg/ml. De manera similar, cuando las concentraciones séricas se midieron mediante el ELISA anti-PD-L1 funcional total, las concentraciones séricas en el momento de 168 horas de anti-PD-L1/trampa de TGFβ y anti-PD-L1 fueron 9,5 y 11,1 µg/ml, respectivamente, y las respectivas ABC de 0 a 168 h fueron 3562 y 3086 h-µg/ml. La concentración sérica de la proteína de fusión anti-PD-L1/trampa de TGFβ intacta se determinó mediante ELISA, que detecta anti-PD-L1 completamente funcional y el TGFβRII fusionado. En este caso, la concentración sérica de la anti-PD-L1/trampa de TGFβ fue de 5,9 µg/ml en el momento de las 168 horas y el ABC (0 a 168 horas) fue de 2656 horas-µg/ml, que fueron algo más bajos que los del ELISA anti-PD-L1 completamente funcional, presumiblemente debido a la degradación del resto TGFβRII después de la endocitosis mediada por receptor. Se ha demostrado que la unión del anticuerpo a PD-L1 da como resultado una endocitosis mediada por PD-L1, y se sabe que una proteína de fusión anticuerpo-X sufre degradación del resto X después de la endocitosis mediada por receptor (Gillies et al, Clin Cancer Res. 2002; 8:210-6). Esto está respaldado por el descubrimiento en la FIG. 5 que cuando el resto del anticuerpo no se une a PD-L1, tal como en el control de anti-PD-L1(mut)/trampa de TGFβ, la exposición es aproximadamente 3 veces mayor, con una concentración sérica de 53 µg/ml en el momento de las 168 horas y una ABC (0 a 168 horas) de 9585 h-µg/ml, lo que sugiere que al menos parte de la eliminación está mediada por receptores.

Para confirmar la diferencia de ~ 3 veces en la exposición entre la anti-PD-L1/trampa de TGFβ y la anti-PD-L1(mut)/trampa de TGFβ, se repitió el experimento de farmacocinética y se determinaron las concentraciones de las proteínas de fusión intactas en las muestras de suero. Los ratones (ratones hembra B6.129S2, 8 semanas de vida, Jackson Lab) fueron inyectados con anti-PD-L1/trampa de TGFβ o anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGFβ (164 µg/ratón). Las concentraciones séricas de las dos proteínas de fusión se midieron mediante un ELISA utilizando Fab anti-IgG humana (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) para la captura y el anti-TGFβRII humano biotinilado (R&D Systems, Minneapolis, MN) y estreptavidina conjugada con peroxidasa (Zymed/ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY) para detectar proteínas anti-PD-L1/trampa de TGFβ intactas. Las concentraciones séricas de las proteínas de fusión intactas en varios puntos de tiempo se muestran en la Tabla siguiente y se representan en la FIG. 5B. El área total bajo la curva (ABC) hasta 336 h es 11781 h-µg/ml para la anti-PD-L1/trampa de TGFβ y 35575 h-µg/ml para la anti-PD-L1(mut)/trampa de TGFβ (Tabla 1), lo que confirma la exposición tres veces mayor de la molécula de control de trampa.

Tabla 1. Las exposiciones de la anti-PD-L1/trampa de TGFβ y el control de la anti-PD-L1(mut)/trampa de TGFβ según lo determinado por el área bajo la curva (ABC) en el gráfico de farmacocinética de la Figura 5B.

Tiempo (h)	ABC (h*µg/ml)	
	Anti-PD-L1/Trampa de TGFβ	Anti-PD-L1(mut)/TGFβ
7	72	173
24	1161	2789
48	1306	3511
72	1113	2968
120	2327	5192
168	2014	5225
240	2159	7530
336	1629	8188
total	11781	35575

EJEMPLO 6 - Endocitosis mediada por diana PD-L1 de anti-PD-L1/trampa de TGFβ

La endocitosis mediada por receptores se estudió utilizando las técnicas de extinción de Alexa Fluor 488 de acuerdo con el protocolo del fabricante (Life Technologies, Carlsbad, CA). Brevemente, las células HEK que expresan PD-L1 (células HEK/PD-L1) se incubaron con 10 µg/ml de anti-PD-L1/trampa de TGFβ conjugada con Alexa Fluor 488 en hielo durante aproximadamente 1 hora y se lavaron 4 veces con medio frío. A continuación, se pulsaron las células lavadas a 37 °C durante 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3 y 4 h para permitir la internalización. Las muestras de células en cada momento se dividieron luego en dos porciones. Una porción se incubó en hielo y se midió la fluorescencia total de la anti-PD-L1/trampa de TGFβ conjugada con Alexa Fluor 488 unida a la superficie celular e internalizada; la otra porción se incubó con anti-Alexa Fluor 488 a 4 °C durante aproximadamente una hora y se midió la fluorescencia no extingible de la anti-PD-L1/trampa de TGFβ internalizada y conjugada con Alexa Fluor 488. En la Figura 6A se muestra un gráfico que muestra una evolución temporal de la intensidad de fluorescencia media total (IFM) no inactivable de la anti-PD-L1/trampa de TGFβ a 37 °C. La cinética de internalización mediada por receptor es muy similar a la del anticuerpo anti-PD-L1, que se muestra en la FIG. 6B. El porcentaje de internalización mediada por receptor de anti-PD-L1/trampa de TGFβ y anti-PD-L1 en células HEK/PD-L1 en varios puntos de tiempo a 37 °C se muestra en la FIG. 6C, utilizando la siguiente fórmula para tener en cuenta el hecho de que el enfriamiento por el anti-Alexa Fluor 488 no es del 100 %:

$$\text{Fluorescencia internalizada} = \text{IFM total} - (\text{IFM total} - \text{IFM no inactivable})/\text{Eficacia de extinción}$$

EJEMPLO 7 - Anti-PD-L1/trampa de TGFβ demostró un efecto antitumoral superior que es sinérgico de las actividades del anti-PD-L1 y de la trampa de TGFβ en el modelo subcutáneo EMT-6 (carcinoma de mama)

Los ratones hembra de 8-12 semanas Jh (Igh-J^{tm1Dhu}) Balb/C (Taconic Farms, Hudson, NY) se inocularon con 0,5 x 10⁶ células EMT6 viables en 0,1 ml de PBS en los flancos derechos por vía subcutánea. Aproximadamente cinco días después, cuando los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 20-30 mm³, los ratones se clasificaron en grupos (N=10) de modo que los tamaños medios de los tumores de todos los grupos fueran similares y se inició el tratamiento mediante inyecciones intravenosas (día 0). El grupo 1 recibió 400 µg de control de anticuerpo de isotipo tres veces a la semana (o "eod" (en días alternos); El grupo 2 recibió 400 µg de anticuerpo anti-PD-L1 tres veces por semana; El grupo 3 recibió 164 µg de anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGFβ tres veces por semana; El grupo 4 recibió 492 µg de anti-PD-L1/trampa de TGFβ tres veces a la semana; El grupo 5 recibió 492 µg de anti-PD-L1/trampa de TGFβ dos veces por semana (equimolar a 400 µg de anticuerpo anti-PD-L1); El grupo 6 recibió 164 µg de anti-PD-L1/trampa de TGFβ tres veces a la semana; y el Grupo 7 recibió 55 µg de anti-PD-L1/trampa de TGFβ tres veces por semana. Los pesos corporales se midieron dos veces por semana para controlar la toxicidad. Los volúmenes tumorales se determinaron en diferentes momentos usando la fórmula: volumen tumoral (mm³) = largo x ancho x alto x 0,5236. Cualquier ratón con tumores de más de 2500 mm³ fue sacrificado siguiendo el protocolo de sanidad animal del instituto. La eficacia antitumoral se documentó como una relación T/C, en donde T y C son los volúmenes tumorales promedio del grupo tratado con anticuerpo o proteína de fusión, y el grupo tratado con el control de isotipo, respectivamente.

Todos los tratamientos fueron bien tolerados. La inhibición del crecimiento tumoral por los diversos tratamientos se muestra en la FIG. 7A, que mostraba los volúmenes tumorales medios de los ratones supervivientes, y la FIG. 7B, que mostró el volumen del tumor individual de los ratones supervivientes, teniendo en cuenta que los ratones con tumores de más de 2500 mm³ tuvieron que ser sacrificados. La anti-PD-L1/trampa de TGFβ demostró una potente eficacia antitumoral, logrando proporciones T/C de 0,30, 0,40 y 0,44 para los grupos de dosis alta (492 µg, Grupo 4), media (164 µg, Grupo 6) y baja (55 µg, Grupo 7), respectivamente el día 28). Mientras que el anticuerpo anti-PD-L1 (Grupo 2, T/C = 0,87, p>0,05, en el Día 16, el último día para el que se dispuso del volumen tumoral medio de todos los ratones, es decir, antes de que los ratones con tumores de más de 2500 mm³ fueran sacrificados) o el control de trampa de TGFβ (Grupo 2, T/C = 0,97 el día 16, p> 0,05) solo tuvo una eficacia marginal en este modelo, que combina los dos agentes en una sola molécula dio como resultado un efecto antitumoral sinérgico profundo. Esto es evidente en la mediana de los tiempos de supervivencia observados para la dosis de 492 µg (58 y más de 80 días, respectivamente, para la dosificación de tres veces por semana y dos veces por semana) y una dosis de 164 µg (35 días) de la proteína de fusión (prueba de rango logarítmico: p<0,0001) (FIG. 7C). Notablemente, la anti-PD-L1/trampa de TGFβ a la dosis media de 164 µg (Grupo 6), con una mediana de supervivencia de 35 días, fue mucho más eficaz que la misma dosis de anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGFβ (Grupo 3) o tres veces la dosis equivalente de anti-PD-L1 (Grupo 2), los cuales arrojaron una mediana de supervivencia de 22 días, respectivamente (prueba de rango logarítmico: p<0,0001). Esta actividad antitumoral sinérgica es especialmente sorprendente porque la exposición de la fracción de trampa de TGFβ de la dosis de 164 µg de PD-L1 (mut)/trampa de TGFβ debería ser aproximadamente 3 veces mayor que la de la dosis de 164 µg de PD-L1/Trampa de TGFβ debido a la eliminación de este último mediada por receptor (véanse los Ejemplos 5 y 6). Es notable que los tumores en ratones que recibieron la dosis alta de anti-PD-L1/trampa de TGFβ continuaron retrocediendo después de que se detuvo la dosificación el día 18 (3 de 10 del Grupo 4 y 6 de 10 del Grupo 5 con regresiones completas el día 78), lo que demuestra el efecto inmunitario antitumoral de larga duración que se dirige a los dos mecanismos inmunosupresores simultáneamente (FIG. 7C). También es de destacar que la eficacia del Grupo 4 no es mejor que la del Grupo 5, lo que sugiere que la dosis de 492 µg administrada dos veces por semana estaba cerca de la dosis de saturación, o era un régimen de dosificación más óptimo que los 492 µg administrados tres veces por semana.

El efecto protector de la inmunidad antitumoral provocada por el tratamiento con anti-PD-L1/trampa de TGF β fue evidente cuando los ratones con tumores en regresión completa fueron expuestos a 25.000 células EMT6 viables inyectadas por vía subcutánea. Mientras que los diez ratones sin exposición previa en un grupo de control desarrollaron tumores hasta un volumen tumoral promedio de 726 mm³ para el día 18 después de la exposición, ninguno de los once ratones tratados previamente con PD-L1/trampa de TGF β (tres del Grupo 4, seis del Grupo 5 y uno de cada uno de los Grupos 6 y 7) mostró ningún signo de crecimiento tumoral.

EJEMPLO 8 - Anti-PD-L1/trampa de TGF- β mostró una profunda actividad antitumoral sinérgica en el modelo de tumor subcutáneo MC38 (carcinoma colorrectal).

Los ratones hembra B6.129S2-Ighm^{tm1Cgn}/J de 8-12 semanas de vida (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) fueron inyectados con 0,5x10⁶ células tumorales MC38 viables en 0,1 ml de PBS por vía subcutánea en el flanco derecho. Aproximadamente ocho días después, cuando el tamaño promedio del tumor alcanzó aproximadamente 80-100 mm³, los ratones se clasificaron en grupos (N=10) de modo que los tamaños medios de los tumores de todos los grupos fueran similares y se inició el tratamiento mediante inyecciones intravenosas (día 0). El grupo 1 recibió 400 μ g de control de anticuerpo de isotipo; El grupo 2 recibió 400 μ g de anticuerpo anti-PD-L1; El grupo 3 recibió 133 μ g de anticuerpo anti-PD-L1; El grupo 4 recibió 492 μ g de anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGF β ; El grupo 5 recibió 164 μ g de anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGF β ; El grupo 6 recibió 492 μ g de anti-PD-L1/trampa de TGF β ; y el Grupo 7 recibió 164 μ g de anti-PD-L1/trampa de TGF β . El tratamiento se administró tres veces por semana durante dos semanas. Los pesos corporales se midieron dos veces por semana para controlar la toxicidad. Los volúmenes tumorales se determinaron en diferentes momentos usando la fórmula: volumen tumoral (mm³) = largo x ancho x alto x 0,5236. Cualquier ratón con tumores de más de 2500 mm³ fue sacrificado siguiendo el protocolo de sanidad animal del instituto. La eficacia antitumoral se documentó como una relación T/C, en donde T y C son los volúmenes tumorales promedio del grupo tratado con anticuerpo o proteína de fusión, y el grupo tratado con el control de isotipo, respectivamente.

Todos los tratamientos fueron bien tolerados. La inhibición del crecimiento tumoral por los diversos tratamientos se muestra en la FIG. 8. En el día 19 del estudio, la anti-PD-L1/trampa de TGF β demostró una potente eficacia antitumoral dependiente de la dosis, logrando proporciones T/C de 0,18 (p<0,001) y 0,38 (p<0,001) para los grupos de dosis alta (492 μ g, Grupo 6) y baja (164 μ g, Grupo 7), respectivamente. Por otra parte, ni anti-PD-L1 ni anti-PD-L1 (mut)/Trampa de TGF β mostraron actividad antitumoral en absoluto. Por lo tanto, se obtuvo una profunda actividad antitumoral sinérgica cuando el anticuerpo anti-PD-L1 y el resto de trampa de TGF β se combinaron en una molécula para dirigir a estos dos mecanismos inmunosupresores de manera simultánea.

EJEMPLO 9 - Anti-PDL1/trampa de TGF β fue eficaz en el modelo ortotópico EMT-6 de cáncer de mama metastásico.

