

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 994 930**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.11.2016 PCT/US2016/059838**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **11.05.2017 WO17079117**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2016 E 16794878 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2024 EP 3371208**

(54) Título: **Polipéptidos del dominio extracelular de CD80 y su uso en el tratamiento del cáncer**

(30) Prioridad:

02.11.2015 US 201562249836 P
11.08.2016 US 201662373654 P

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

04.02.2025

(73) Titular/es:

FIVE PRIME THERAPEUTICS, INC. (100.00%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320, US

(72) Inventor/es:

BRENNAN, THOMAS;
BELLOVIN, DAVID;
BUSHA, DAVID y
SENNINO, BARBARA

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 994 930 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

Polipéptidos del dominio extracelular de CD80 y su uso en el tratamiento del cáncer

5 CAMPO

La presente invención se refiere a moléculas de fusión del dominio extracelular (ECD) de CD80 (B7-1) y a su uso en el tratamiento del cáncer, tanto solas como en combinación con otros agentes terapéuticos, tales como agentes inmunoestimuladores, tales como inhibidores de PD-1/PD-L1.

10

ANTECEDENTES

El CD80, también conocido como B7-1, es una de las proteínas de la familia B7 de proteínas unidas a la membrana involucradas en la regulación inmunitaria mediante el suministro de respuestas coestimuladoras o coinhibidoras a través de sus actividades de unión al ligando. Otros miembros de la familia de proteínas B7 incluyen CD86 (B7-2), el ligando coestimulador inducible (ICOS-L), el ligando de muerte programada 1 (PD-L1; B7-H1), el ligando de muerte programada 2 (PD-L2; B7-H2), B7-H3 y B7-H4. El CD80 es una proteína transmembranaria expresada en la superficie de los linfocitos T, los linfocitos B, las células dendríticas y los monocitos, y se une a los receptores CD28, CTLA4 (CD152) y PD-L1. CD80 y CD86 y sus receptores CTLA4 y CD28 funcionan como un sistema coestimulador-coinhibidor, por ejemplo, para controlar la activación, expansión, diferenciación y supervivencia de los linfocitos T. La interacción del CD80 y CD86 con CD28 da lugar a señales coestimuladoras que conducen, por ejemplo, a la activación de respuestas de linfocitos T. CD80, a su vez, estimula la regulación por incremento de CTLA4, que, al unirse a CD80, actúa para suprimir la respuesta de linfocitos T previamente desencadenada por las interacciones CD80/CD28. Este bucle de retroalimentación permite un control fino de las respuestas inmunitarias.

25

También se ha demostrado que CD80 interactúa con otro miembro de la familia B7, PD-L1, con una afinidad similar a la de CD28, mientras que CD86 no interactúa con PD-L1. PD-L1 es uno de los dos ligandos para la proteína de la muerte programada 1 (PD-1), que también está involucrada en la regulación de los linfocitos T. Específicamente, la expresión de PD-1 en los linfocitos T puede inducirse después de la activación de los linfocitos T, y la unión de PD-1 a PD-L1 regula por disminución la actividad de los linfocitos T al promover la inactivación de los linfocitos T. Muchas células tumorales expresan PD-L1 en su superficie, lo que puede conducir a interacciones PD-1/PD-L1 y a la inhibición de las respuestas de linfocitos T contra el tumor. Esta observación ha conducido al desarrollo de inhibidores de la interacción PD-1/PD-L1 como terapias contra el cáncer diseñadas para estimular respuestas inmunitarias naturales contra tumores en pacientes.

35

La unión de CD80 a PD-L1 puede servir como un mecanismo alternativo para bloquear la interacción PD-1/PD-L1 y prevenir la inhibición de las respuestas de linfocitos T en el sitio de un tumor. Al mismo tiempo, sin embargo, también podrían estar disponibles niveles aumentados de CD80 para la unión a CD28 y la inducción de CTLA4, mediante lo cual se induce o inhibe respuestas de linfocitos T. Algunas formas solubles del CD80 también pueden funcionar para bloquear la activación de CTLA4 al bloquear la actividad endógena de CD80. Además, las distintas formas solubles de la proteína CD80 pueden tener efectos diferentes sobre el crecimiento tumoral a través de otras interacciones entre las formas de la proteína y las células tumorales cuyo impacto no puede predecirse antes de la prueba. Tampoco se ha comprobado antes directamente el impacto real de las diversas formas solubles de CD80 en el crecimiento tumoral *in vivo*. Los presentes inventores han desarrollado un conjunto de moléculas de fusión del dominio extracelular (ECD) de CD80 con efectos particularmente potentes sobre el crecimiento tumoral en un modelo de ratón, tanto cuando se administran solas como cuando se administran junto con un inhibidor de PD-1/PD-L1. Basándose en los datos mostrados en los ejemplos de trabajo que se presentan a continuación, las realizaciones en el presente documento pueden proporcionar efectos terapéuticos excelentes en el tratamiento del cáncer.

40

SUMARIO

En un aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende (i) moléculas de fusión del dominio extracelular (ECD) de CD80 que comprenden un polipéptido de ECD de CD80 humano y un dominio Fc de IgG1 humana y (ii) al menos una vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde las moléculas de fusión de ECD de CD80 comprenden al menos 15 moles o al menos 20 moles de ácido siálico (SA) por mol de proteína de fusión de ECD de CD80, y en donde las moléculas de fusión de ECD de CD80 comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. En una realización, las moléculas de fusión de ECD de CD80 comprenden 15-60 moles de SA por mol de proteína de fusión de ECD de CD80, o comprenden 15-40, 15-30 o 20-30 moles de SA por mol de proteína de fusión de ECD de CD80. En otra realización, la composición sola no provoca una liberación significativa de interferón gamma o TNF alfa de linfocitos T *in vitro*. En otra realización, la composición sola provoca menos liberación significativa de interferón gamma o TNF alfa de linfocitos T *in vitro* que TGN1412 solo. En una realización específica, la composición es al menos 1000 veces menos potente en la inducción de interferón gamma o la liberación de TNF alfa en comparación con TGN1412 solo. En algunas realizaciones, la composición comprende además un agente terapéutico adicional. En realizaciones específicas, el agente terapéutico adicional comprende un inhibidor de muerte celular programada 1 (PD-1)/ligando de muerte celular programada 1 (PD-L1). En otra realización, la composición es capaz de inhibir el crecimiento tumoral en al menos un 90% en al menos un modelo de cáncer singénico de ratón durante un

periodo de al menos una semana, 10 días, dos semanas o tres semanas tras la administración de una dosis única de la composición de 0,3 a 0,6 mg/kg. En una realización particular, el modelo de cáncer singénico de ratón es un modelo de tumor CT26.