Los ratones hembra de 8-12 semanas Jh (Igh-J^{tm1Dhu}) Balb/C (Taconic Farms, Hudson, NY) se inocularon con 0,25x10⁶ células EMT6 viables en 0,1 ml de PBS en la almohadilla mamaria derecha. Aproximadamente una semana después, cuando el tamaño medio del tumor alcanzó unos 50 mm³, los ratones se clasificaron en grupos (N=10) de modo que los tamaños medios de los tumores de todos los grupos fueran similares y se inició el tratamiento mediante inyecciones intravenosas (día 0). El grupo 1 recibió 133 μ g de control de anticuerpo de isotipo; El grupo 2 recibió 133 μ g de anticuerpo anti-PD-L1; El grupo 3 recibió 164 μ g de anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGF β ; El grupo 4 recibió 164 μ g de anti-PD-L1/trampa de TGF β ; y el Grupo 5 recibió una combinación de 133 μ g de anti-PD-L1 y 164 μ g de anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGF β . El tratamiento se repitió los días 0, 2, 4, 7, 9, 11 (es decir, 3 veces por semana durante dos semanas). Los pesos corporales se midieron dos veces por semana para controlar la toxicidad. Los volúmenes tumorales se determinaron en diferentes momentos usando la fórmula: volumen tumoral (mm³) = largo x ancho x alto x 0,5236. Cualquier ratón con tumores de más de 2500 mm³ fue sacrificado siguiendo el protocolo de sanidad animal del instituto. La eficacia antitumoral se documentó como una relación T/C, en donde T y C son los volúmenes tumorales promedio del grupo tratado con anticuerpo o proteína de fusión, y el grupo tratado con el control de isotipo, respectivamente.

Todos los tratamientos fueron bien tolerados. La inhibición del crecimiento tumoral por los diversos tratamientos se muestra en la FIG. 9. La anti-PD-L1/trampa de TGF β demostró una potente eficacia antitumoral, logrando una proporción T/C de 0,03 (p<0,001) el día 21. Por otra parte, las dosis equimolares de anti-PD-L1 o anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGF β fueron menos eficaces, dando proporciones T/C de 0,31 (p<0,001 frente al Grupo 1; p<0,001 frente al Grupo 4) y 0,68 (p<0,001 frente al Grupo 1; p<0,001 frente al Grupo 4), respectivamente. La terapia de combinación de dosis equimolares de anti-PD-L1 y anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGF β logró una eficacia antitumoral casi idéntica a la de la proteína de fusión, aunque se estimó que la exposición de la trampa de TGF β de la proteína de fusión (Grupo 4) era aproximadamente 3 veces menor que la de la anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGF β en la combinación (Grupo 5) según el análisis farmacocinético (véase el Ejemplo 5). También es notable que los tumores de los grupos 4 y 5 continuaron retrocediendo después del último día de administración, por ejemplo, el tamaño medio del tumor disminuyó de 212 mm³ el día 11, el último día de dosificación, hasta 26 mm³ el día 24 para el tratamiento con anti-PD-L1/trampa de TGF β , lo que demuestra el efecto inmunitario antitumoral de larga duración de dirigirse a los dos mecanismos inmunosupresores simultáneamente.

EJEMPLO 10 - Anti-PD-L1/trampa de TGF β tiene una mejor eficacia antitumoral que la combinación de anti-

PD-L1 y trampa de TGFβ en un modelo de carcinoma colorrectal MC38 intramuscular.

Los ratones hembra B6.129S2-Ighm^{tm1Cgn}/J de 8-12 semanas de vida (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) fueron inyectados con $0,5 \times 10^6$ células tumorales MC38 viables en 0,1 ml de PBS por vía intramuscular en el muslo derecho. Aproximadamente una semana después, cuando el tamaño medio del tumor alcanza unos 50 mm³, los ratones se clasificaron en grupos (N = 8) de modo que los tamaños medios de los tumores de todos los grupos fueran similares, y se inició el tratamiento mediante inyecciones intravenosas (día 0) y se repitió de nuevo dos días después (día 2). El grupo 1 recibió 400 µg de control de anticuerpo de isotipo; El grupo 2 recibió 400 µg de anticuerpo anti-PD-L1; El grupo 3 recibió 133 µg de anticuerpo anti-PD-L1; El grupo 4 recibió 164 µg de anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGFβ; El grupo 5 recibió 492 µg de anti-PD-L1/trampa de TGFβ; El grupo 6 recibió 164 µg de anti-PD-L1/trampa de TGFβ; y el grupo 7 recibió una combinación de 133 µg de anti-PD-L1 y 164 µg de anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGFβ. Los pesos corporales se midieron dos veces por semana para controlar la toxicidad. Los volúmenes tumorales se determinaron en diferentes momentos usando la fórmula: volumen tumoral (mm³) = largo x ancho x alto x 0,5236. Cualquier ratón con tumores de más de 2500 mm³ fue sacrificado siguiendo el protocolo de sanidad animal del instituto. La eficacia antitumoral se documentó como una relación T/C, en donde T y C son los volúmenes tumorales promedio del grupo tratado con anticuerpo o proteína de fusión, y el grupo tratado con el control de isotipo, respectivamente.

Todos los tratamientos fueron bien tolerados. La inhibición del crecimiento tumoral por los diversos tratamientos se muestra en la FIG. 10. La anti-PD-L1/trampa de TGFβ demostró una eficacia antitumoral muy potente, logrando proporciones T/C de 0,024 (p<0,001) y 0,052 (p<0,001) para los grupos de dosis alta (492 µg, Grupo 5) y baja (164 µg, Grupo 6), respectivamente, en el día 15. Por otra parte, las dosis equimolares de anti-PD-L1 fueron menos eficaces, dando proporciones T/C de 0,59 (p<0,001) y 0,45 (p<0,001) para los grupos de dosis alta (400 µg, Grupo 2) y baja (133 µg, Grupo 3), respectivamente. La anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGFβ a 164 µg (Grupo 4) fue completamente ineficaz, y cabe señalar que aunque esta dosis es equimolar con el grupo de dosis baja de anti-PD-L1/trampa de TGFβ (Grupo 6), la exposición de la trampa de TGFβ debería ser bastante similar a la del grupo de anti-PD-L1/trampa de TGFβ de dosis alta (Grupo 5) debido a las diferencias en la farmacocinética (véase el Ejemplo 5). Por lo tanto, los datos demostraron que la anti-PD-L1/trampa de TGFβ tenía una potente actividad antitumoral sinérgica en este modelo. Es especialmente digno de mención que, la anti-PD-L1/trampa de TGFβ fue más eficaz que la terapia de combinación de dosis equimolares de anti-PD-L1 y anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGFβ, que tenía una proporción de T/C de 0,16 (p<0,001 frente al Grupo 1 y p> 0,05 frente al Grupo 6) a pesar de una mayor exposición a la trampa de TGFβ de aproximadamente tres veces (véase el Ejemplo 5). Además, el tratamiento anti-PD-L1/trampa de TGFβ dio como resultado 4 de cada 10 ratones con regresión tumoral completa, mientras que la combinación de anti-PD-L1 y la trampa de control indujo una regresión completa en solo 2 de cada 10 ratones (datos no mostrados). También es notable que los tumores en los ratones tratados con anti-PD-L1/trampa de TGFβ continuaron retrocediendo después del último día de dosificación el día 2, y permanecieron completamente retrocedidos a partir de entonces (hasta al menos el día 102), lo que demuestra el efecto inmunitario antitumoral profundo y de larga duración de esta proteína de fusión. Sin quedar limitados por la teoría, los datos apoyan un mecanismo en el que la proteína de fusión anti-PD-L1/trampa de TGFβ no solo aprovecha el efecto sinérgico de bloquear las dos principales vías de escape inmunitario, sino que es superior a la terapia combinada debido a que una sola entidad molecular se dirige al microambiente del tumor. Muchas citocinas inmunosupresoras secretadas por células tumorales o células inmunitarias subvertidas (por ejemplo, macrófagos asociados a tumores, células supresoras derivadas de mieloides) tienen funciones autocrinas o paracrinas. Por lo tanto, la anti-PD-L1/trampa de TGFβ tiene la capacidad de administrar la trampa de TGFβ al microambiente tumoral mediante la unión a PD-L1 + células tumorales, en donde la trampa neutraliza el TGFβ secretado localmente. Además, en lugar de actuar como un sumidero de TGFβ ligado que se acumula en la circulación, el TGFβ unido a anti-PD-L1/trampa de TGFβ podría destruirse eficazmente a través de la endocitosis mediada por el receptor de PD-L1 (Ejemplos 5 y 6).

EJEMPLO 11 - Tratamiento con anti-PDL1/Trampa de TGFβ o combinación de anti-PD-L1 y control de trampa de TGFβ a una exposición equivalente en el modelo ortotópico EMT-6 de cáncer de mama metastásico.

En dosis equimolares, la anti-PDL1/trampa de TGFβ tuvo una eficacia similar a la combinación de control de anti-PD-L1 y la trampa de TGFβ en el modelo de cáncer de mama EMT-6 ortotópico (Ejemplo 9). En el siguiente estudio, se evaluó la eficacia de la anti-PDL1/trampa de TGFβ o la combinación de control de la trampa anti-PD-L1 y TGFβ administrada para una exposición equivalente.

Los ratones hembra de 8-12 semanas Jh (Igh-J^{tm1Dhu}) Balb/C (Taconic Farms, Hudson, NY) se inocularon con $0,25 \times 10^6$ células EMT6 viables en 0,1 ml de PBS en la almohadilla mamaria derecha. Aproximadamente una semana después, cuando el tamaño medio del tumor alcanzó unos 80 mm³, los ratones se clasificaron en grupos (N=12) de modo que los tamaños medios de los tumores de todos los grupos fueran similares, y se inició el tratamiento mediante inyecciones intravenosas el día 0 y se repitió de nuevo 7 días después. El grupo 1 recibió 133 µg de control de anticuerpo de isotipo; El grupo 2 recibió 164 µg de anti-PD-L1/trampa de TGFβ; El grupo 3 recibió 55 µg de anti-PD-L1/trampa de TGFβ; El Grupo 4 recibió una combinación de 133 µg de anti-PD-L1 y 55 µg de anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGFβ; y el Grupo 5 recibió una combinación de 44,3 µg de anti-PD-L1 y 18,3 µg de anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGFβ. Los pesos corporales se midieron dos veces por semana para controlar la toxicidad. Los volúmenes tumorales se determinaron en diferentes momentos usando la fórmula: volumen tumoral (mm³) = largo x ancho x alto x 0,5236. Cualquier ratón con tumores de más de 2500 mm³ fue sacrificado siguiendo el protocolo de sanidad animal del instituto.

La eficacia antitumoral se documenta como una proporción de T/C, en donde T y C son los volúmenes tumorales promedio del grupo tratado con anticuerpo o proteína de fusión, y el grupo tratado con el control de isotipo, respectivamente.

- 5 Todos los tratamientos fueron bien tolerados. La anti-PD-L1/trampa de TGF β y la terapia de combinación demostraron una potente eficacia antitumoral a ambos niveles de dosis ensayados.

EJEMPLO 12 - Anti-PD-L1/trampa de TGF- β tiene mejor eficacia antitumoral que la combinación de anti-PD-L1 y trampa de TGF β administrada para dar una exposición equivalente en un modelo de carcinoma colorrectal MC38 intramuscular.

Los resultados del Ejemplo 10 sugirieron que, a dosis equimolares, la anti-PD-L1/trampa TGF- β tiene una mejor eficacia antitumoral que la combinación de control de anti-PD-L1 y trampa de TGF β incluso aunque la exposición *in vivo* del control de la anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGF β es aproximadamente 3 veces la de la anti-PD-L1/trampa de TGF β (Ejemplo 5). En un estudio de seguimiento se comparó la eficacia antitumoral de la anti-PD-L1/trampa de TGF β y la combinación de anti-PD-L1 y anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGF β basada en la misma exposición. Se administraron dosis más bajas que en el Ejemplo 10 para evitar una dosificación cercana a los niveles de saturación.

Los ratones hembra B6.129S2-Ighm^{tm1Cgn}/J de 8-12 semanas de vida (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) fueron inyectados con 0,5x10⁶ células tumorales MC38 viables en 0,1 ml de PBS por vía intramuscular en el muslo derecho. Una semana después, cuando el tamaño medio del tumor alcanzó unos 200 mm³, los ratones se clasificaron en grupos (N=12) de modo que los tamaños medios de los tumores de todos los grupos fueran similares. Se inició el tratamiento mediante inyecciones intravenosas (día 0) y se repitió de nuevo el día 4. El grupo 1 recibió 133 μ g de control de anticuerpo de isotipo; el grupo 2 recibió 164 μ g de anti-PD-L1/trampa de TGF β ; el grupo 3 recibió 55 μ g de anti-PD-L1/trampa de TGF β ; el Grupo 4 recibió una combinación de 133 μ g de anti-PD-L1 y 55 μ g de anti-PD-L1 (mut)/trampa TGF β ; y el Grupo 5 recibió una combinación de 44,3 μ g de anti-PD-L1 y 18,3 μ g de anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGF β . Los pesos corporales se midieron dos veces por semana para controlar la toxicidad. Los volúmenes tumorales se determinaron en diferentes momentos usando la fórmula: volumen tumoral (mm³) = largo x ancho x alto x 0,5236. Cualquier ratón con tumores de más de 2500 mm³ fue sacrificado siguiendo el protocolo de sanidad animal del instituto. La eficacia antitumoral se documenta como una proporción de T/C, en donde T y C son los volúmenes tumorales promedio del grupo tratado con anticuerpo o proteína de fusión, y el grupo tratado con el control de isotipo, respectivamente.

Todos los tratamientos fueron bien tolerados. La anti-PD-L1/trampa de TGF β demostró una eficacia antitumoral muy potente, lograr proporciones de T/C de 0,13 (p<0,001) y 0,19 (p<0,001) para los grupos de dosis intermedia (164 μ g, Grupo 2, llamado dosis intermedia en relación con la dosis alta de 492 μ g que parecía estar saturando en el Ejemplo 10) y baja (55 μ g, Grupo 3), respectivamente, en el día 9. Por otra parte, la combinación de anti-PD-L1 y anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGF β fue menos eficaz, dando proporciones de T/C de 0,34 (p<0,001) y 0,37 (p<0,001) para los grupos de dosis intermedia (Grupo 4) y baja (Grupo 5), respectivamente (Fig. 12A o Tabla). Es especialmente digno de mención que cuando se administra para dar una exposición equivalente *in vivo* del anticuerpo anti-PD-L1 y del componente de trampa de TGF β , la anti-PD-L1/trampa de TGF β fue significativamente más eficaz que la terapia combinada de anti-PD-L1 y anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGF β en ambos niveles de dosis (en la dosis intermedia, T/C de 0,13 para anti-PD-L1/trampa de TGF β frente a 0,34 para la combinación p<0,0001 (Fig. 12B); a la dosis baja, T/C de 0,19 para la anti-PD-L1/trampa de TGF β frente a 0,37 para la combinación p<0,0001 (Fig. 12C)).