- 5 En otro aspecto, la invención se refiere a una molécula de fusión de ECD de CD80 que comprende un polipéptido de ECD de CD80 y un dominio Fc de IgG1 humana, en donde la molécula de fusión de ECD de CD80 comprende 15-60 moles de SA por mol de la proteína de fusión de ECD de CD80, en donde la molécula de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. En ciertas realizaciones, la molécula de fusión comprende 15-40, 15-30 o 20-30 moles de SA por mol de proteína de fusión de ECD de CD80. En una realización, la molécula de fusión sola no provoca una liberación significativa de interferón gamma o TNF alfa de linfocitos T *in vitro*. En otra realización, la molécula de fusión sola provoca menos liberación significativa de interferón gamma o TNF alfa de linfocitos T *in vitro* que TGN1412 solo. En una realización particular, la molécula de fusión sola es al menos 1000 veces menos potente en la inducción de interferón gamma o la liberación de TNF alfa en comparación con TGN1412. En otra realización, la molécula de fusión es capaz de inhibir el crecimiento tumoral en al menos un 90% en al menos un modelo de cáncer singénico de ratón durante un periodo de al menos 1 semana, 10 días, dos semanas o tres semanas tras la administración de una dosis única de la molécula de fusión a 0,3 a 0,6 mg/kg. En realizaciones específicas, el modelo de cáncer singénico de ratón es un modelo de tumor CT26.
- 10 En otro aspecto, la presente invención proporciona la composición de la invención de la molécula de fusión de ECD de CD80 de la invención para su uso en el tratamiento del cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona de cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer gástrico, carcinoma broncopulmonar no microcítico, melanoma, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer pancreático, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, cáncer de vejiga y cáncer de endometrio. En una realización, el cáncer es un tumor sólido. En otra realización, el cáncer es recurrente o progresivo después de una terapia seleccionada de cirugía, quimioterapia, radioterapia, o una combinación de las mismas.
- 15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 20 Las Fig. 1a-1b muestran los efectos de la administración de la molécula de fusión de ECD de CD80-Fc en comparación con una molécula de fusión de ECD de CTLA4-Fc y un control de solución salina a ratones implantados con células CT26 de la estirpe celular de carcinoma colorrectal murino. La Fig. 1a muestra el volumen tumoral hasta 21 días después de la inoculación de ratones con las células CT26. Como se muestra en la figura, ECD de CTLA4-Fc potenció el crecimiento tumoral mientras que ECD de CD80-Fc inhibió el crecimiento tumoral de un modo estadísticamente significativo en comparación con el control de solución salina. Se calcularon los valores de *p* usando análisis de la prueba de la *t* bilateral de los volúmenes tumorales calculados en cada día del estudio (**p*<0,05, ** *p*<0,01, ****p*<0,001). La Fig. 1b muestra los volúmenes tumorales individuales en el día 19 después de la inoculación para los tres grupos.
- 25
- 30 Las Fig. 2a-2b muestran los efectos de la administración de la molécula de fusión de ECD de CD80-Fc o un anticuerpo o una combinación de los dos en comparación con un control de solución salina a ratones implantados con células CT26 de la estirpe celular de carcinoma colorrectal murino. La Fig. 2a muestra el volumen tumoral hasta 14 días después de la inoculación. Los ratones administrados con ECD de CD80-Fc y la combinación anti-PD-1 mostró una reducción estadísticamente significativa en el crecimiento tumoral en comparación con cualquiera de las terapias individuales de ECD de CD80-Fc (*p*<0,01 empezando después del día 9) o anti-PD-1 (*p*<0,01 el día 14). Se determinó una significación estadística mediante la prueba de la *t* bilateral comparando el grupo de combinación con el grupo de ECD de CD80-Fc. La Fig. 2b muestra los volúmenes tumorales individuales en el día 14.
- 35
- 40 Las Fig. 3a-b muestran el efecto de la secuencia del polipéptido de fusión de Fc sobre los efectos de una molécula de fusión de ECD de CD80-Fc en el crecimiento tumoral de los tumores CT26 en ratón. Específicamente, los ratones se administraron control de solución salina, o una ECD de CD80-Fc con un compañero de fusión del dominio Fc de IgG1 humana natural (CD80-IgG1 WT), o con una ECD de CD80-Fc con un compañero de fusión del dominio Fc de IgG1 humana mutante (L234F/L235E/P331S) (CD80-IgG1 MT). La Fig. 3a muestra cambios en el volumen tumoral hasta el día 21 después de la inoculación. El dominio Fc mutado produjo una mejora de la actividad antitumoral, que fue estadísticamente significativa empezando en el día 14 después de la inoculación (*p*<0,01). La significación estadística se determinó mediante una prueba de la *t* bilateral para datos independientes. La Fig. 3b muestra volúmenes tumorales individuales en el día 21 después de la inoculación.
- 45
- 50 Las Fig. 4a-b muestran la tinción de células tumorales murinas para la presencia de linfocitos T CD3+ y CD4+ después de la exposición a control de solución salina o a moléculas de fusión de ECD de CD80-Fc con cualquiera de los compañeros de fusión de Fc naturales o mutantes. La Fig. 4a proporciona imágenes representativas que muestran las células CD3+ (imágenes superiores) y tinción con DAPI correspondiente (núcleos, imágenes inferiores) en tumores CT26 recogidos 7 días después de la inyección de solución salina, CD80-IgG1 WT o CD80-IgG1 MT. Tanto CD80-IgG1 WT como CD80-IgG1 MT aumentaron el número de células CD3+ dentro de los tumores en comparación con el vehículo, pero la magnitud del aumento fue mayor
- 55
- 60
- 65

después de CD80-IgG1 MT. Las imágenes se registraron usando un objetivo de 10x. La **Fig. 4b** proporciona imágenes representativas que muestran las células CD3+ (fila superior) y CD4+ (fila inferior) en tumores CT26 recogidos 7 días después de la inyección de solución salina, CD80-IgG1 WT o CD80-IgG1 MT. Las imágenes se tomaron en el mismo campo de vista, pero con diferentes canales. Tanto CD80-IgG1 WT como CD80-IgG1 MT aumentaron el número de células CD4+ infiltrantes en comparación con el vehículo. La proporción entre células CD3+ y CD4+ aumentó CD80-IgG1 MT en comparación con CD80-IgG1 WT. Las imágenes se registraron usando un objetivo de 10x.

Las Fig. 5a-d mostraron la liberación de citocinas IFN-γ y TNF-α de linfocitos T en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos expuestas a perlas de proteína A recubiertas con 0,01, 0,1 o 1 µg/pocillo de una molécula de fusión de dominio de ECD de CD80-dominio Fc de IgG1 (CD80-Fc). **Las Fig. 5a y 5c** muestran que CD80-Fc inmovilizado en perlas solo no causó una activación significativa de linfocitos T, como se mide por la producción de citocinas solubles. **Las Fig. 5b y 5d** muestran que cuando se inmovilizó una pequeña cantidad de OKT3-scFv (demasiado baja para provocar la estimulación de linfocitos T por sí mismos) junto con CD80-Fc, se observó la liberación de citocinas.

La Fig. 6 muestra el crecimiento tumoral de tumores CT26 murinos tras el tratamiento con un control de solución salina o dosis de 0,3 o 0,6 mg/kg de tres lotes diferentes de una molécula de fusión de ECD de CD80-Fc que tiene tres contenidos de ácidos siálico (SA) diferentes. El lote A tiene 5 moles de SA/mol de proteína, el lote D tiene 15 moles de SA/mol de proteína y el lote E tiene 20 moles de SA/mol de proteína. El tratamiento con el lote E de ECD de CD80-Fc administrado a 0,3 o 0,6 mg/kg dio lugar a una inhibición del 93 % y 98 % del crecimiento tumoral en comparación con el control ($P<0,001$). El tratamiento con el lote D de ECD de CD80-Fc administrado a 0,3 o 0,6 mg/kg dio lugar a una inhibición del 93 % y 95 % del crecimiento tumoral en comparación con el control ($P<0,001$). En comparación, el tratamiento con el lote A de ECD de CD80-Fc administrado a 0,3 mg/kg no inhibió el crecimiento tumoral en comparación con el control y cuando se administró a 0,6 mg/kg sólo indujo una inhibición del 70 % ($P<0,001$) del crecimiento tumoral.

La Fig. 7 muestra el crecimiento tumoral de tumores CT26 tratados con IgG2b de ratón a 10 mg/kg; ECD de CD80-Fc murino SA 20 mol/mol a 0,3 mg/kg; clon 9D9 del anticuerpo anti-CTLA4 a 10 mg/kg; y clon 9D9 del anticuerpo anti-CTLA4 a 1,5 mg/kg. Las flechas indican cuándo fueron administrados los ratones. El símbolo del asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre ECD de CD80-Fc murina SA 20 mol/mol a 0,3 mg/kg y los otros tratamientos.

La Fig. 8 muestra el crecimiento tumoral de tumores MC38 tratados con IgG2b de ratón a 10 mg/kg; ECD de CD80-Fc murino SA 20 mol/mol a 3 mg/kg; clon 9D9 del anticuerpo anti-CTLA4 a 10 mg/kg; y clon 9D9 del anticuerpo anti-CTLA4 a 1,5 mg/kg. Las flechas indican cuándo fueron administrados los ratones. El símbolo del asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre ECD de CD80-Fc murina SA 20 mol/mol a 3 mg/kg y los otros tratamientos.

La Fig. 9 muestra el crecimiento tumoral de tumores B16 tratados con IgG2b de ratón a 10 mg/kg; ECD de CD80-Fc murino SA 20 mol/mol a 3 mg/kg; clon 9D9 del anticuerpo anti-CTLA4 a 10 mg/kg; y clon 9D9 del anticuerpo anti-CTLA4 a 1,5 mg/kg. Las flechas indican cuándo fueron administrados los ratones. El símbolo del asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre ECD de CD80-Fc murina SA 20 mol/mol a 3 mg/kg y los otros tratamientos.

45 DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES PARTICULARES

Definiciones

50 A menos que se defina lo contrario, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente invención tendrán el significado comúnmente entendido por los expertos en la materia. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos en singular incluirán el plural y los términos en plural incluirán el singular.

55 En la presente solicitud, el uso de "o" significa "y/o", a menos que se indique lo contrario. En el contexto de una reivindicación con dependencia múltiple, el uso de "o" hace referencia a más de una reivindicación independiente o dependiente precedente sólo con carácter alternativo. Además, términos tales como "elemento" o "componente" abarcan tanto elementos como componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique específicamente lo contrario.

60 Las técnicas a modo de ejemplo usadas a propósito de ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, cultivo de tejido y transformación (por ejemplo, electroporación, lipofección), reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se describen, por ejemplo, en Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), entre otros lugares.

65 Como se utiliza según la presente divulgación, se debe entender que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

- 5 Los términos "**molécula del ácido nucleico**" y "**polinucleótido**" se pueden indistintamente, y se refieren a un polímero de nucleótidos. Dichos polímeros de nucleótidos pueden contener nucleótidos naturales y/o no naturales, e incluyen, pero no se limitan a, ADN, ARN y PNA. "**Secuencia del ácido nucleico**" se refiere a la secuencia lineal de nucleótidos que comprenden la molécula del ácido nucleico o polinucleótido.
- 10 Los términos "**polipéptido**" y "**proteína**" se usan indistintamente para hacer referencia a un polímero de residuos de aminoácidos, y no se limitan a una longitud mínima. Dichos polímeros de residuos de aminoácidos pueden contener residuos de aminoácidos naturales o no naturales, e incluyen, pero no se limitan a, péptidos, oligopéptidos, dímeros, trímeros y multímeros de residuos de aminoácidos. Tanto las proteínas de longitud completa como los fragmentos de las mismas están englobados por la definición. Los términos también incluyen modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glucosilación, sialilación, acetilación, fosforilación, y similares. Además, a los efectos de la presente invención, un "polipéptido" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como delecciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora), a la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, por ejemplo, a través de la mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, por ejemplo, a través de mutaciones de hospedadores que producen las proteínas o los errores debido a la amplificación por PCR.
- 15 Un "**dominio extracelular de CD80**" o "**ECD de CD80**" se refiere a un polipéptido del dominio extracelular de CD80, incluyendo variantes naturales y modificadas de este. Ejemplos no limitantes de ECD de CD80 incluyen SEQ ID NO:--. Una "**molécula de fusión de ECD de CD80**" se refiere a una molécula que comprende un ECD de CD80 y un compañero de fusión, tal como un dominio Fc, albúmina o PEG. El compañero de fusión puede unirse de manera covalente, por ejemplo, al extremo N o C del ECD de CD80 o en una ubicación interna. Ejemplos no limitantes de moléculas de fusión de ECD de CD80 incluyen SEQ ID NO:--.
- 20 25 Las expresiones "**proteína 1 de muerte celular programada 1**" y "**PD-1**" se refieren a un receptor inmunomodulador que pertenece a la familia CD28. PD-1 se expresa predominantemente en linfocitos T previamente activados *in vivo*, y se une a dos ligando, PD-L1 y PD-L2. El término "**PD-L1**", como se usa en el presente documento, incluye PD-1 (hPD-1), variantes, isoformas y especies homólogas de hPD-1, y análogos que tienen al menos un epítopo común con hPD-1. La secuencia de hPD-1 completa puede encontrarse en el n.^o de acceso de GenBank U64863. En algunas realizaciones, PD-1 es un PD-1 humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: -- (preursora, con secuencia señalizadora) o SEQ ID NO: -- (madura, sin secuencia señalizadora).
- 30 35 Las expresiones "**ligando 1 de muerte celular programada 1**" y "**PD-L1**" se refieren a uno de los dos ligandos de glucoproteínas de la superficie celular para PD-1 (siendo el otro PD-L2) que regulan por disminución la activación de los linfocitos T y la secreción de citocinas tras la unión a PD-1. El término "**PD-L1**", como se usa en el presente documento, incluye PD-L1 (hPD-L1), variantes, isoformas y especies homólogas de hPD-L1, y análogos que tienen al menos un epítopo común con hPD-L1. La secuencia de hPD-L1 completa puede encontrarse en el n.^o de acceso de GenBank® Q9NZQ7. En algunas realizaciones, PD-L1 es un PD-L1 humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: -- (preursora, con secuencia señalizadora) o SEQ ID NO:-(madura, sin secuencia señalizadora).
- 40 45 50 Las expresiones "**agente inmunoestimulador**", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que estimula el sistema inmunitario al actuar como un agonista de una molécula inmunoestimuladora, incluida una molécula coestimuladora, o al actuar como un antagonista de una molécula inmunoinhibidora, incluida una molécula coinhibidora. Un agente inmunoestimulador puede ser biológico, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, otra proteína o vacuna, o puede ser un fármaco de molécula pequeña. Una "**molécula inmunoestimuladora**" incluye un receptor o ligando que actúa para mejorar, estimular, inducir o "activar" de otro modo una respuesta inmunitaria. Las moléculas inmunoestimuladoras, como se definen en el presente documento, incluyen moléculas coestimuladoras. Una "**molécula inmunoinhibidora**" incluye un receptor o ligando que actúa para reducir, inhibir, suprimir o "desactivar" de otro modo una respuesta inmunitaria. Las moléculas inmunoinhibidoras, tal como se definen en el presente documento, incluyen moléculas coinhibidoras. Esas moléculas inmunoestimuladoras e inmunoinhibidoras pueden ser, por ejemplo, receptores o ligandos que se encuentran en las células inmunitarias, tales como los linfocitos T, o que se encuentran en las células involucradas en la inmunidad innata, tales como los linfocitos NK.
- 55 60 La expresión "**inhibidor de PD-1/PD-L1**" se refiere a un resto que interrumpe la vía de señalización de PD-1/PD-L1. En algunas realizaciones, el inhibidor inhibe la vía de señalización de PD-1/PD-L1 mediante la unión a PD-1 y/o a PD-L1. En algunas realizaciones, el inhibidor también se une a PD-L2. En algunas realizaciones, un inhibidor de PD-1/PD-L1 bloquea la unión de PD-1 a PD-L1 y/o PD-L2. Ejemplos no limitantes de inhibidores de PD-1/PD-L1 incluyen anticuerpos que se unen a PD-1; anticuerpos que se unen a PD-L1; proteínas de fusión, tales como AMP-224; y péptidos, tales como AUR-012.
- 65 La expresión "**anticuerpo que inhibe la PD-1**" se refiere a un anticuerpo que se une a PD1 o se une a PD-L1 y, por lo tanto, inhibe la señalización de PD-1 y/o PD-L1. En algunas realizaciones, un anticuerpo que inhibe PD-1 se une a PD-1 y bloquea la unión de PD-L1 y/o PD-L2 a PD-1. En algunas realizaciones, un anticuerpo que inhibe PD-1 se une a PD-L1 y bloquea la unión de PD-1 a PD-L1. Un anticuerpo que inhibe PD-1 que se une a PD-L1 puede denominarse

un anticuerpo anti-PD-L1. Un anticuerpo que inhibe PD-1 que se une a PD-1 puede denominarse un anticuerpo anti-PD-1.

5 Con respecto a los ECD de CD80 y a las moléculas de fusión de ECD de CD80, la expresión "**bloquea la unión de**" un ligando, y variantes gramaticales del mismo, se refiere a la capacidad de inhibir una interacción entre CD80 y un ligando de CD80, tal como CD28, CTLA4 o PD-L1. Dicha inhibición puede producirse a través de cualquier mecanismo, incluyendo mediante la competencia de ECD de CD80 o moléculas de fusión de ECD de CD80 por la unión con los ligandos de CD80.

10 Con referencia a los anticuerpos anti-PD-1 y los péptidos o las moléculas de fusión de PD-1, la expresión "**bloquea la unión de**" un ligando, tal como PD-L1, y sus variantes gramaticales, se usan para referirse a la capacidad de inhibir la interacción entre PD-1 y un ligando de PD-1, tal como PD-L1. Dicha inhibición puede producirse a través de cualquier mecanismo, incluida la interferencia directa con la unión al ligando, por ejemplo, debido a la superposición de sitios de unión en PD-1, y/o cambios conformacionales en PD-1 inducida por el anticuerpo que alteran la afinidad del ligando, etc., o, en el caso de un péptido o una molécula de fusión de PD-1, mediante la competencia por la unión con un ligando de PD-1.

15 La "**afinidad**" o "**afinidad de unión**" se refieren a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un polipéptido) y su compañero de unión (por ejemplo, un ligando).
20 En algunas realizaciones, la "**afinidad de unión**" se refiere a la afinidad de unión intrínseca, que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, polipéptido y ligando). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede representarse generalmente mediante la constante de disociación (K_d).

25 El término "**anticuerpo**", como se usa en el presente documento, hace referencia a una molécula que comprende al menos la región de determinación de la complementariedad (CDR) 1, CDR2 y CDR3 de una cadena pesada y al menos la CDR1, CDR2 y CDR3 de una cadena ligera, en donde la molécula es capaz de unirse al antígeno. El término "**anticuerpo**" incluye, pero no se limita a, fragmentos que son capaces de unirse a antígenos, tales como Fv, Fv
30 monocatenario (scFv), Fab, Fab', and (Fab')₂. El término "**anticuerpo**" también incluye, pero no se limita a, anticuerpos químicos, anticuerpos humanizados y anticuerpos de diversas especies, tales como ratones, seres humanos, macacos cangrejeros, etc.