EJEMPLO 13 - Anti-PD-L1 (YW)/trampa de TGF β tiene un efecto antitumoral superior que es sinérgico de las actividades del anti-PD-L1 y de la trampa de TGF β en el modelo ortotópico EMT-6 (carcinoma de mama).

YW243.55S70 es un anticuerpo humano que reconoce PD-L1 tanto humano como murino (publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º US2010/0203056 A1). Su secuencia de región variable de la cadena pesada (VH) y la secuencia de región variable de la cadena ligera (VL) (proporcionada como el SEQ ID NO: 14 y el SEQ ID NO: 13, respectivamente) se utilizaron para reemplazar las correspondientes secuencias de región variable de la anti-PD-L1/trampa de TGF β descrita en el Ejemplo 1 para dar anti-PD-L1 (YW)/trampa de TGF β mediante técnicas estándar de biología molecular. Después de la construcción del ADN que codifica la anti-PD-L1 (YW)/trampa de TGF β , la proteína de fusión del anticuerpo se expresó tal como se describe en el Ejemplo 1. El anticuerpo anti-PD-L1 YW243.55S70 se expresa de forma similar para comparar la eficacia en modelos de tumores murinos.

Los ratones hembra de 8-12 semanas Jh (Igh-Jtm1Dhu) Balb/C (Taconic Farms, Hudson, NY) se inocularon con 0,25x10⁶ células EMT6 viables en 0,1 ml de PBS en la almohadilla mamaria derecha. Aproximadamente una semana después, cuando el tamaño promedio del tumor alcanzó aproximadamente 50-100 mm³, los ratones se clasificaron en grupos (N=10) de modo que los tamaños medios de los tumores de todos los grupos fueran similares y se inició el tratamiento mediante inyecciones intravenosas (día 0). El grupo 1 recibió 133 μ g de control de anticuerpo de isotipo; El grupo 2 recibió 133 μ g de anticuerpo anti-PD-L1 (YW); El grupo 3 recibió 164 μ g de anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGF β ; El grupo 4 recibió 164 μ g de anti-PD-L1 (YW)/trampa de TGF β ; y el grupo 5 recibió una combinación de 133 μ g de anti-PD-L1 (YW) y 164 μ g de anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGF β . El tratamiento se repitió los días 4 y 7. Los pesos corporales se midieron dos veces por semana para controlar la toxicidad. Los volúmenes tumorales se

determinaron en diferentes puntos de tiempo usando la fórmula volumen tumoral (mm^3) = largo x ancho x alto x 0,5236. Cualquier ratón con tumores de más de 2500 mm^3 fue sacrificado siguiendo el protocolo de sanidad animal del instituto. La eficacia antitumoral se documenta como una proporción de T/C, en donde T y C son los volúmenes tumorales promedio del grupo tratado con anticuerpo o proteína de fusión, y el grupo tratado con el control de isotipo, respectivamente.

Todos los tratamientos fueron bien tolerados. La inhibición del crecimiento tumoral por los diversos tratamientos se muestra en la FIG. 13A, que mostró los volúmenes tumorales promedio de los ratones el día 17, el último día para el que se dispuso del volumen tumoral medio de todos los ratones, es decir, antes que los ratones con tumores de más de 2500 mm^3 fueran sacrificados. La anti-PD-L1 (YW)/trampa de TGF β demostró una potente eficacia antitumoral, logrando una proporción T/C de 0,25 ($p < 0,0001$) que es ligeramente mejor que la del tratamiento combinado en el Grupo 5 (T/C = 0,31, $p < 0,0001$), pero superior a la del anticuerpo anti-PD-L1(YW) en el Grupo 2 (T/C=0,57, $p < 0,0001$) y el control de la trampa TGF β en el Grupo 3 (T/C=0,66, $p < 0,0001$). El efecto antitumoral sinérgico de la proteína de fusión del anticuerpo también resultó en una supervivencia prolongada de los ratones tratados, tal como se muestra en la FIG. 13B. El grupo tratado con anti-PD-L1/trampa de TGF β tuvo una mediana de tiempo de supervivencia de 65 días, que fue significativamente mejor que el del grupo tratado con anticuerpo anti-PD-L1 (YW) (24 días) o el grupo tratado con el control de trampa de TGF β (21 días). También se compara favorablemente con la mediana del tiempo de supervivencia de 53,5 días para el grupo de tratamiento combinado. A pesar de que la dosificación se detuvo después del día 7, la inhibición continua del crecimiento tumoral y la supervivencia prolongada de los ratones tratados con anti-PD-L1 (YW)/trampa de TGF β demuestran el efecto antitumoral inmunitario de larga duración resultante del bloqueo doble de las dos vías inmunosupresoras principales.

EJEMPLO 14 - Anti-PD-L1 (YW)/trampa de TGF- β tiene un efecto antitumoral superior que es sinérgico de las actividades del anti-PD-L1 y de la trampa de TGF β en el modelo de tumor intramuscular MC38 (carcinoma colorrectal)

Los ratones hembra B6.129S2-Ighm^{tm1Cgn}/J de 8-12 semanas de vida (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) fueron inyectados con $0,5 \times 10^6$ células tumorales MC38 viables en 0,1 ml de PBS por vía intramuscular en el muslo derecho. Aproximadamente una semana después, cuando el tamaño medio del tumor alcanza unos 150-200 mm^3 , los ratones se clasificaron en grupos (N = 10) de modo que los tamaños medios de los tumores de todos los grupos fueran similares, y se inició el tratamiento mediante inyecciones intravenosas (día 0) y se repitió de nuevo cuatro días después (día 4). El grupo 1 recibió 133 μg de control de anticuerpo de isotipo; El grupo 2 recibió 133 μg de anticuerpo anti-PD-L1(YW); El grupo 3 recibió 164 μg de anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGF β ; El grupo 4 recibió 164 μg de anti-PD-L1 (YW)/trampa de TGF β ; y el grupo 5 recibió una combinación de 133 μg de anti-PD-L1 (YW) y 164 μg de anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGF β . Los pesos corporales se midieron dos veces por semana para controlar la toxicidad. Los volúmenes tumorales se determinaron en diferentes puntos de tiempo usando la fórmula volumen tumoral (mm^3) = largo x ancho x alto x 0,5236. Cualquier ratón con tumores de más de 2500 mm^3 fue sacrificado siguiendo el protocolo de sanidad animal del instituto. La eficacia antitumoral se documentó como una relación T/C, en donde T y C son los volúmenes tumorales promedio del grupo tratado con anticuerpo o proteína de fusión, y el grupo tratado con el control de isotipo, respectivamente.

Todos los tratamientos fueron bien tolerados. La inhibición del crecimiento tumoral por los diversos tratamientos se muestra en la FIG. 14A, que mostró los volúmenes tumorales promedio de los ratones el día 10, el último día para el que se dispuso del volumen tumoral medio de todos los ratones. La anti-PD-L1(YW)/trampa de TGF β demostró una eficacia antitumoral muy potente, logrando una proporción T/C de 0,14 ($p < 0,0001$) que es ligeramente mejor que la del tratamiento combinado en el Grupo 5 (T/C = 0,19, $p < 0,0001$), pero superior a la del anticuerpo anti-PD-L1(YW) en el Grupo 2 (T/C=0,34, $p < 0,0001$) y el control de la trampa TGF β en el Grupo 3 (T/C=0,99, $p < 0,0001$), que no tuvo actividad en este modelo. La eficacia antitumoral de la anti-PD-L1 (YW)/trampa de TGF β se confirmó adicionalmente mediante mediciones del peso tumoral tomadas el día 11. En este momento, el grupo de control de isotipo tuvo que ser sacrificado porque los tumores habían crecido más de 2500 mm^3 . Por lo tanto, el experimento se terminó y todos los grupos se sacrificaron y se determinaron los pesos tumorales. Los pesos tumorales individuales se muestran en la FIG. 14B. El análisis de los pesos tumorales confirmó que la terapia anti-PD-L1 (YW)/trampa de TGF β inhibió significativamente el crecimiento del tumor MC38 (T/C = 0,13; $p < 0,0001$). La eficacia de la anti-PD-L1 (YW)/trampa de TGF β fue significativamente mejor que la observada con anti-PD-L1 (T/C = 0,37; $p = 0,003$) o el control de la trampa de TGF β (T/C = 1,0, $p < 0,0001$). La eficacia antitumoral de la anti-PD-L1 (YW)/trampa de TGF β , basado en el análisis del peso tumoral, no fue estadísticamente mejor que los ratones tratados con la combinación de anti-PD-L1 y el control de trampa de TGF β (T/C = 0,17; $p = 0,96$).

EJEMPLO 15 - El tratamiento combinado de Anti-PD-1 y trampa de TGF β no proporciona ningún efecto antitumoral aditivo en un modelo ortotópico EMT-6 (carcinoma de mama)

En este estudio, los presentes inventores probaron si el tratamiento combinado de anti-PD-1 y trampa de TGF β proporciona algún efecto antitumoral aditivo en el modelo ortotópico EMT-6. CT-011, también conocido como pidilizumab, es un anticuerpo anti-PD1 humano humanizado que se probó en la clínica para el tratamiento de neoplasias hematológicas (Berger et al, Clin Cancer Res. 2008; 14:3044-3051). También reconoce la PD-1 murina y ha demostrado una actividad antitumoral que sinergiza con la ciclofosfamida y el tratamiento con vacunas en modelos

de tumores singénicos (Mkrtichyan *et al.*, Eur J Immunol. 2011; 41:2977-86). Las secuencias VH y VL de CT-011 se utilizaron para producir un anticuerpo recombinante con regiones constantes de IgG1/kappa humanas mediante técnicas convencionales de biología molecular.

- 5 Los ratones hembra de 8-12 semanas Jh (Igh-Jtm1Dhu) Balb/C (Taconic Farms, Hudson, NY) se inocularon con $0,25 \times 10^6$ células EMT6 viables en 0,1 ml de PBS en la almohadilla mamaria derecha. Aproximadamente una semana después, cuando el tamaño medio del tumor alcanzó unos 100 mm³, los ratones se clasificaron en grupos (N=10) de modo que los tamaños medios de los tumores de todos los grupos fueran similares y se inició el tratamiento mediante inyecciones intravenosas (día 0). El grupo 1 recibió 364 µg de control de anticuerpo de isotipo; El grupo 2 recibió 164 µg de anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGFβ, que sirvió como control de la trampa de TGFβ; El grupo 3 recibió 200 µg de anti-PD-1 (CT-011); y el grupo 4 recibió una combinación de 200 µg de anti-PD-1 (CT-011) y 164 µg de anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGFβ de control. El tratamiento se repitió los días 2, 4, 7, 9 y 11, es decir, 3 veces por semana durante dos semanas. Los pesos corporales se midieron dos veces por semana para controlar la toxicidad. Los volúmenes tumorales se determinaron en diferentes puntos de tiempo usando la fórmula volumen tumoral (mm³) = largo x ancho x alto x 0,5236. Cualquier ratón con tumores de más de 2500 mm³ fue sacrificado siguiendo el protocolo de sanidad animal del instituto. La eficacia antitumoral se documentó como una relación T/C, en donde T y C son los volúmenes tumorales promedio del grupo tratado con anticuerpo o proteína de fusión, y el grupo tratado con el control de isotipo, respectivamente.
- 20 Todos los tratamientos fueron bien tolerados. El anti-PD-1 (CT-011) mostró una eficacia antitumoral muy modesta (T/C = 0,87, p> 0,05) en este modelo, mientras que su combinación con el control de trampa de TGFβ tuvo la misma eficacia que el control de trampa de TGFβ solo (Figura 15).

EJEMPLO 16 - El tratamiento combinado de Anti-PD-1 y trampa de TGFβ no proporciona ningún efecto antitumoral aditivo en un modelo de tumor intramuscular MC38 (carcinoma colorrectal).

- En este estudio, los presentes inventores probaron si el tratamiento combinado de anti-PD-1 y trampa de TGFβ proporciona algún efecto antitumoral aditivo en el modelo de tumor colorrectal intramuscular MC38. Los ratones hembra B6.129S2-Ighm^{tm1Cgn}/J de 8-12 semanas de vida (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) fueron inyectados con $0,5 \times 10^6$ células tumorales MC38 viables en 0,1 ml de PBS por vía intramuscular en el muslo derecho. Aproximadamente una semana después, cuando el tamaño medio del tumor alcanza unos 190 mm³, los ratones se clasifican en grupos (N = 10) de modo que los tamaños medios de los tumores de todos los grupos sean similares, y se inicia el tratamiento mediante inyecciones intravenosas (día 0). El grupo 1 recibió 364 µg de control de anticuerpo de isotipo los días 0, 2, 4 y 7; El grupo 2 recibió 164 µg del control de anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGFβ los días 0 y 2; El grupo 3 recibió 200 µg de anti-PD-1 (CT-011) los días 0, 2, 4 y 7; y el grupo 4 recibió una combinación de 200 µg de anti-PD-1 (CT-011) los días 0, 2, 4 y 7, y 164 µg de control de anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGFβ los días 0 y 2. Los pesos corporales se midieron dos veces por semana para controlar la toxicidad. Los volúmenes tumorales se determinaron en diferentes puntos de tiempo usando la fórmula volumen tumoral (mm³) = largo x ancho x alto x 0,5236. Cualquier ratón con tumores de más de 2500 mm³ fue sacrificado siguiendo el protocolo de sanidad animal del instituto. La eficacia antitumoral se documentó como una relación T/C, en donde T y C son los volúmenes tumorales promedio del grupo tratado con anticuerpo o proteína de fusión, y el grupo tratado con el control de isotipo, respectivamente.

- 45 Todos los tratamientos fueron bien tolerados. El anti-PD-1 (CT-011) mostró una eficacia antitumoral muy modesta (T/C = 0,87, p>0,05), mientras que el control de anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGFβ no tuvo eficacia en este modelo, tal como se ve en ejemplos anteriores. La combinación de anti-PD-1 (CT-011) con la trampa de TGFβ de control no tuvo ninguna eficacia (FIG. 15).

EJEMPLO 17 - El tratamiento combinado de la trampa de TGFβ con anti-LAG3 o anti-TIM-3 no proporciona ningún efecto antitumoral aditivo en un modelo ortotópico EMT-6 (carcinoma de mama)

- En este estudio, los presentes inventores probaron si el tratamiento de combinación de la trampa de TGFβ con anti-LAG3 o anti-TIM3 proporciona algún efecto antitumoral aditivo en el modelo ortotópico de tumor de mama EMT-6. El anticuerpo anti-LAG3 utilizado es un anticuerpo anti-LAG3 murino monoclonal IgG1 de rata C9B7W (BioXcell, Beverly, MA), que demostró tener sinergia con el tratamiento anti-PD-1 murino en modelos de tumores singénicos (Woo *et al*, Cancer Res, 2011; 72:917-27). El anticuerpo anti-TIM-3 utilizado es un anticuerpo anti-TIM3 murino monoclonal IgG2a de rata RMT3-23 (BioXcell, Beverly, MA), que también demostró tener sinergia con el tratamiento anti-PD-1 murino en modelos de tumores singénicos, aunque su eficacia como agente único fue relativamente modesta (Ngiow *et al*, Cancer Res, 2011; 71:3540-51).