35 En algunas realizaciones, un anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera. En algunas realizaciones, un anticuerpo comprende al menos una cadena pesada que comprende una
40 región variable de cadena pesada y al menos una parte de una región constante de cadena pesada, y al menos una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera y al menos una parte de una región constante de cadena ligera. En algunas realizaciones, un anticuerpo comprende dos cadenas pesadas, en donde cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada y al menos una parte de una región constante de cadena pesada, y dos cadenas ligeras, en donde cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera y al menos una parte de una región constante de cadena ligera. Como se usa en el presente documento, un Fv
45 monocatenario (scFv), o cualquier otro anticuerpo que comprende, por ejemplo, una única cadena de polipéptidos que comprende las seis CDR (tres CDR de cadena pesada y tres CDR de cadena ligera) se considera que tiene una cadena pesada y una cadena ligera. En algunas de dichas realizaciones, la cadena pesada es la región del anticuerpo que comprende las tres CDR de cadena pesada y la cadena ligera en la región del anticuerpo que comprende las tres CDR de cadena ligera.

45 La expresión "**región variable de cadena pesada**" se refiere a una región que comprende HVR1 de cadena pesada, marco (FR) 2, HVR2, FR3 y HVR3. En algunas realizaciones, una región variable de cadena pesada también comprende al menos una parte de un FR1 y/o al menos una parte de un FR4.

50 La expresión "**región constante de cadena pesada**" se refiere a una región que comprende al menos tres dominios constantes de cadena pesada, C_H1, C_H2 y C_H3. Los ejemplos no limitantes de regiones constantes de cadena pesada incluyen γ, δ y α. Los ejemplos no limitantes de regiones constantes de cadena pesada también incluyen ε y μ. Cada
55 región constante pesada corresponde a un isotipo de anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo que comprende una región constante ε es un anticuerpo de IgG, un anticuerpo que comprende una región constante δ es un anticuerpo de IgD, y un anticuerpo que comprende una región constante α es un anticuerpo de IgA. Además, un anticuerpo que comprende una región constante μ es un anticuerpo de IgM, y un anticuerpo que comprende una región constante ε es un anticuerpo de IgE. Ciertos isotipos pueden subdividirse además en subclases. Por ejemplo, los anticuerpos de IgG incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de IgG1 (que comprenden una región constante γ₁), IgG2 (que comprende una región constante γ₂), IgG3 (que comprende una región constante γ₃) e IgG4 (que comprende una
60 región constante γ₄); anticuerpos de IgA incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de IgA1 (que comprenden una región constante α₁) e IgA2 (que comprenden una región constante α₂); y anticuerpos de IgM incluyen, pero no se limitan a, IgM1 e IgM2.

65 La expresión "**cadena pesada**" se refiere a un polipéptido que comprende al menos una región variable de cadena pesada, con o sin una secuencia conductora. En algunas realizaciones, una cadena pesada comprende al menos una parte de una región constante de cadena pesada. La expresión "**cadena pesada de longitud completa**" se refiere a un

polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada y una región constante de cadena pesada, con o sin una secuencia conductora.

5 La expresión "**región variable de cadena ligera**" se refiere a una región que comprende HVR1 de cadena ligera, marco (FR) 2, HVR2, FR3 y HVR3. En algunas realizaciones, una región variable de cadena ligera también comprende un FR1 y/o un FR4.

10 La expresión "**región constante de cadena ligera**" se refiere a una región que comprende un dominio constante de cadena ligera, C_L. Los ejemplos no limitantes de regiones constantes de cadena ligera incluyen λ y κ.

15 La expresión "**cadena ligera**" se refiere a un polipéptido que comprende al menos una región variable de cadena ligera, con o sin una secuencia conductora. En algunas realizaciones, una cadena ligera comprende al menos una parte de una región constante de cadena ligera. La expresión "cadena ligera de longitud completa" se refiere a un polipéptido que comprende una región variable de cadena ligera y una región constante de cadena ligera, con o sin una secuencia conductora.

20 La expresión "**región hipervariable**" o "**HVR**" se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son de secuencia hipervariable y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucle hipervariables"). Generalmente, los anticuerpos de cuatro cadenas nativas comprenden seis HVR; tres en V_H (H1, H2, H3) y tres en V_L (L1, L2, L3). Las HVR comprenden generalmente residuos de aminoácidos de los bucles hipervariables y/o de las 25 "regiones de determinación de la complementariedad" ("**CDR**"), donde estas últimas tienen la variabilidad de secuencia más alta y/o están involucradas en el reconocimiento de antígenos. Los ejemplos de bucles hipervariables se producen en los residuos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3). (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987).) Los ejemplos de CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) se producen en los residuos de aminoácidos 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, 31-35B de H1, 50-65 de H2 y 95-102 de H3. (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a Ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de la Salud, Bethesda, MD (1991)). Las expresiones regiones hipervariables (HVR) y regiones de determinación de la complementariedad (CDR) hacen ambos referencia a partes de la región variable que forman las regiones de unión al antígeno.

30 30 Un "**anticuerpo químérico**", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que comprende al menos una región variable de una primera especie (tal como ratones, ratas, macacos cangrejeros, etc.) y al menos una región constante de una segunda especie (tal como seres humanos, macacos cangrejeros, etc.). En algunas realizaciones, un anticuerpo químérico comprende al menos una región variable de ratón y al menos una región constante humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo químérico comprende al menos una región variable de macaco cangrejero y al menos una región constante humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo químérico comprende al menos una región variable de rata y al menos una región constante de ratón. En algunas realizaciones, todas las regiones variables de un anticuerpo químérico son de una primera especie y todas las regiones constantes del anticuerpo químérico son de una segunda especie.

40 40 Un "**anticuerpo humanizado**", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo en el que al menos un aminoácido en una región marco de una región variable no humana se ha remplazado con el aminoácido correspondiente de una región variable humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprende al menos una región constante humana o un fragmento de la misma. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado es un Fab, un scFv, un (Fab')₂, etc.

50 50 Un "**anticuerpo humano**", como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos producidos en seres humanos, anticuerpos producidos en animales no humanos que comprenden genes de inmunoglobulina humana, tales como XenoMouse®, y anticuerpos seleccionados usando métodos *in vitro*, tales como la expresión en fagos, en donde el repertorio de anticuerpos se basa en una secuencia de inmunoglobulina humana.

55 55 La expresión "**secuencia conductora**" se refiere a una secuencia de residuos de aminoácidos ubicados en el extremo N de un polipéptido que facilita la secreción de un polipéptido de una célula de mamífero. Se puede escindir una secuencia conductora tras la exportación del polipéptido de la célula de mamífero, formando una proteína madura. Las secuencias conductoras pueden ser naturales o sintéticas, y pueden ser heterólogas u homólogas con respecto a la proteína a la que están unidas. Los ejemplos no limitantes de secuencias conductoras también incluyen secuencias conductoras de proteínas heterólogas. En algunas realizaciones, un anticuerpo carece de una secuencia conductora. En algunas realizaciones, un anticuerpo comprende al menos una secuencia conductora, que puede seleccionarse de secuencias conductoras de anticuerpos nativos y secuencias conductoras heterólogas.

60 60 El término "**aislado/a**", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que se ha separado de al menos algunos de los componentes con los que se encuentra normalmente en la naturaleza. Por ejemplo, se hace referencia a un polipéptido como "aislado" cuando está separado de al menos algunos de los componentes de la célula en la que se produjo. Cuando un polipéptido es secretado por una célula después de la expresión, la separación física del sobrenadante que contiene el polipéptido de la célula que lo produjo se considera que "aísla" el polipéptido. De manera similar, un polinucleótido se denomina "aislado" cuando no forma parte del polinucleótido más grande (tal

como, por ejemplo, ADN genómico o ADN mitocondrial, en el caso de un polinucleótido de ADN) en el que normalmente se encuentra en la naturaleza, o está separado de al menos algunos de los componentes de la célula en la que se produjo, por ejemplo, en el caso de un polinucleótido de ARN. Por lo tanto, un polinucleótido de ADN que está contenido en un vector dentro de una célula hospedadora se puede denominar como "aislado" siempre que ese polinucleótido no se encuentre en ese vector en la naturaleza.

5 El término "**reducir**" o "**reduce**", cuando se aplica a un parámetro tal como el volumen tumoral, significa reducir el nivel de ese parámetro de una manera observable y medible. En algunas realizaciones, la reducción puede ser de al menos el 10 %, tal como de al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 % o al menos el 50 %. En algunas 10 realizaciones, la reducción puede ser estadísticamente significativa en comparación con un tratamiento o control alternativo.

15 Los términos "**sujeto**" y "**paciente**" se usan indistintamente en el presente documento para hacer referencia a un ser humano. En algunas realizaciones, también se proporcionan productos para usos médicos que comprenden el tratamiento de otros mamíferos, que incluyen, pero no se limitan a, roedores, simios, felinos, caninos, equinos, bovinos, 20 porcinos, ovinos, caprinos, animales de laboratorio mamíferos, animales de granja mamíferos, animales deportivos mamíferos y mascotas mamíferas.

25 Los términos "**resistente**" o "**sin respuesta**", cuando se usan en el contexto del tratamiento con un agente terapéutico, significan que el sujeto muestra una respuesta disminuida o falta de respuesta a una dosis estándar del agente terapéutico, en relación con la respuesta del sujeto a la dosis estándar del agente terapéutico en el pasado, o en relación con la respuesta esperada de un sujeto similar con un trastorno similar a la dosis estándar del agente terapéutico. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un sujeto puede ser resistente al agente terapéutico, aunque el sujeto no haya recibido previamente el agente terapéutico, o el sujeto puede desarrollar resistencia al agente terapéutico después de haber respondido al agente en una o más ocasiones anteriores.

30 El término "**muestra**", como se usa en el presente documento, se refiere a una composición que se obtiene o deriva de un sujeto que contiene una entidad celular y/u otra entidad molecular caracterizada, cuantificada y/o identificada, por ejemplo, en función de características físicas, bioquímicas, químicas y/o fisiológicas. Un ejemplo de muestra es una muestra de tejido.

35 La expresión "**muestra de tejido**" se refiere a un conjunto de células similares obtenidas de un tejido de un sujeto. La fuente de la muestra de tejido puede ser tejido sólido proveniente, por ejemplo, de una muestra o aspirado o biopsia de un tejido u órgano recién extraído, congelado y/o conservado; sangre o cualquier constituyente de la sangre; líquidos corporales, tales como líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, líquido peritoneal, líquido sinovial o líquido intersticial; células de cualquier momento de la gestación o el desarrollo del sujeto. En algunas realizaciones, una muestra de tejido es una muestra de tejido de biopsia sinovial y/o una muestra de líquido sinovial. En algunas realizaciones, una muestra de tejido es una muestra de líquido sinovial. La muestra de tejido también puede ser células principales cultivadas o líneas celulares. Opcionalmente, la muestra de tejido se obtiene de un tejido/órgano enfermo. 40 La muestra de tejido puede contener compuestos que no se entremezclen de manera natural con el tejido en la naturaleza, tales como conservantes, anticoagulantes, tampones, fijadores, nutrientes, antibióticos, o similares. Una "muestra de control" o un "tejido de control", como se usa en el presente documento, se refiere a una muestra, una célula o un tejido obtenido de una fuente que se sabe o se cree que no está afectada por la enfermedad por la cual el sujeto está en tratamiento.

45 A efectos del presente documento, una "**sección**" de una muestra de tejido se refiere a una parte o trozo de una muestra de tejido, tal como un corte delgado de tejido o de células de una muestra de tejido sólido.

50 El término "**cáncer**" se usa en el presente documento para hacer referencia a un grupo de células que presentan niveles anormalmente altos de proliferación y crecimiento. Un cáncer puede ser benigno (al que también se hace referencia como tumor benigno), premaligno o maligno. Las células cancerosas pueden ser células cancerosas sólidas (es decir, "**tumores sólidos**") o pueden ser células cancerosas leucémicas. La expresión "**crecimiento del cáncer**" se usa en el presente documento para hacer referencia a la proliferación o el crecimiento de una célula o células que comprenden un cáncer que conduce a un aumento correspondiente en el tamaño o la extensión del cáncer.

55 Los ejemplos de cánceres incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos no limitantes más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, carcinoma microcítico, cáncer hipofisario, cáncer de esófago, astrocitoma, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma broncopulmonar no microcítico (que incluye carcinoma broncopulmonar no microcítico de células escamosas), adenocarcinoma pulmonar, carcinoma escamoso pulmonar, cáncer peritoneal, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer renal, carcinoma de células renales, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, cáncer cerebral, cáncer de endometrio, cáncer testicular, colangiocarcinoma, carcinoma de vesícula biliar, cáncer gástrico, melanoma y diversos tipos de cánceres de cabeza y cuello (que incluyen carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello).

"**Tratamiento**", como se usa en el presente documento, se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en donde el objetivo es prevenir o ralentizar (reducir) la afección o trastorno patológico dirigido. En determinadas realizaciones, el término "**tratamiento**" cubre cualquier administración o aplicación de un agente terapéutico para la enfermedad en un mamífero, incluyendo un ser humano, e incluye inhibir o ralentizar la enfermedad o la progresión de la enfermedad; aliviar parcial o totalmente la enfermedad, por ejemplo, al provocar la regresión, o restauración o reparación de una función perdida, ausente o defectuosa; estimular un proceso ineficiente; o provocar que la meseta de la enfermedad tenga una gravedad reducida. El término "**tratamiento**" también incluye reducir la gravedad de cualquier característica fenotípica y/o reducir la incidencia, el grado o la probabilidad de esa característica. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos que tiene un trastorno, así como los propensos a tener el trastorno o aquellos en los que se va a prevenir el trastorno.

El término "**eficacia**", como se usa en el presente documento, puede determinarse a partir de uno o más parámetros, tales como la supervivencia o la supervivencia sin enfermedad durante un período de tiempo tal como 1 año, 5 años o 10 años, así como parámetros tales como la reducción en el crecimiento de uno o más tumores en un sujeto. Los parámetros de farmacocinética, tales como la biodisponibilidad y los parámetros subyacentes, tales como la tasa de depuración, también pueden afectar la eficacia. Por lo tanto, una "eficacia mejorada" (es decir, una mejora en la eficacia) puede deberse a una mejora en los parámetros farmacocinéticos, así como a una mejora de la potencia, y puede medirse mediante la comparación de las tasas de depuración y el crecimiento tumoral en animales de laboratorio o en seres humanos, así como parámetros tales como la supervivencia, la tasa de recurrencia o la supervivencia sin enfermedad.

La expresión "**cantidad eficaz**" o "**cantidad con eficacia terapéutica**" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o un trastorno en un sujeto. En determinadas realizaciones, una cantidad eficaz se refiere a una cantidad eficaz, en dosis y durante períodos de tiempo necesarios, para alcanzar el resultado profiláctico o terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un ECD de CD80 o una molécula de fusión de ECD de CD80 puede variar según factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del fármaco de provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz engloba una cantidad con la cual cualquier efecto tóxico o perjudicial del fármaco se ve superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. En algunas realizaciones, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad del fármaco que es eficaz para tratar el cáncer.

La administración "**en combinación con**" uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como un agente inmunoestimulador, incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva (en secuencia) en cualquier orden.

Un "**vehículo farmacéuticamente aceptable**" se refiere a un relleno, diluyente, material de encapsulación, auxiliar de formulación o vehículo no tóxico sólido, semisólido o líquido convencional en la técnica para usar con un agente terapéutico que en su conjunto comprenden una "**composición farmacéutica**" para la administración a un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable no es tóxico para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas y es compatible con otros componentes de la formulación. El vehículo farmacéuticamente aceptable es adecuado para la formulación empleada. Por ejemplo, si el agente terapéutico debe administrarse por vía oral, el vehículo puede ser una cápsula de gel. Si el agente terapéutico debe administrarse por vía subcutánea, el vehículo no es idealmente irritante para la piel y no provoca reacciones en el sitio de inyección.

Ejemplos de dominios extracelulares de CD80 y moléculas de fusión del dominio extracelular

En el presente documento se proporcionan ECD de CD80 y moléculas de fusión de ECD de CD80 (los ECD de CD80 no son según la invención reivindicada). Los ECD de CD80, por ejemplo, pueden comprender los ECD de la isoforma 1, la isoforma 2 y la isoforma 3 de CD80 humano (véanse SEQ ID NO: 1-3). Los ECD de CD80 también pueden comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

Las moléculas de fusión de ECD de CD80 pueden comprender compañeros de fusión, tales como polímeros, polipéptidos, restos lipófilos y grupos succinilo. Los ejemplos de compañeros de fusión de polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, albúmina sérica y un dominio Fc de IgG. Otros ejemplos de compañeros de fusión de polímeros incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol, que incluye polietilenglicoles que tienen cadenas ramificadas y/o lineales. Las secuencias de aminoácidos de determinados ejemplos de dominios Fc se muestran en SEQ ID NO: 9-16 en el presente documento.

En determinadas realizaciones, la molécula de fusión de ECD de CD80 puede carecer de un péptido señalizador. En determinadas realizaciones, el ECD de CD80 o la molécula de fusión de ECD de CD80 incluye al menos un péptido señalizador, que se puede seleccionar de un péptido señalizador nativo CD80 (SEQ ID NO: 7 o los aminoácidos 1-34 de SEQ ID NO: 1) y/o un péptido señalizador heterólogo (no según la reivindicación reivindicada).