- 60 Los ratones hembra de 8-12 semanas Jh (Igh-Jtm1Dhu) Balb/C (Taconic Farms, Hudson, NY) se inocularon con $0,25 \times 10^6$ células EMT6 viables en 0,1 ml de PBS en la almohadilla mamaria derecha. Aproximadamente una semana después, cuando el tamaño medio del tumor alcanzó unos 110 mm³, los ratones se clasificaron en grupos (N=9) de modo que los tamaños medios de los tumores de todos los grupos fueran similares y se inició el tratamiento mediante inyecciones intravenosas (día 0). El grupo 1 recibió 133 µg de control de anticuerpo de isotipo; El grupo 2 recibió 164 µg del control de anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGFβ; El grupo 3 recibió 200 µg de anti-LAG3; El grupo 4 recibió 250 µg de anti-TIM3; El grupo 5 recibió una combinación de 200 µg de anti-LAG3 y 164 µg de control de anti-PD-L1

(mut)/trampa de TGF β ; y el Grupo 6 recibió una combinación de 250 μ g de anti-TIM3 y 164 μ g de control de anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGF β . El tratamiento se repitió los días 2, 4, 7, 9 y 11, es decir, 3 veces por semana durante dos semanas. Los pesos corporales se midieron dos veces por semana para controlar la toxicidad. Los volúmenes tumorales se determinaron en diferentes puntos de tiempo usando la fórmula volumen tumoral (mm^3) = largo x ancho x alto x 0,5236. Cualquier ratón con tumores de más de 2500 mm^3 fue sacrificado siguiendo el protocolo de sanidad animal del instituto. La eficacia antitumoral se documentó como una relación T/C, en donde T y C son los volúmenes tumorales promedio del grupo tratado con anticuerpo o proteína de fusión, y el grupo tratado con el control de isotipo, respectivamente.

Como se ha observado anteriormente, el control de anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGF β (Grupo 2) mostró una eficacia muy modesta en este modelo EMT-6. Anti-TIM3 (Grupo 4) como agente único mostró una eficacia igualmente modesta que la trampa de control, y en la terapia de combinación con la trampa de control (Grupo 6) no mostró ningún efecto aditivo. Anti-LAG3 como agente único (Grupo 3) o en terapia combinada con la trampa de control (Grupo 5) no mostró ninguna eficacia.

EJEMPLO 18 - El tratamiento combinado de la trampa de TGF β con anti-LAG3 o anti-TIM-3 no proporciona ningún efecto antitumoral aditivo en un modelo intramuscular MC38 (carcinoma colorrectal)

En este estudio, los presentes inventores probaron si el tratamiento combinado de la trampa de TGF β con anti-LAG3 (C9B7W) o anti-TIM3 (RMT3-23) proporciona algún efecto antitumoral aditivo en el modelo de tumor colorrectal MC38 intramuscular.

Los ratones hembra B6.129S2-Ighm^{tm1Cgn}/J de 8-12 semanas de vida (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) fueron inyectados con $0,5 \times 10^6$ células tumorales MC38 viables en 0,1 ml de PBS por vía intramuscular en el muslo derecho. Aproximadamente una semana después, cuando el tamaño medio del tumor alcanza unos 50 mm^3 , los ratones se clasificaron en grupos (N=8) de modo que los tamaños medios de los tumores de todos los grupos fueran similares y se inicia el tratamiento mediante inyecciones intravenosas (día 0). El grupo 1 recibió 133 μ g de control de anticuerpo de isotipo; El grupo 2 recibió 164 μ g del control de anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGF β ; El grupo 3 recibió 200 μ g de anti-LAG3; El grupo 4 recibió 250 μ g de anti-TIM3; El grupo 5 recibió una combinación de 200 μ g de anti-LAG3 y 164 μ g de control de anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGF β ; y el Grupo 6 recibió una combinación de 250 μ g de anti-TIM3 y 164 μ g de control de anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGF β . El tratamiento se repitió los días 2, 4, 7, 9, 11, 15 y 18. Los pesos corporales se midieron dos veces por semana para controlar la toxicidad. Los volúmenes tumorales se determinaron en diferentes puntos de tiempo usando la fórmula volumen tumoral (mm^3) = largo x ancho x alto x 0,5236. Cualquier ratón con tumores de más de 2500 mm^3 fue sacrificado siguiendo el protocolo de sanidad animal del instituto. La eficacia antitumoral se documentó como una relación T/C, en donde T y C son los volúmenes tumorales promedio del grupo tratado con anticuerpo o proteína de fusión, y el grupo tratado con el control de isotipo, respectivamente.

Como se ha observado anteriormente, el control de anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGF β (Grupo 2) no tuvo ninguna eficacia en este modelo MC38. Anti-LAG3 como agente único (Grupo 3) mostró una eficacia moderada, logrando un T/C de 0,66 ($p < 0,05$). Sin embargo, la combinación con el control de trampa (Grupo 5) no mejoró su eficacia. Anti-TIM3 como agente único (Grupo 4) o en terapia combinada con la trampa de control (Grupo 6) no mostró ninguna eficacia.

SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1

Secuencia de péptidos de la cadena ligera lambda de anti-PD-L1 secretada

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGINVSWYQQHFGKAPKLMIIYDVSNRPSGVSNRF
SGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVFGTGTGKVTVLGQPKANPTVTLFFPSSEE
LQANKATLVCLISDFYFGAVTFVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKKYAASSYLSLTPEQWKSH
RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO: 2

Secuencia de péptidos de la cadena H secretada de anti-PDL1

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSSGGITFYADTV
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGTLLTVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPFVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

SEQ ID NO: 3

Secuencia de péptidos de la cadena H secretada de anti-PDL1/trampa de TGFβ

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSSGGITFYADTV
KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTPTVDYWGQGTLLTVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTEPEVTCVVVDVSHEDPEVKENWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNKG

EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GAGGGGSGGGGSGGGGSGGGSGIPEHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQ
KSCMSNCSITSIKEKPQEVCAVVRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPRCIMKEKKK
PGETTFMCSGSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

SEQ ID NO: 4

Secuencia de ADN desde el codón de inicio de la traducción al codón de parada de la traducción de la cadena ligera lambda de anti-PD-L1 (la secuencia líder que precede a la VL es el péptido señal del activador del plasminógeno uroquinasa)

atgagggccttgcctgactgctgctgtgctggtcgtgtccgacagcaagggcCAGT
CCGCCCTGACCCAGCCTGCCCTCCGTGTCTGGCTCCCTGGCCAGTCCATCACCATCAGCTGCAC
CGGCACCTCCAGCGACGTGGGCGGCTACAACTACGTGTCTCTGGTATCAGCAGCACCCCGGCAAG
GCCCCAAGCTGATGATCTACGACGTGTCCAACCGGCCCTCCGGCGTGTCCAACAGATTCTCCG
GCTCCAAGTCCGGCAACACCGCCTCCCTGACCATCAGCGGACTGCAGGCAGAGGACGAGGCCGA
CTACTACTGCTCCTCCTACACCTCCTCCAGCACCAGAGTGTTCGGCACCGGCACAAAAGTGACC
GTGCTGggccagcccaaggccaaaccccaaccgtgacaactgttccccccatcctccgaggaaactgc
aggccaaacaaggccaccctggtctgctgatctcagatttctatccaggcgccgtgaccgtggc
ctggaaggctgatggctccccagtgaaaggccggcgtggaaaccaccaagccctccaagcagtc
aacaacaataacgccgcctcctcctacctgtccctgaacccccgagcagtggaagtcaccaccgt
cctacagctgccaggtcacacacgagggctccaccgtggaaaagaccgtcgccccaccgagtg
ctcaTGA

SEQ ID NO: 5

Secuencia de ADN desde el codón de inicio de la traducción al codón de terminación de la traducción (líder de mVK SP: pequeño subrayado; VH: mayúsculas; IgG1m3 con mutación de K a A: letras minúsculas; enlazador (G4S)x4-G: letras mayúsculas en negrita; TGFβRII: letras minúsculas subrayadas en negrita; dos codones de parada: letras mayúsculas subrayadas en negrita)

atggaaacagacaccctgctgctgtgggtgctgctgctgtgggtgcccggctccacagggcGAGG
TGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTGTCTTGCGC
CGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCAGCTACATCATGATGTGGGTGCGACAGGCCCCCTGGCAAGGGC
CTGGAATGGGTGTCTCCATCTACCCCTCCGGCGGCATCACCTTCTACGCCGACACCGTGAAGG
GCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAACCTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCG
GGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGATCAAGCTGGGCACCGTGACCACCGTGGAC
TACTGGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTCCGctagcaccacagggcccatcggtcttcc
ccctggcaccctctcccaagagcacctctgggggacagcgccctgggctgctggtcaagga
ctaactccccgaaccggtgacggtgtctgtggaactcaggcgccctgaccagcggtgacacac
ttcccggtgtctctacagtctcaggactctactccctcagcagcggtggtgaccgtgccctcca
gcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtgga
caagagagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaa
ctcctggggggacggtcagttcttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctccc
ggaccctgaggtcacatgcgtggtgggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaa

ctggtacgtggacggcggtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgaggagcagttacaac
agcacgtaccgtgtggtcagcgctcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagt
acaagtgcagggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaa
agggcagccccgagaaccacaggtgtacacccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaac
caggtcagcctgacctgcttgggtcaaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggaga
gcaatgggcagccggagaaactacaagaccacgctcccggtgctggactccgacggctcctt
cttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcctatgc
tcctgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtccccgggtg
ctGGCGGCGGAGGAAGCGGAGGAGGTGGCAGCGGTGGCGGTGGCTCCGGCGGAGGTGGCTCCGG
Aatccctccccacgtgcagaagtccgtgaacaacgacatgatcgtgaccgacaacaacggcgcc
gtgaagtccctcagctgtgcaagttctgcgacgtgaggttcagcacctgcgacaaccagaagt
cctgcatgagcaactgcagcatcacaagcatctgcgagaagccccaggaggtgtgtgtggccgt
gtggaggaagaacgacgaaaacatcacccctcgagaccgtgtgcatgaccccaagctgcccac
cacgaactcatcctggaagacgcccctcccccaagtgcacatcatgaaggagaagaagaagcccg
gcgagacctcttcatgtgcagctgcagcagcgacgagtgcaatgacaacatcatctttagcga
ggagtacaacaccagcaaccccgacTGATAA

5 **SEQ ID NO: 6**

Secuencia polipeptídica de la cadena ligera lambda secretada de la anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGFβ, con mutaciones A31G, D52E, R99Y

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIEVSNRPSGVSNRF
SGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTYVFGTGTKVTVLGQPKANPTVTLFFPSSEE
LQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH
RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

10

SEQ ID NO: 7

Secuencia polipeptídica de la cadena pesada secretada de la anti-PD-L1 (mut)/trampa de TGFβ

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSMYMMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSSGGITFYADSV
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARIKLGTVTTVDYWGQGLTVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPESREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHAEALHNHYTQKSLSLSP
GAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGIIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQ
KSCMSNCSITSIKPKQEVCAVVRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKK
PGETFFMCSGSSDECNDNIIIFSEEYNTSNPD

15

SEQ ID NO: 8

Polipéptido precursor de la isoforma A del TGFβRII humano (RefSeq del NCBI con N.º de registro: NP 001020018)

MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSDVEMEAQKDEIICPSCNRTAHPLRHINNDMIVT
 DNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHD
 PKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIQV
 TGISLLPPLGVAISVIIIFYCYRVNRQOKLSSTWETGKTRKLMFESEHCIILEDSDISSTC
 ANNINHNTELLFIELDTLVGKGRFAEVYKAKLKQNTSEQFETVAVKIFPYEEYASWKTEKDIFS
 DINLKHENILQFLTAERKTELKGQYWLITAFHAKGNLQEYLTRHVISWEDLRKLGSSSLARGIA
 HLHSDHTPCGRPKMPIVHRDLKSSNILVKNLDTCCCLCDFGLSLRLDPTLSVDDLANSQGQVGTAR
 YMAPEVLESRMNLENVESFKQTDVYSMALVLWEMTSRCNAVGEVKDYEPFPGSKVREHPCVESM
 KDNVLRDRGRPEIPSWFLNHQGIQMV CETLTCEWDHDPEARLTAQCVAERFSELEHLDRLSGRS
 CSEEKIPEDGSLNTTK

5

SEQ ID NO: 9

Polipéptido precursor de la isoforma B del TGFβRII humano (RefSeq del NCBI con N.º de registro: NP 003233)

MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQ
 KSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHD PKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKK
 PGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIQV TGISLLPPLGVAISVIIIFYCYRVN
 RQOKLSSTWETGKTRKLMFESEHCIILEDSDISSTCANNINHNTELLFIELDTLVGKGRFA
 EVYKAKLKQNTSEQFETVAVKIFPYEEYASWKTEKDIFS DINLKHENILQFLTAERKTELKGQ
 YWLITAFHAKGNLQEYLTRHVISWEDLRKLGSSSLARGIAHLHSDHTPCGRPKMPIVHRDLKSSN
 ILVKNLDTCCCLCDFGLSLRLDPTLSVDDLANSQGQVGTARYMAPEVLESRMNLENVESFKQTDVY
 SMALVLWEMTSRCNAVGEVKDYEPFPGSKVREHPCVESMKDNVLRDRGRPEIPSWFLNHQGIQ
 MV CETLTCEWDHDPEARLTAQCVAERFSELEHLDRLSGRSCSEEKIPEDGSLNTTK

10

SEQ ID NO: 10

Un polipéptido del dominio extracelular de la isoforma B del TGFβRII humano

IIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAV
 WRKNDENITLETVCHD PKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSE
 EYNTSNPD

15

SEQ ID NO: 11

Enlazador (Gly₄Ser)₄Gly

GGGGSGGGSGGGSGGGSG

20

SEQ ID NO: 12

Secuencia polipeptídica de la región variable de cadena pesada secretada del anticuerpo anti-PD-L1 MPDL3280A

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYY
 ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTILTVSS

25

SEQ ID NO: 13

Secuencia polipeptídica de la región variable de cadena ligera secretada del anticuerpo anti-PD-L1 MPDL3280A y del anticuerpo anti-PD-L1 YW243.55S70

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPSRFG
 SSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYLYHPATFGQGTKEIKR

30

SEQ ID NO: 14

Secuencia polipeptídica de la región variable de cadena pesada secretada del anticuerpo anti-PD-L1 YW243.55S70

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSV
 KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTILTVSA

35

REIVINDICACIONES

1. Una proteína que comprende:

- 5 a) TGF β RII humano, o un fragmento del mismo, capaz de unirse a TGF β ; y
 b) un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a la proteína humana de ligando de muerte programada 1 (PD-L1) y comprende:
- 10 (i) una región variable de cadena pesada que incluye un HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SYIMM, SIYPSGGITFYADTVKG e IKLGTVTTVDY, respectivamente, y
 (ii) una región variable de cadena ligera que incluye un HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que tiene las secuencias de aminoácidos de TGTSSDVGGYNYVS, DVSNRPS y SSYTSSSTRV, respectivamente.