En el caso de una molécula de fusión de ECD de CD80, el compañero de fusión puede estar enlazado al extremo amino o al extremo carboxi del polipéptido. En determinadas realizaciones, el polipéptido y el compañero de fusión se

enlazan covalentemente. Si el compañero de fusión también es un polipéptido ("el polipéptido compañero de fusión"), el polipéptido y el polipéptido compañero de fusión pueden ser parte de una secuencia continua de aminoácidos. En tales casos, el polipéptido y el polipéptido compañero de fusión pueden traducirse como un único polipéptido a partir de una secuencia de codificación que codifique tanto el polipéptido como el polipéptido compañero de fusión. En algunos de tales casos, los dos polipéptidos están directamente enlazados en secuencia de forma tal que el extremo N de un polipéptido sigue inmediatamente al extremo C del otro sin aminoácidos intermedios. En otros casos, se inserta una secuencia peptídica enlazadora entre los dos polipéptidos, tal como una secuencia enlazadora GS. En determinadas realizaciones, un ECD de CD80 y el compañero de fusión se unen covalentemente a través de otros medios, tales como, por ejemplo, un enlace químico distinto de un enlace peptídico. En determinadas realizaciones, el polipéptido y el compañero de fusión se enlazan no covalentemente. En determinadas realizaciones, pueden enlazarse, por ejemplo, usando pares de unión. Los ejemplos de pares de unión incluyen, pero no se limitan a, biotina y avidina o estreptavidina, un anticuerpo y su antígeno, etc.

Las moléculas de fusión de ECD de CD80 de la invención comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 20.

Las moléculas de fusión de ECD de CD80 pueden, dependiendo de cómo se producen, tener diferentes niveles de modificaciones de glucosilación particulares. Por ejemplo, una molécula de fusión de ECD de CD80 puede tener diferentes concentraciones de residuos de ácido siálico en relación con la concentración de la proteína de ECD del CD80. En algunas realizaciones, un mayor contenido de ácido siálico puede tener un tiempo de depuración más prolongado en el cuerpo y, por lo tanto, una biodisponibilidad general aumentada. En las moléculas de fusión de ECD de CD80 de la invención, el contenido de ácido siálico de la molécula de fusión de ECD de CD80 es de 15 a 60 moles de ácido siálico (SA) por mol de proteína. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el contenido de SA es de 15-40 moles de SA/mol de proteína, tal como 15-30 moles de SA/mol de proteína, tal como 15-25 mol de SA/moles de proteína, tal como 20-40 moles de SA/mol de proteína, tal como 20-30 moles de SA/mol de proteína, tal como 30-40 moles de SA/mol de proteína, tal como 10, 15, 20, 25, 30, 35 o 40 moles de SA/mol de proteína. En algunas realizaciones, el contenido de SA es de al menos 15 moles de SA/mol de proteína, tal como al menos 20 moles de SA/mol de proteína, al menos 25 moles de SA/mol de proteína, al menos 30 moles de SA/mol de proteína, al menos 35 moles de SA/mol de proteína o al menos 40 moles de SA/mol de proteína. En las moléculas de fusión de ECD de CD80 de la invención, el compañero de fusión es un dominio Fc de IgG1 humana.

En algunas realizaciones, el contenido de SA de la molécula de fusión de ECD de CD80 aumenta o se mantiene a un nivel relativamente alto en comparación con las moléculas de fusión de ECD de CD80 actuales. En algunas realizaciones, un aumento en el contenido de SA, tal como de 5, 10, 15, 20, 30, 40 o 50 moles de SA por mol de proteína de ECD de CD80, puede conducir a una eficacia mejorada en al menos un modelo de tumor singénico o de xenoinjerto de ratón. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el crecimiento tumoral en un modelo de tumor de ratón puede reducirse además en al menos un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 % 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % cuando hay un aumento en el contenido de SA, tal como de 5, 10, 15, 20, 30, 40 o 50 moles de SA por mol de proteína de ECD de CD80.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, una molécula de fusión de ECD de CD80-Fc, tal como una molécula de fusión que comprende un dominio Fc de IgG1 humana que comprende entre 15 y 60 moles de SA/mol de proteína, es capaz de al menos un 80 %, tal como al menos un 90 %, tal como al menos un 95 %, tal como al menos un 98 % de inhibición del crecimiento de células tumorales en al menos un modelo de cáncer singénico o de xenoinjerto de ratón durante un período de al menos diez días o al menos dos semanas o al menos tres semanas, tal como de diez días a dos semanas o de dos a tres semanas tras la inoculación con células tumorales. En algunas de tales realizaciones, la molécula comprende al menos 15 moles de SA/mol de proteína, tal como al menos 20 moles de SA/mol de proteína, o un intervalo de 15-30, 15-25 o 20-30 moles de SA/mol de proteína. En algunas realizaciones, el modelo de ratón es un modelo de tumor de ratón CT26, MC38 o B16. En algunas realizaciones, los ratones reciben de una a tres dosis de la molécula de 0,3 a 3,0 mg/kg, tal como de 0,3 a 0,6 mg/kg, por ejemplo, durante un período de una semana, una vez que los tumores han alcanzado un volumen mínimo. En las moléculas de fusión de ECD de CD80 de la invención, el dominio Fc comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 14. La molécula de fusión de ECD de CD80 de la invención comprende la secuencia de SEQ ID NO: 20.

En algunas realizaciones, la molécula de fusión de ECD de CD80-Fc reduce el crecimiento de células tumorales CT26 en ratones durante un período de al menos diez días o al menos dos semanas o al menos tres semanas, tal como de diez días a dos semanas o de dos a tres semanas, después de la inoculación en un grado mayor que una proteína de fusión de ECD de CD80-Fc con la secuencia de aminoácidos idéntica, pero un nivel más bajo de SA por mol de proteína. En algunas realizaciones, la molécula de fusión de ECD de CD80-Fc reduce el crecimiento de tumores CT26 en ratones durante un período de al menos diez días o al menos dos semanas, tal como durante diez días a dos semanas o de dos a tres semanas, después de la inoculación en un grado mayor que un anticuerpo anti-CTLA4, tal como el clon 9D9 del anticuerpo anti-CTLA4. En algunas de dichas realizaciones, se administra la molécula de ECD de CD80-Fc de una a tres veces a 0,3 mg/kg, 0,6 mg/kg o 3,0 mg/kg mientras que se administran dosis del anticuerpo anti-CTLA4 el mismo número de veces a 1,5 o 10 mg/kg. En algunas de dichas realizaciones, el modelo es un modelo de tumor murino CT26, MC38 o B16.

El Ejemplo 6 en el presente documento, por ejemplo, proporciona datos que muestran que el tratamiento de un modelo de tumor singénico de ratón con una molécula de fusión de ECD de CD80 que tiene 15 o 20 moles de SA/mol de proteína dio como resultado al menos el 93 % de inhibición del crecimiento tumoral después de una dosis de 0,3 mg/kg, mientras que el mismo tratamiento con una molécula que sólo tenía 5 moles de SA/mol de proteína no inhibió significativamente el crecimiento tumoral. De manera similar, una dosis de 0,6 mg/kg de la molécula de fusión de ECD de CD80 que tenía 15 o 20 moles de SA/mol de proteína dio como resultado una inhibición del 95 % al 98 % del crecimiento tumoral, mientras que el mismo tratamiento con la molécula con 5 moles de SA/mol de proteína inhibió el crecimiento tumoral en sólo el 70 % (véase la Figura 6). El grado de inhibición se evaluó aproximadamente tres semanas después de la inoculación con los tumores.

Además, el Ejemplo 7 en el presente documento muestra datos de una molécula de fusión de ECD de CD80-Fc (un sustituto de ratón) que tenía 20 moles de SA/mol de proteína en tres modelos de tumor de ratón singénico diferentes, los modelos CT26, MC38 y B16 a dosis de 0,3 mg/kg (CT26) o 3,0 mg/kg (MC38 y B16) en comparación con un anticuerpo anti-CTLA4 (clon 9D9) a dosis de 1,5 mg/kg y 10 mg/kg. Cada proteína se administró tres veces durante un periodo de 7 días algunos días después de la inoculación con células tumorales, como se representa en las Fig. 7-9 (las flechas muestran los días de administración). En cada caso, ECD de CD80-Fc fue superior en la inhibición del crecimiento tumoral con respecto al anticuerpo anti-CTLA4 durante el transcurso del estudio de dos a tres semanas (Fig. 7-9). Por ejemplo, en el modelo CT26 el día 21 después de la inoculación con células tumorales, la molécula de fusión de ECD de CD80-Fc mostró una reducción del 90 % en el crecimiento tumoral en comparación con el 75 % o 53 % para los dos niveles de dosis de anti-CTLA4. En el modelo MC38, el día 19 después de la inoculación, la molécula de ECD de CD80-Fc mostró una reducción de aproximadamente el 80 % en la inhibición del crecimiento tumoral en comparación con sólo el 21 % de crecimiento tumoral para la dosis más alta de anti-CTLA4 y ninguna inhibición del crecimiento tumoral para la dosis más baja de anti-CTLA4. En el modelo B16, la molécula de fusión de ECD de CD80-Fc mostró una reducción del crecimiento tumoral del 41 % el día 13 después de la inoculación, mientras que el anticuerpo anti-CTLA4 no inhibió el crecimiento tumoral a ningún nivel de dosis (véanse las Fig. 7-9).