15 2. La proteína según la reivindicación 1, que comprende además un enlazador de aminoácidos que conecta el extremo C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, con el extremo N-terminal del TGF β RII humano o fragmento del mismo.

20 3. La proteína según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el TGF β RII humano comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 9 que tiene al menos 20 aminoácidos de longitud.

4. La proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el TGF β RII humano comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10.

25 5. La proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde

(a) la cadena pesada de anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno de la misma, comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos:

EVQLLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYIMMVWRQAPGKGLEWVSSIYPS
 GGITFYADWKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVD
 YWGQGTLVTVSS,

30

y

(b) la cadena ligera de anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno de la misma, comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIDVS
 NRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVFSGTGTKVTV
 L.

35

6. La proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde

40 (a) la cadena pesada de anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno de la misma, comprende la secuencia de aminoácidos:

EVQLLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYIMMVWRQAPGKGLEWVSSIYPS
 GGITFYADWKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVD
 YWGQGTLVTVSS,

45

y

(b) la cadena ligera de anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno de la misma, comprende la secuencia de aminoácidos:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIDVS
 NRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVFSGTGTKVTV
 L.

7. La proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la cadena pesada de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3.

8. La proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la cadena ligera de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1.

9. Ácido nucleico que comprende una primera secuencia de nucleótidos que codifica el TGFβRII humano, o fragmento del mismo, y la región variable de cadena pesada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena ligera de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

10. Una célula que comprende en los mismos o diferentes ácidos nucleicos

una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende (a) al menos un dominio variable de una cadena pesada de un anticuerpo que se une a PD-L1 humano; y (b) TGFβRII humano, o un fragmento soluble del mismo capaz de unirse a TGFβ, en donde el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo incluye un HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SYIMM, SIYPSGGITFYADTVKG e IKLGTVTTVDY, respectivamente; y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica al menos un dominio variable de una cadena ligera de un anticuerpo que, cuando se combina con el polipéptido, forma un sitio de unión a antígeno que se une al PD-L1, en donde el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo incluye un HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que tiene las secuencias de aminoácidos de TGTSSDVGGYNYVS, DVSNRPS y SSYTSSSTRV, respectivamente.

11. Un método para producir una proteína que comprende a) TGFβRII, o un fragmento del mismo capaz de unirse a TGFβ, y b) un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a la proteína humana de ligando de muerte programada 1 (PD-L1), comprendiendo el método mantener una célula según la reivindicación 10 en condiciones que permitan la expresión de la proteína y, opcionalmente, que comprende además recolectar la proteína.

12. Una proteína según la reivindicación 1 para su uso en terapia.

13. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína según la reivindicación 1.

14. Una proteína según la reivindicación 1 para su uso en;

- (i) un método para inhibir el crecimiento tumoral en un paciente, comprendiendo el método exponer el tumor a la proteína; o
- (ii) un método para tratar el cáncer en un paciente, comprendiendo el método administrar la proteína al paciente con cáncer.

15. Una proteína para su uso según la reivindicación 14, en donde el método comprende además exponer al paciente con cáncer a radiación y/o administrar un agente quimioterapéutico.

16. Una proteína para su uso según la reivindicación 14 o la reivindicación 15, en donde el tumor o cáncer se selecciona del grupo que consiste en colorrectal, de mama, de ovario, de páncreas, gástrico, de próstata, de riñón, de cuello del útero, mieloma, linfoma, leucemia, de tiroides, endometrial, de útero, de vejiga, neuroendocrino, de cabeza y cuello, de hígado, nasofaríngeo, testicular, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, melanoma, cáncer de piel de células basales, cáncer de piel de células escamosas, dermatofibrosarcoma protuberante, carcinoma de células de Merkel, glioblastoma, glioma, sarcoma, mesotelioma y síndromes mielodisplásicos.

17. Una proteína según la reivindicación 1, en donde la proteína bloquea la interacción entre el PD-L1 humano y el receptor PD-1 humano.

FIG. 1A

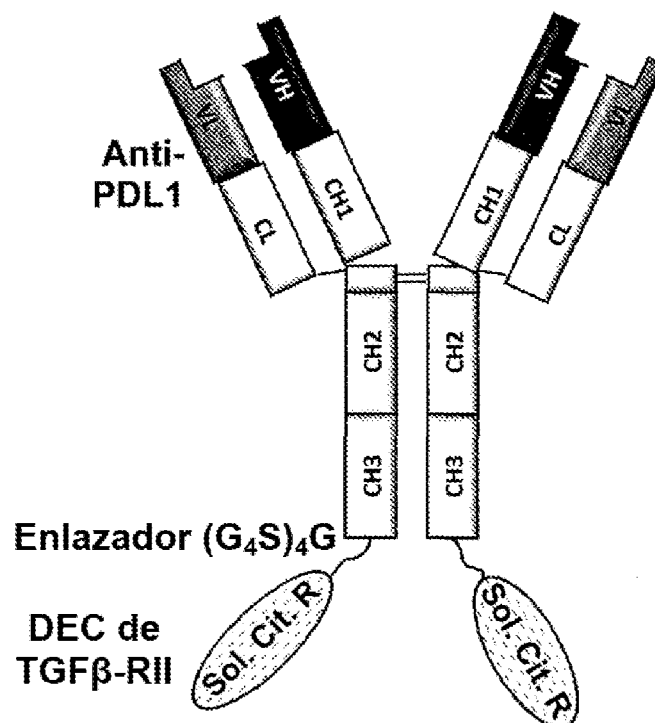


FIG. 1B

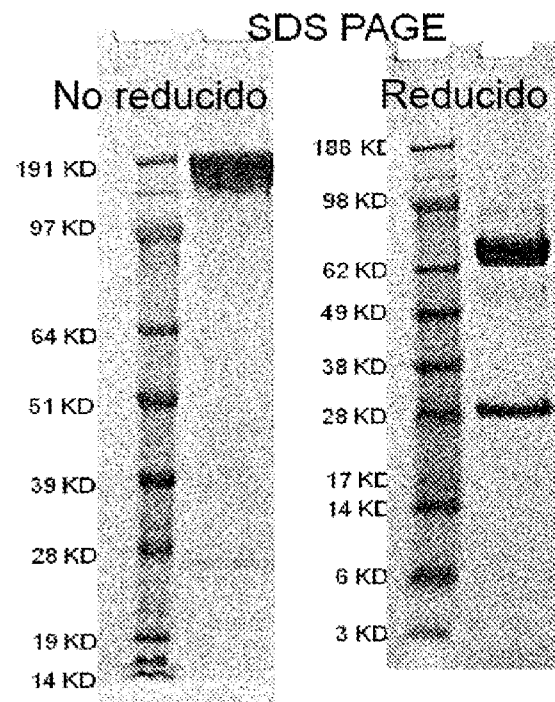
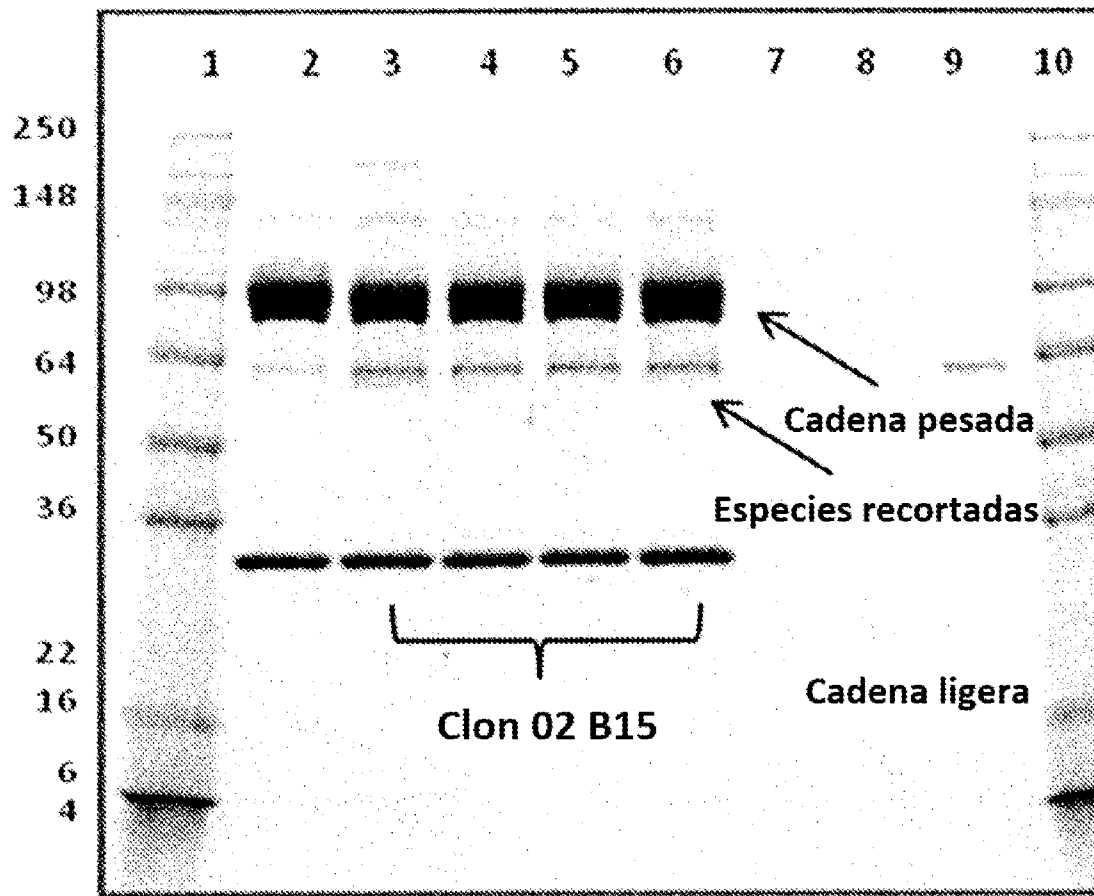


FIG. 2



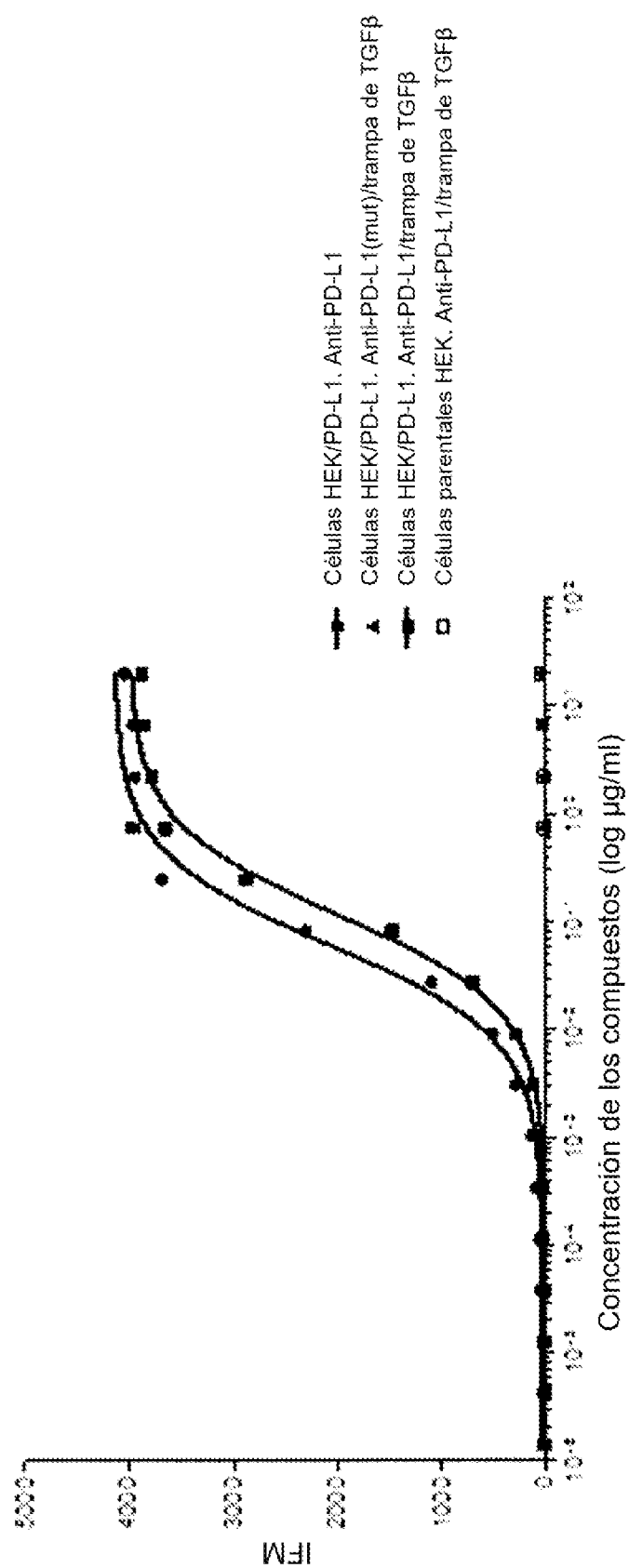


FIG. 3

FIG. 4

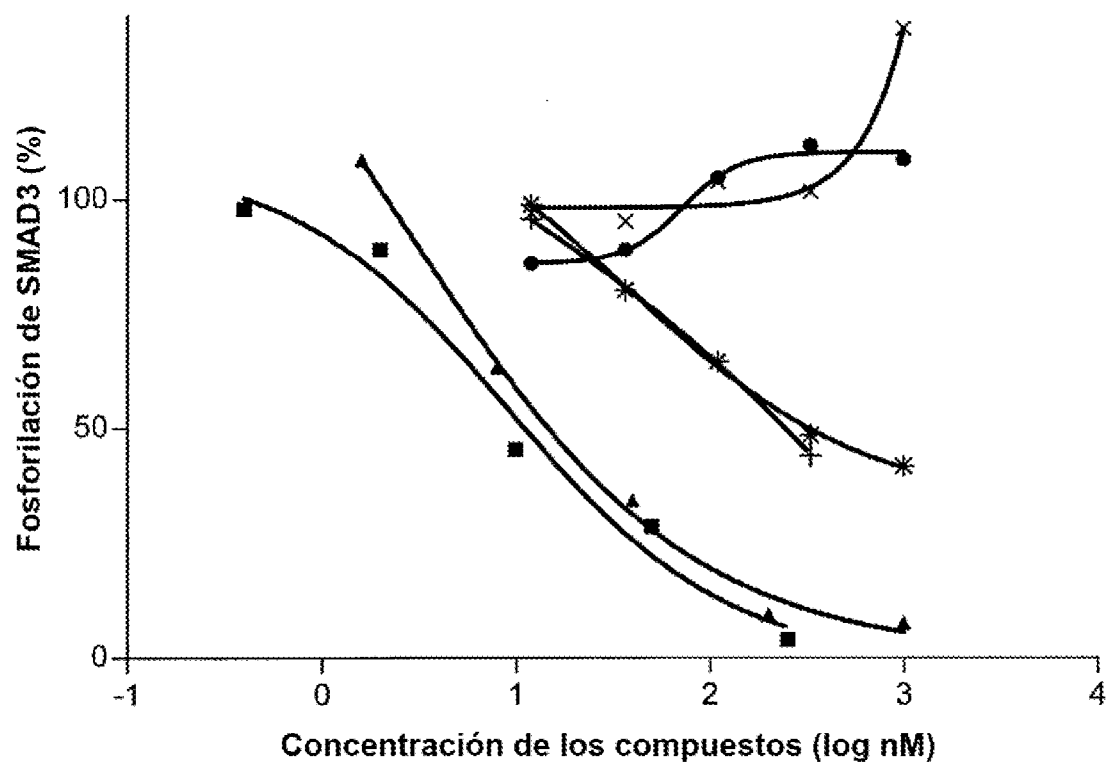


FIG. 5A

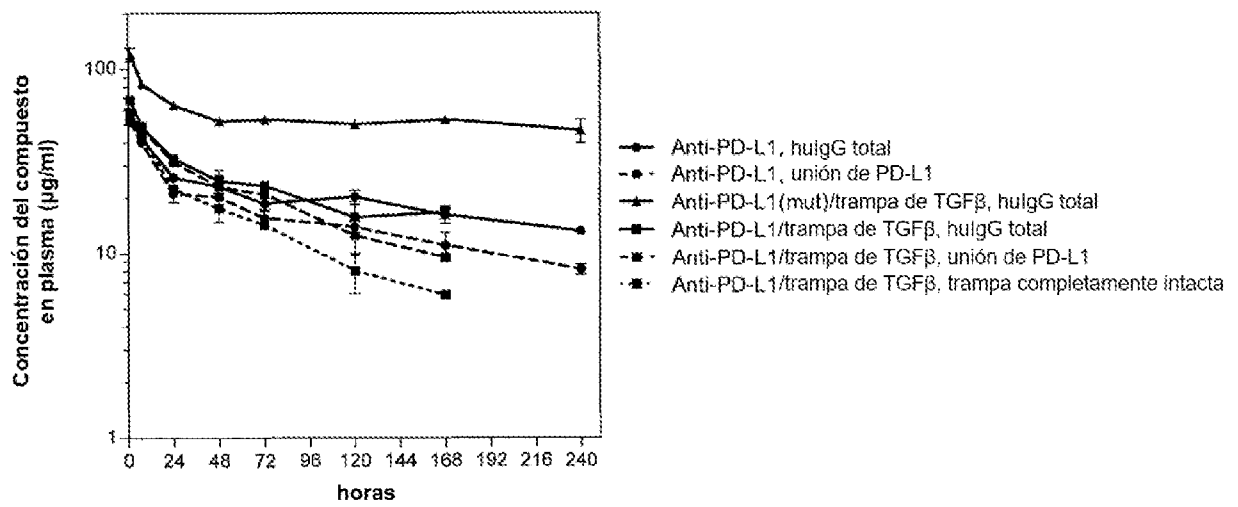


FIG. 5B

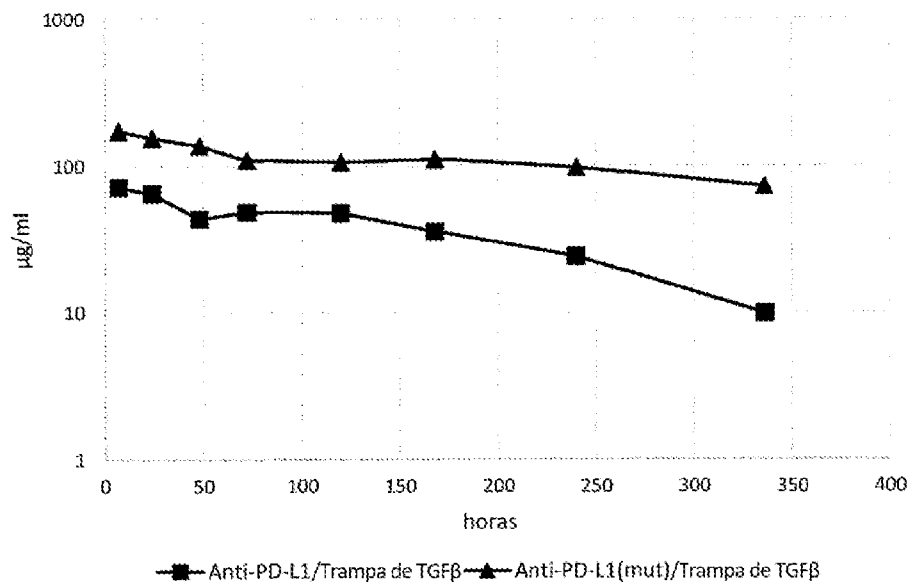


FIG. 6A

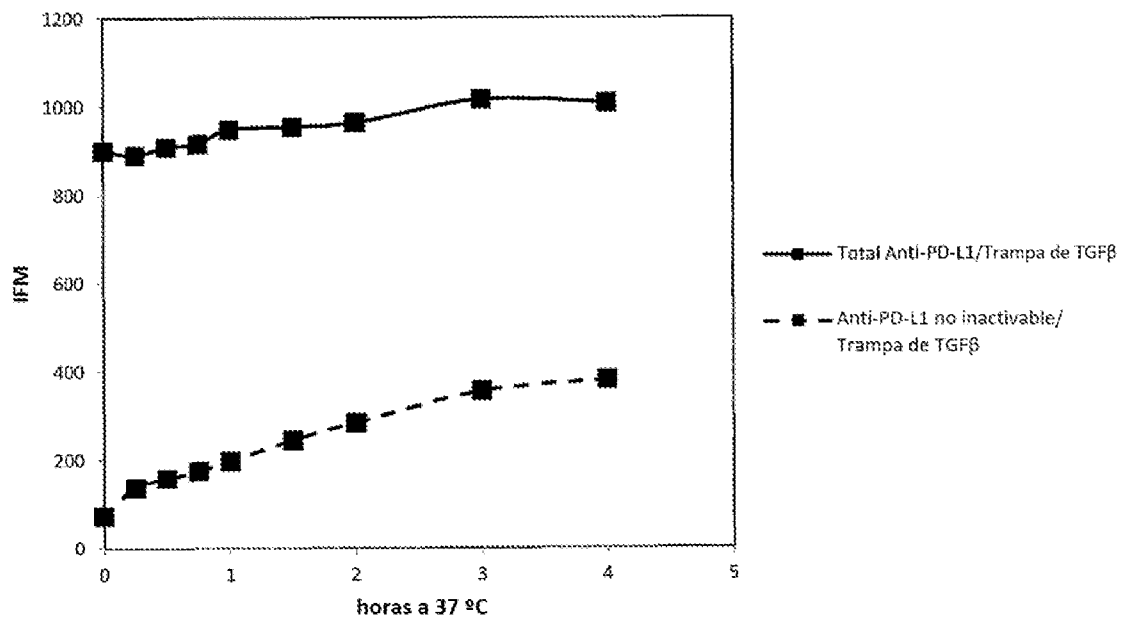


FIG. 6B

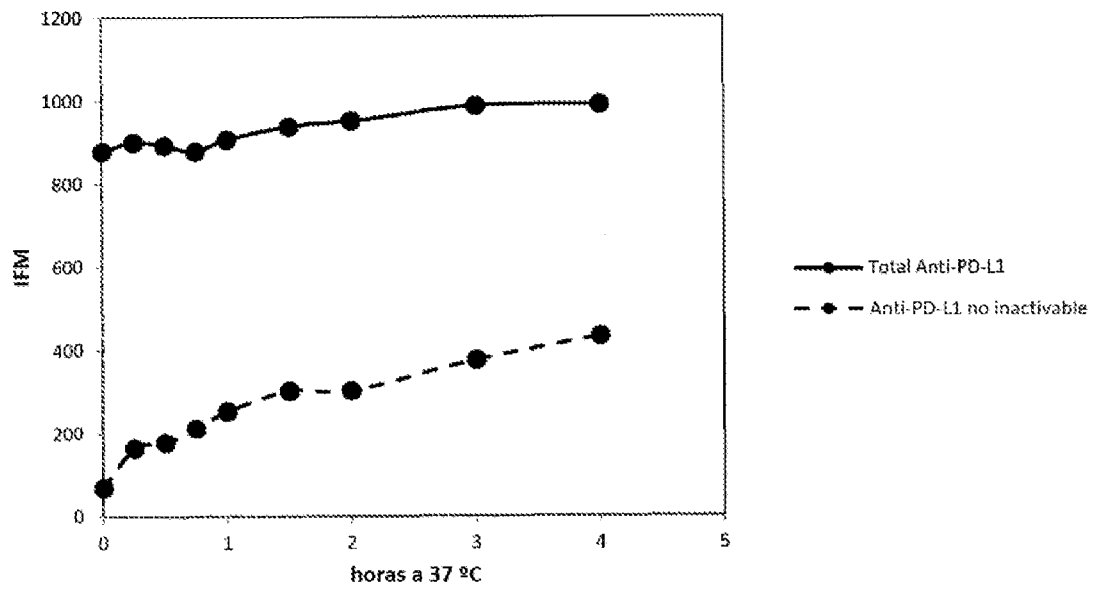


FIG. 6C

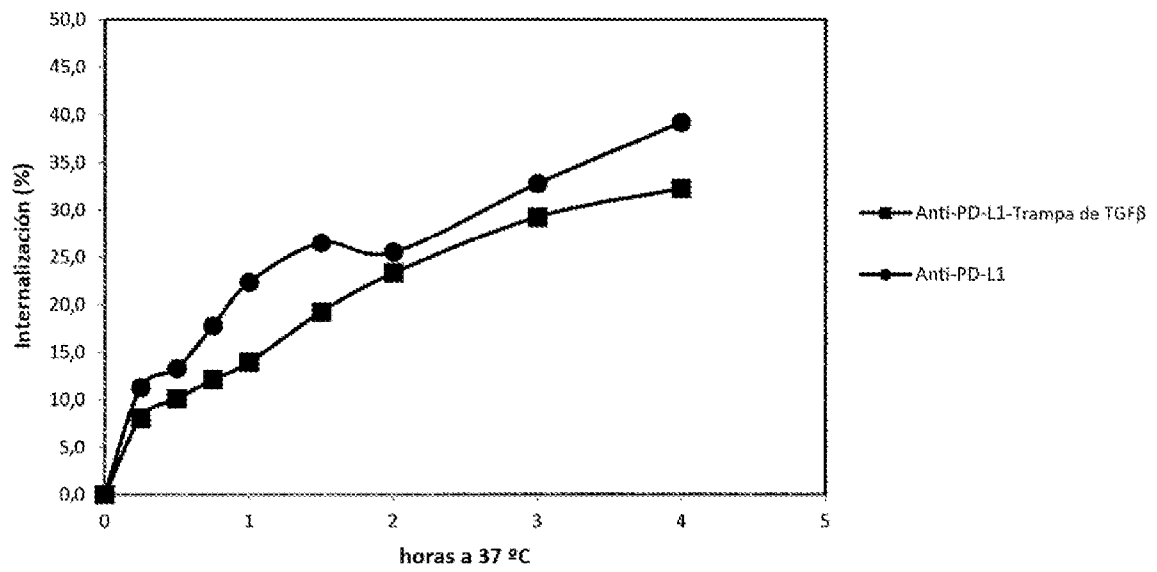
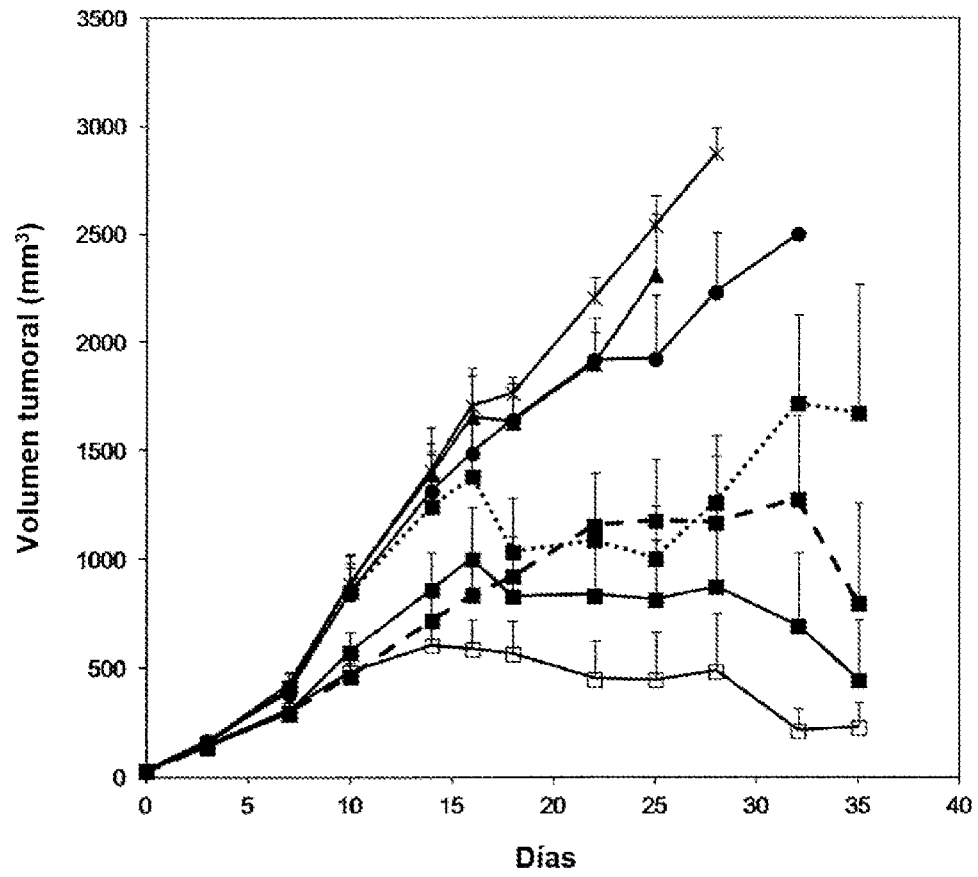