Basándose en estos estudios, una molécula de fusión de ECD de CD80 puede ser capaz de un determinado porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral durante al menos un periodo de tiempo de dos semanas, por ejemplo, cuando aproximadamente dos semanas después de que los ratones hayan sido inoculados con las células tumorales, y también tras la administración de la molécula de fusión, se observa una inhibición del crecimiento tumoral promedio de aproximadamente el porcentaje establecido en los ratones tratados. Una molécula de fusión de ECD de CD80 puede ser capaz de un determinado porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral durante un periodo de tiempo de dos a tres semanas, por ejemplo, cuando entre dos y tres semanas después de que los ratones hayan sido inoculados con las células tumorales, y también tras la administración de la molécula de fusión, se observa una inhibición del crecimiento tumoral promedio de aproximadamente el porcentaje establecido en los ratones tratados.

Los Ejemplos 6 y 7 también muestran que muchos ratones del modelo CT26 tratados con la molécula de fusión de ECD de CD80 tuvieron una regresión tumoral completa durante estos periodos de tiempo de dos a tres semanas. Además, un mayor porcentaje de ratones tenía regresión tumoral completa con molécula de fusión de ECD de CD80 con mayor contenido de SA con los tratamientos de comparación y un mayor porcentaje de ratones tuvieron regresión tumoral completa con la molécula de fusión de ECD de CD80 que con un anticuerpo anti-CTLA4. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el tratamiento con la molécula de fusión de ECD de CD80, tal como con 0,3 mg/kg a 0,6 mg/kg de la molécula de fusión de ECD de CD80 o con 0,3 mg/kg a 3,0 mg/kg de molécula de fusión de ECD de CD80, puede dar lugar una regresión tumoral completa en ratones en un modelo singénico o de xenoinjerto tal como CT26, MC38 o B16.

Ejemplos de compañeros de fusión del dominio Fc

La molécula de fusión de ECD de CD80 de la invención tiene un dominio Fc como compañero de fusión que deriva de IgG1 humana. En las moléculas de fusión de ECD de CD80 de la invención, el dominio Fc tiene una secuencia de IgG1 humana natural. En otras realizaciones, el dominio Fc es una variante natural o manipulada (no según la invención reivindicada). En algunas realizaciones, se elige un dominio Fc que tiene interacciones alteradas del Fc con uno o más receptores de Fc gamma. En algunas realizaciones, se elige un dominio Fc que tiene interacciones alteradas del Fc con uno o más factores del complemento. En algunas realizaciones, se elige un dominio Fc que tiene interacciones alteradas del Fc con uno o más receptores Fc gamma y que tiene interacciones alteradas con uno o más factores del complemento.

En algunas realizaciones (no según la invención reivindicada), el dominio Fc comprende al menos una mutación puntual como se describe en el documento de patente WO 2014/144960. En algunas realizaciones (no según la invención reivindicada), el dominio Fc es un dominio Fc humano con una sustitución en una o más de las posiciones E233, L234, L235, P238, D265, N297, A327, P329 o P331 (donde la numeración de estas posiciones es de acuerdo con el índice EU como en Kabat). En algunas realizaciones (no según la invención reivindicada), el dominio Fc es un dominio Fc humano con una mutación en L234, L235 y/o P331. En algunas realizaciones (no según la invención reivindicada), el dominio Fc es un dominio Fc humano con las sustituciones L234F, L235E y P331S (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 12). En algunas realizaciones (no según la invención reivindicada), el dominio Fc tiene un

sustitución de aminoácido en la posición N297 (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 13). En algunas realizaciones (no según la invención reivindicada), el dominio Fc comprende una mutación C237S (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 9).

En algunas realizaciones (no según la invención reivindicada), un compañero de fusión Fc mutado provoca que la molécula de fusión de ECD de CD80-Fc tenga interacciones alteradas con uno o más receptores de Fc gamma en comparación con las de una molécula de fusión de ECD de CD80 con la misma secuencia de aminoácidos, excepto las mutaciones del dominio Fc. En algunas realizaciones (no según la invención reivindicada), el Fc tiene afinidad reducida con respecto a los receptores de Fc gamma tales como FcRN, RI, RIIA, RIIB y/o RIII en comparación con un dominio Fc natural. En algunas realizaciones (no según la invención reivindicada), el Fc tiene afinidad reducida con respecto a todos de FcRN, RI, RIIA, RIIB y RIII en comparación con un dominio Fc natural.

En algunas realizaciones (no según la invención reivindicada), un compañero de fusión Fc mutado provoca que la molécula de fusión de ECD de CD80-Fc tenga interacciones alteradas con uno o más factores del complemento tales como C1, C2, C3, C4 y sus productos de escisión, tales como C4a, C4b, C2a, C2b, C3a y C3b. En algunas realizaciones (no según la invención reivindicada), un compañero de fusión Fc mutado provoca que la molécula de fusión de ECD de CD80-Fc tenga interacciones alteradas con uno o más factores del complemento en comparación con las de una molécula de fusión de ECD de CD80 con la misma secuencia de aminoácidos, excepto las mutaciones del dominio Fc.

En las moléculas de fusión de ECD de CD80 de la invención, el ECD de CD80 y el compañero de fusión Fc se unen directamente de forma que el aminoácido del extremo N o C del Fc preceda o suceda inmediatamente al aminoácido del extremo N o C de la secuencia de ECD de CD80 (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 20). En otras realizaciones (no según la invención reivindicada), el ECD de CD80 y el compañero de fusión se unen mediante una molécula enlazadora, tal como por una secuencia de péptidos enlazadora, tal como por una secuencia enlazadora de GS.

Composiciones y métodos terapéuticos

Usos médicos para el tratamiento del cáncer

En algunas realizaciones, se proporcionan productos para usos médicos para el tratamiento del cáncer, que comprenden administrar una cantidad eficaz de una composición de la invención o una molécula de fusión de ECD de CD80 de la invención.

En algunas realizaciones, el cáncer puede ser benigno (al que también se hace referencia como tumor benigno), premaligno o maligno. En algunas realizaciones, el cáncer puede comprender células cancerosas sólidas (es decir, "tumores sólidos") o, alternativamente, puede comprender células cancerosas leucémicas. En algunas realizaciones, la composición o la molécula de fusión de ECD de CD80 es eficaz para reducir el crecimiento del cáncer en un sujeto humano o animal, o en un modelo singénico o de xenoinjerto de ratón para el cáncer que se trata. En algunas realizaciones, la composición o la molécula de fusión de ECD de CD80 es eficaz para reducir el volumen del tumor, tal como en un modelo singénico o de xenoinjerto de ratón para el cáncer que se trata.

Los ejemplos de cánceres particulares que pueden tratarse incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos no limitantes más particulares de dichos cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de células escamosas, carcinoma microcítico, cáncer hipofisario, cáncer de esófago, astrocitoma, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma broncopulmonar no microcítico (que incluye carcinoma broncopulmonar no microcítico de células escamosas), adenocarcinoma pulmonar, carcinoma escamoso pulmonar, cáncer peritoneal, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer renal, carcinoma de células renales, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, cáncer cerebral, cáncer de endometrio, cáncer testicular, colangiocarcinoma, carcinoma de vesícula biliar, cáncer gástrico, melanoma y diversos tipos de cánceres de cabeza y cuello (que incluyen carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello).

En cualquiera de los usos médicos anteriores, la composición o la molécula de fusión de ECD de CD80 administrada al sujeto puede inhibir el crecimiento tumoral en un modelo de cáncer de xenoinjerto singénico de ratón durante un período de 1 semana, 10 días, 2 semanas o 3 semanas, por ejemplo, en al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 %. En algunas realizaciones, la composición o la molécula de fusión de ECD de CD80 puede inhibir el crecimiento tumoral en un modelo de tumor de xenoinjerto de ratón CT26 en al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % a las dos semanas o a las tres semanas después de la inoculación. En algunos de dichos casos, la molécula de fusión se puede administrar de una a tres veces de 0,3 a 3 mg/kg, tal como de 0,3 a 0,6 mg/kg. En cualquiera de los usos médicos anteriores, la administración de la composición o la molécula de fusión de ECD de CD80 administrada al sujeto puede reducir el volumen de al menos un tumor en un sujeto humano o animal en al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 %, por ejemplo, durante un período de un mes, dos meses,

tres meses, seis meses o un año. En algunos casos, la composición o la molécula de fusión de ECD de CD80-Fc puede ser capaz de dar como resultado una regresión tumoral completa en un modelo de tumor de ratón, tal como un modelo CT26, por ejemplo, en una parte significativa de los ratones analizados, tal como al menos el 40 % o al menos el 50 % de los ratones.