FIG. 7A



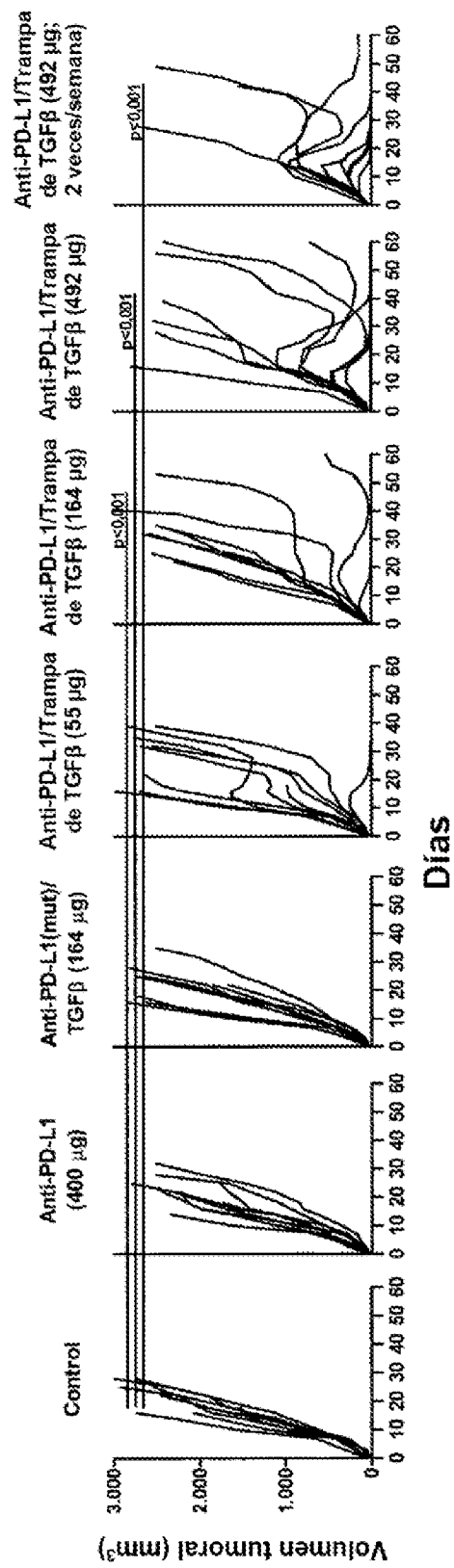


FIG. 7B

FIG. 7C

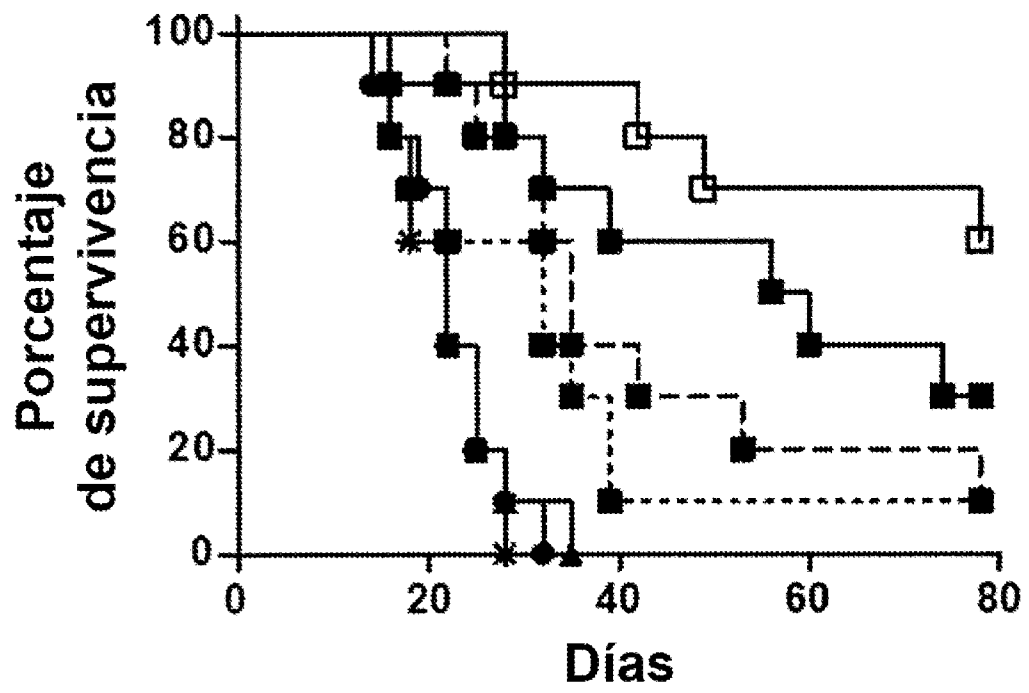


FIG. 8

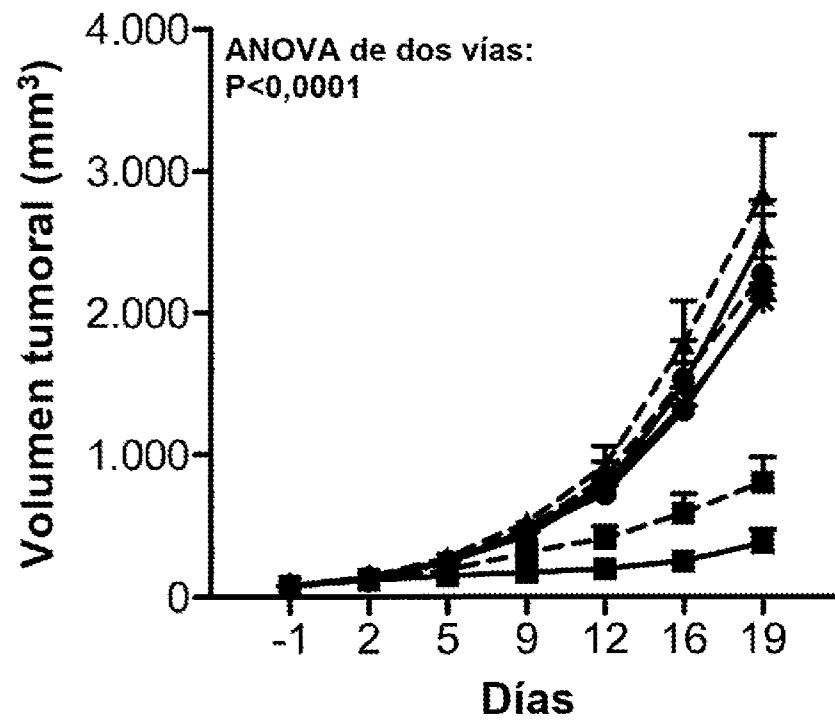


FIG. 9

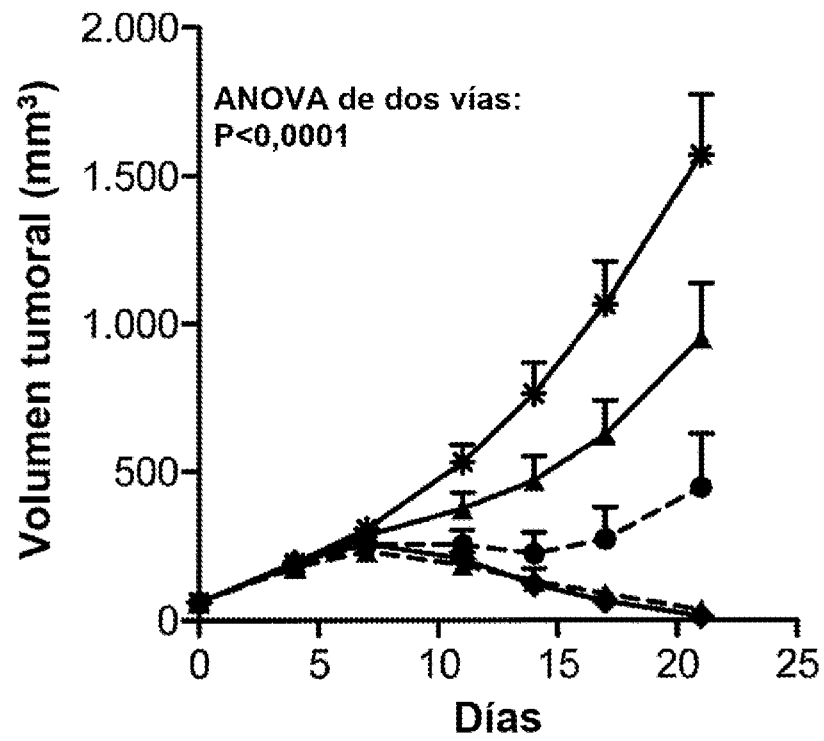


FIG. 10

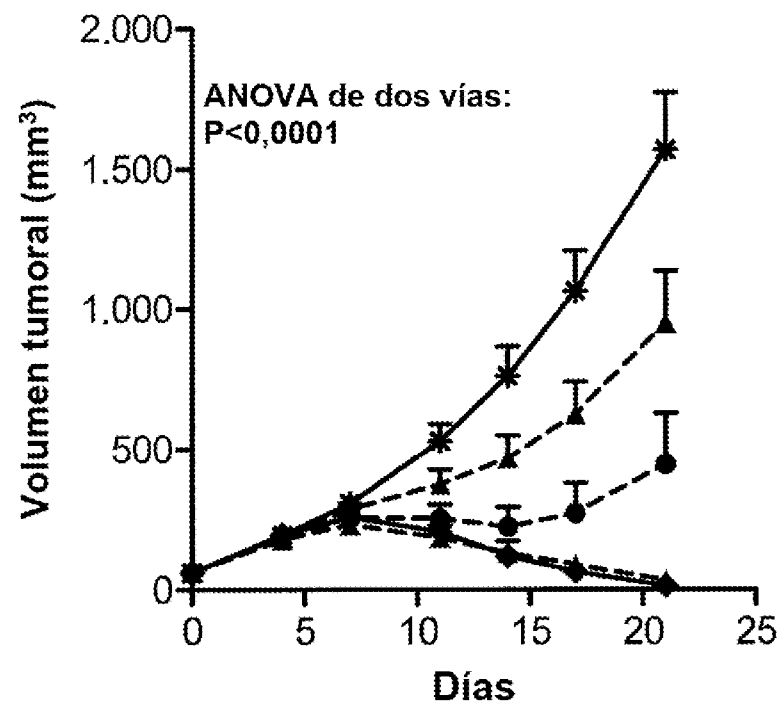


FIG. 11

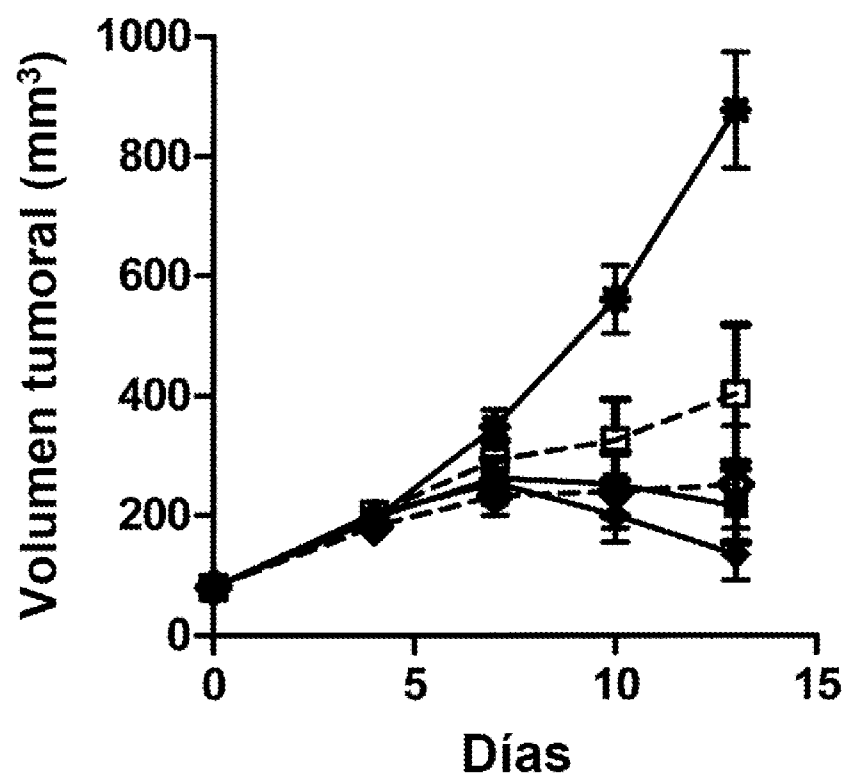


FIG. 12A

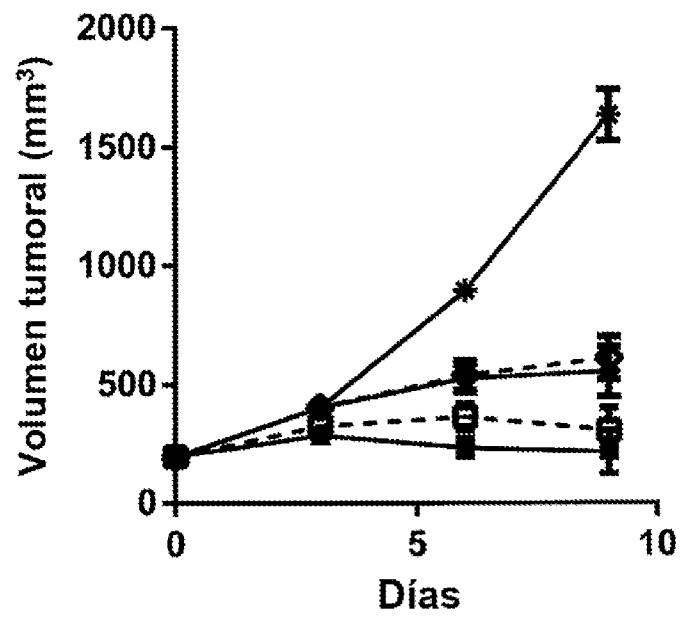


FIG. 12B

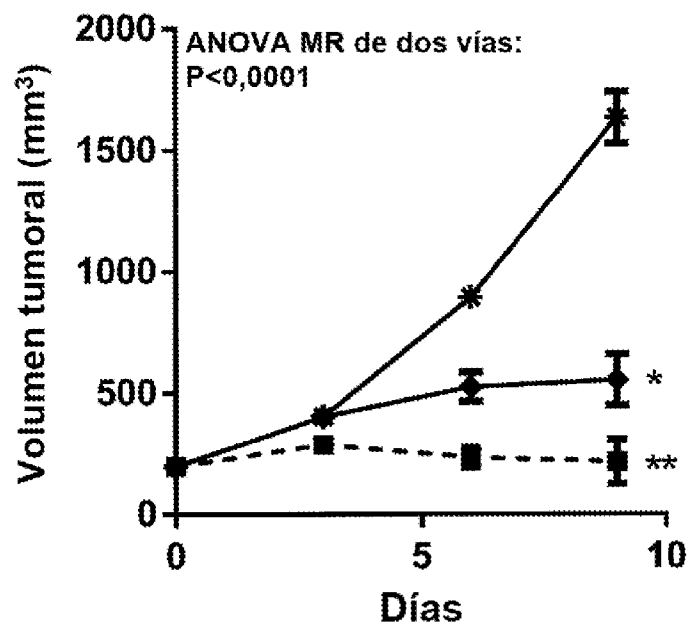


FIG. 12C

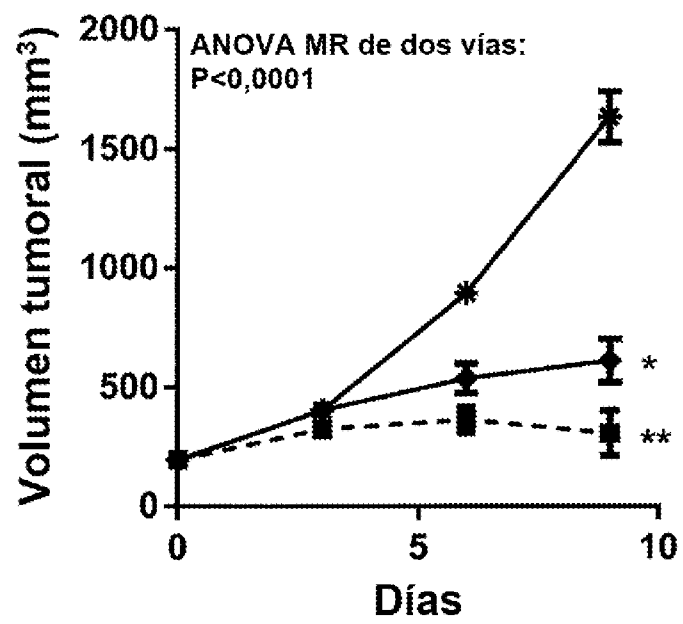


FIG. 13A

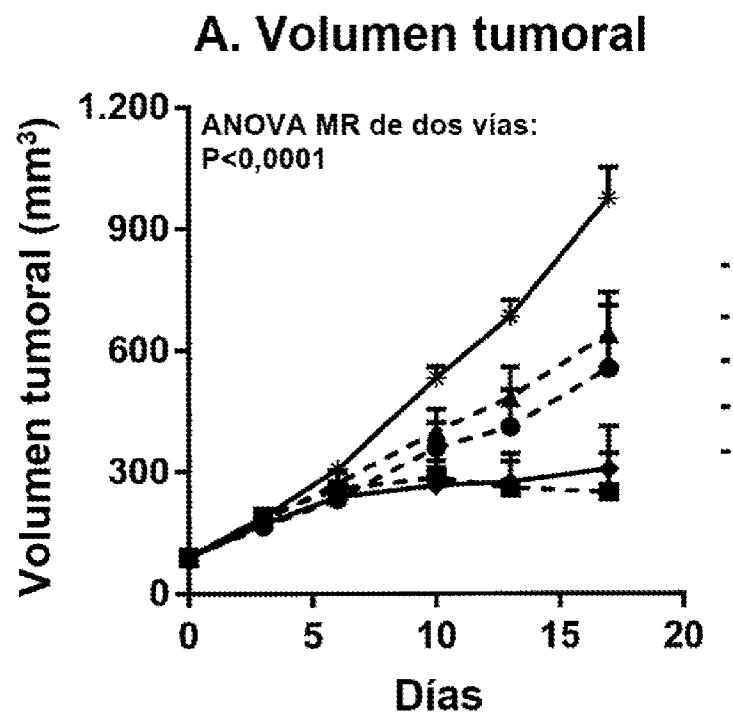


FIG. 13B

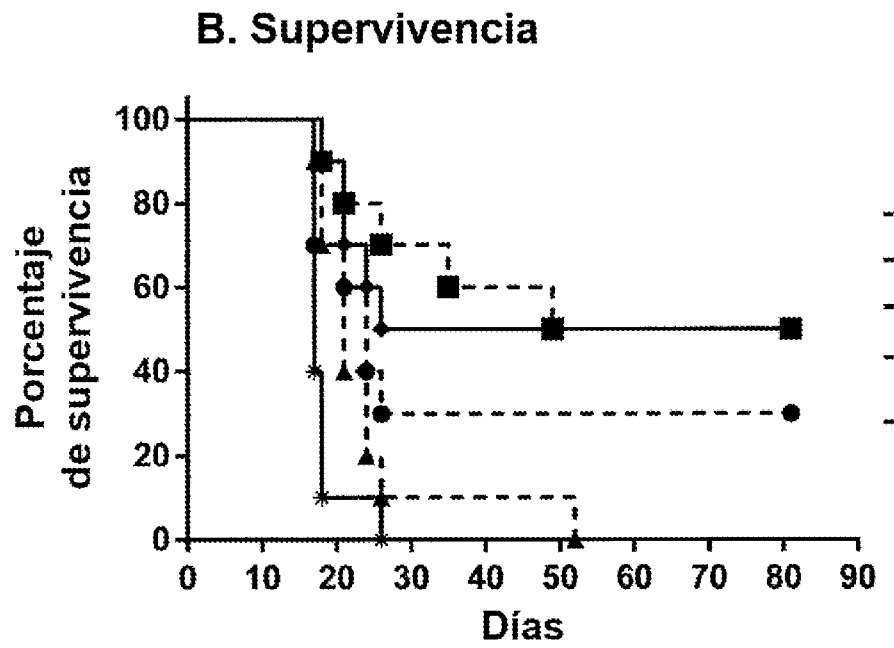


FIG. 14A

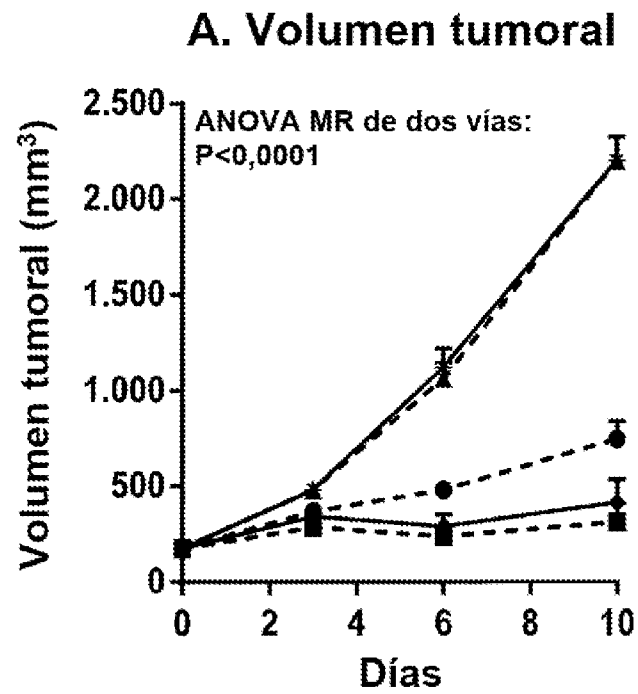


FIG. 14B

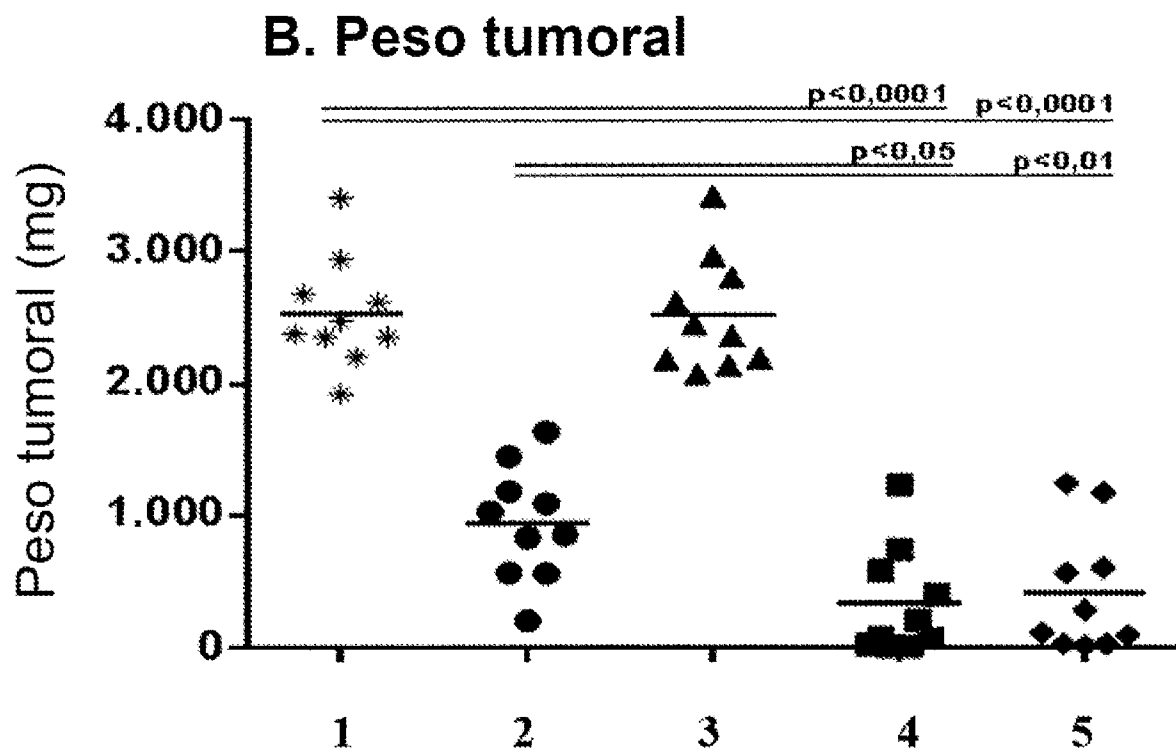


FIG. 15

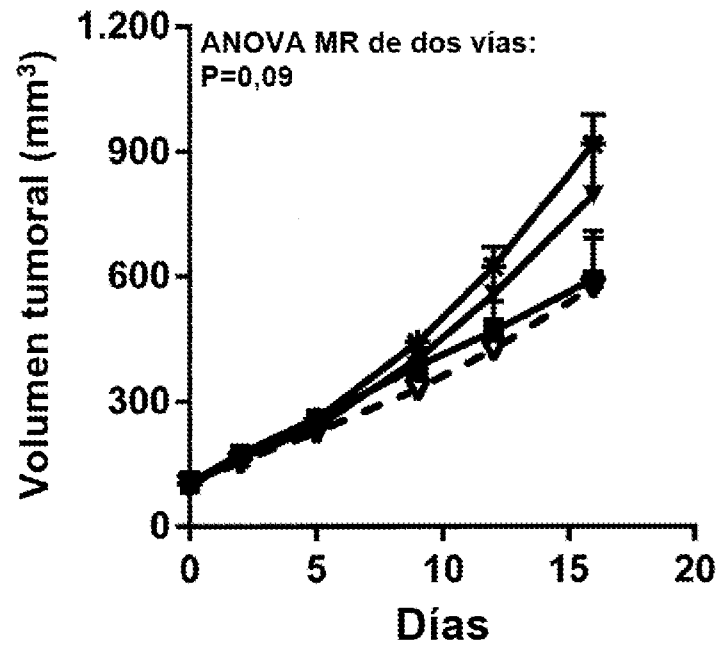


FIG. 16

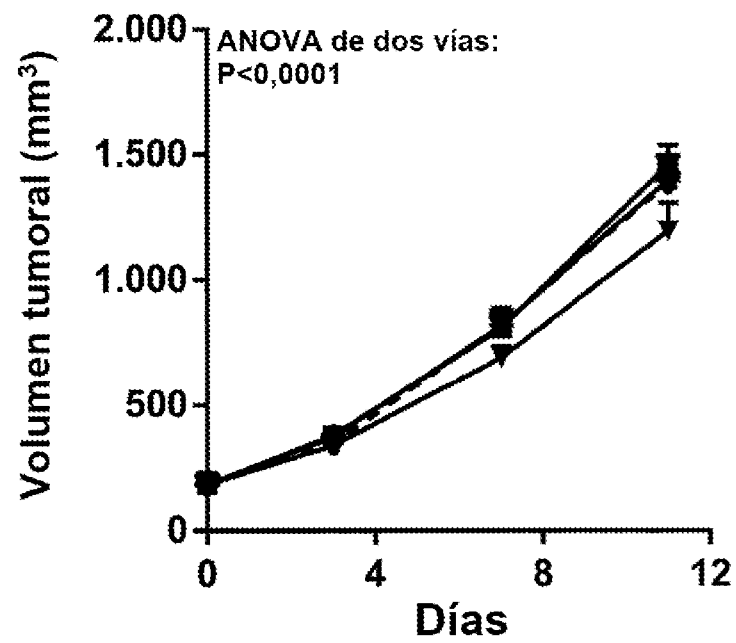


FIG. 17

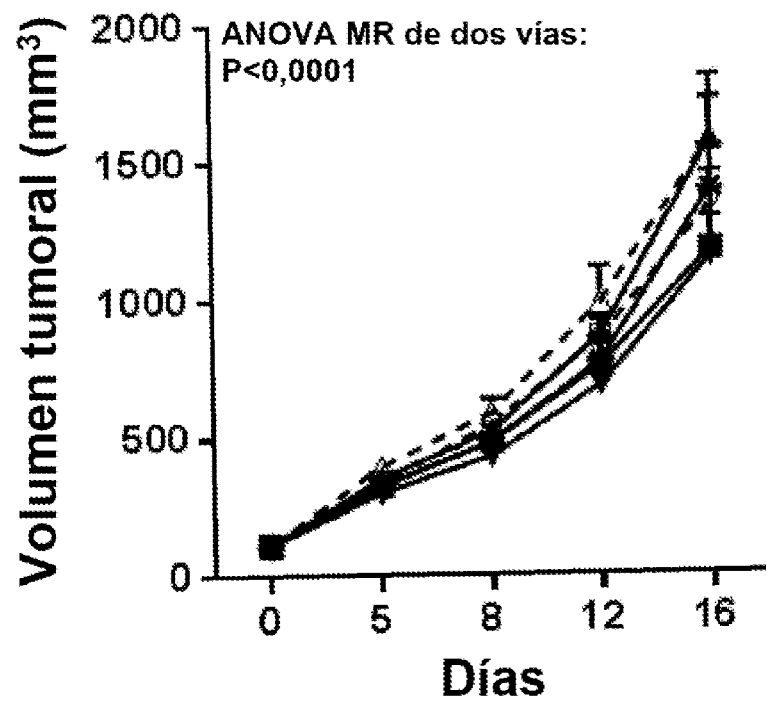


FIG. 18