- 5 En cualquiera de estos usos médicos, la molécula de fusión de ECD de CD80 es una molécula ECD de CD80-Fc comprende 15-60 moles de SA por mol de proteína de ECD de CD80-Fc. En algunas realizaciones, el contenido es 15-40 moles de SA/mol de proteína, tal como 20-40 moles de SA/mol de proteína, 20-30 moles de SA/mol de proteína, 15-25 moles de SA/mol de proteína, 15-30 moles de SA por mol de proteína, o 30-40 moles de SA/mol de proteína.
- 10 En algunas realizaciones, el contenido de SA es de al menos 15, tal como al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35 o al menos 40 moles de SA/mol de proteína. En algunas realizaciones, el contenido de SA es de 15, 20, 25, 30, 35 o 40 moles de SA/mol de proteína. En las moléculas de fusión de ECD de CD80 de la invención, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1 humana y comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. La molécula de fusión de ECD de CD80 de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.
- 15

Tratamientos de combinación con agentes inmunoestimuladores que incluyen inhibidores de PD-1/PD-L1

- En algunas realizaciones, las moléculas de fusión de ECD de CD80 de la invención se usan para el tratamiento de uno de los cánceres anteriores en combinación con una cantidad eficaz de al menos un agente inmunoestimulador.
 - 20 Los agentes inmunoestimuladores pueden incluir, por ejemplo, un fármaco de molécula pequeña o un producto biológico. Los ejemplos de agentes inmunoestimuladores biológicos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, fragmentos de polipéptidos receptores o de ligandos, por ejemplo, que bloquean la unión receptor-ligando, vacunas y citocinas.
 - 25 En algunas realizaciones, el al menos un agente inmunoestimulador comprende un agonista de una molécula inmunoestimuladora, incluida una molécula coestimuladora, mientras que en algunas realizaciones, el al menos un agente inmunoestimulador comprende un antagonista de una molécula inmunoinhibidora, incluida una molécula coinhibidora. En algunas realizaciones, el al menos un agente inmunoestimulador comprende un agonista de una molécula inmunoestimuladora, incluida una molécula coestimuladora, que se encuentra en las células inmunitarias, tales como los linfocitos T. En algunas realizaciones, el al menos un agente inmunoestimulador comprende un agonista de una molécula inmunoinhibidora, incluida una molécula coinhibidora, que se encuentra en las células inmunitarias, tales como los linfocitos T. En algunas realizaciones, el al menos un agente inmunoestimulador comprende un agonista de una molécula inmunoestimuladora, incluida una molécula coestimuladora, que se encuentra en células involucradas en la inmunidad innata, tales como los linfocitos NK. En algunas realizaciones, el al menos un agente inmunoestimulador comprende un agonista de una molécula inmunoinhibidora, incluida una molécula coinhibidora, que se encuentra en células involucradas en la inmunidad innata, tales como los linfocitos NK. En algunas realizaciones, la combinación potencia la respuesta de linfocitos T específicos para el antígeno en el sujeto tratado y/o mejora la respuesta de inmunidad innata en el sujeto. En algunas realizaciones, la combinación da lugar a una respuesta antitumoral mejorada en un modelo de cáncer animal, tal como un modelo singénico o de xenoinjerto, en comparación con la administración de la molécula de fusión de ECD de CD80 o el agente inmunoestimulador solo. En algunas realizaciones, la combinación da lugar a una respuesta sinérgica en un modelo de cáncer animal, tal como un modelo singénico o de xenoinjerto, en comparación con la administración de la molécula de fusión de ECD de CD80 o el agente inmunoestimulador solo.
 - 35
 - 40
 - 45
 - 50
 - 55
 - 60
 - 65
- En cualquiera de los usos médicos que comprenden la terapia de combinación, la combinación de la molécula de fusión de ECD de CD80 con el agente inmunoestimulador, tal como un inhibidor de PD-1/PD-L1, que se administra al sujeto puede inhibir el crecimiento tumoral en un modelo de cáncer singénico o de xenoinjerto de ratón durante un período de 1 semana, 10 días, 2 semanas o 3 semanas, por ejemplo, en al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 %. En cualquiera de los usos médicos que comprenden la terapia de combinación, la combinación de la molécula de fusión de ECD de CD80 con el agente inmunoestimulador, tal como un inhibidor de PD-1/PD-L1, que se administra al sujeto puede reducir el volumen de al menos un tumor en el sujeto o en un modelo animal en al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 %, por ejemplo, durante un período de un mes, dos meses, tres meses, seis meses o un año.
- En cualquiera de los usos médicos que comprenden la terapia de combinación, la molécula de fusión de ECD de CD80 es una ECD de CD80-Fc que comprende 15-60 moles de SA/mol de proteína de ECD de CD80-Fc. En algunas realizaciones, el contenido es 15-40 moles de SA/mol de proteína, tal como 20-40 moles de SA/mol de proteína, 20-30 moles de SA/mol de proteína, 15-25 moles de SA/mol de proteína, 15-30 moles de SA por mol de proteína, o 30-40 moles de SA/mol de proteína. En algunas realizaciones, el contenido de SA es de al menos 15, tal como al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35 o al menos 40 moles de SA/mol de proteína. En algunas realizaciones, el contenido de SA es de 15, 20, 25, 30, 35 o 40 moles de SA/mol de proteína. En las moléculas de fusión de ECD de CD80 de la invención, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1 humana y comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. La molécula de fusión de ECD de CD80 de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

- En determinadas realizaciones, un agente inmunoestimulador puede dirigirse a una molécula estimuladora o inhibidora que es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF). Por ejemplo, un agente inmunoestimulador puede ser un agente que se dirija (o se una específicamente a) otro miembro de la familia B7 de polipéptidos. Un agente inmunoestimulador puede ser un agente que se dirija a un miembro de la familia TNF de ligandos unidos a la membrana o un receptor coestimulador o coinhibidor que se une específicamente a un miembro de la familia de TNF. Los ejemplos de miembros de la familia de TNF y TNFR que pueden ser dianas de los agentes inmunoestimuladores incluyen CD40 y CD40L, OX-40, OX-40L, GITR, GITRL, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137 (4-1BB), TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LT β R, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDAR, EDA1, XEDAR, EDA2, TNFR1, linfotoxina α /TNF β , TNFR2, TNFa, LT β R, linfotoxina α 1 β 2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY y NGFR.
- En algunas realizaciones, un agente inmunoestimulador puede comprender (i) un antagonista de una proteína que inhibe la activación de linfocitos T (por ejemplo, un inhibidor inmunitario del punto de control), tal como CTLA4, LAG-3, TIM3, galectina 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, galectina-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, B7-H3, B7-H4, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1, TIM-4 e ILT4 y/o puede comprender (ii) un agonista de una proteína que estimula la activación de linfocitos T, tales como B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, GITR, GITRL, CD70, CD27, CD40, CD40L, DR3 y CD28H.
- En algunas realizaciones, un agente inmunoestimulador puede comprender un agente que inhiba o sea un antagonista de una citocina que inhibía la activación de los linfocitos T (por ejemplo, IL-6, IL-10, TGF- β , VEGF y otras citocinas inmunosupresoras) y en algunas realizaciones un agente inmunoestimulador puede comprender un agente que sea un agonista de una citocina, tal como IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 e IFN α (por ejemplo, la propia citocina) que estimule la activación de los linfocitos T. En algunas realizaciones, los agentes inmunoestimuladores pueden comprender un antagonista de una quimiocina, tal como CXCR2 (por ejemplo, MK-7123), CXCR4 (por ejemplo, AMD3100), CCR2 o CCR4 (mogamulizumab).
- En algunas realizaciones, los agentes inmunoestimuladores pueden incluir antagonistas de receptores inhibidores en linfocitos NK o agonistas de receptores activadores en linfocitos NK. Por ejemplo, una molécula de fusión de ECD de CD80 puede combinarse con un antagonista de KIR.
- Los agentes inmunoestimuladores también pueden incluir agentes que inhiben señalización de TGF- β , agentes que potencian la presentación de antígenos tumorales, por ejemplo, vacunas de células dendríticas, vacunas celulares secretoras de GM-CSF, oligonucleótidos CpG e imiquimod, o terapias que mejoren la inmunogenicidad de las células tumorales (por ejemplo, antraciclinas).
- Los agentes inmunoestimuladores también pueden incluir determinadas vacunas, tales como las vacunas dirigidas contra la mesotelina o vacunas atenuadas contra el cáncer de listeria, tales como CRS-207.
- Los agentes inmunoestimuladores también pueden comprender agentes que eliminan o bloquean los linfocitos Treg, tales como agentes que se unan específicamente al CD25.
- Los agentes inmunoestimuladores también pueden comprender agentes que inhiban una enzima metabólica, tal como la indolamina dioxigenasa (IDO), dioxigenasa, arginasa u óxido nítrico sintetasa.
- Los agentes inmunoestimuladores también pueden comprender agentes que inhiban la formación de adenosina o inhiban el receptor de adenosina A2A.
- Los agentes inmunoestimuladores también pueden comprender agentes que inviertan/prevengan la anergia o el agotamiento de los linfocitos T y agentes que desencadenen una inflamación y/o activación inmunitaria innata en el sitio del tumor.
- En algunas realizaciones, los agentes inmunoestimuladores pueden comprender un agonista CD40 como anticuerpo agonista contra CD40. La molécula de fusión de ECD de CD80 de la invención también pueden combinarse con una estrategia de combinación que se dirija a múltiples elementos de la vía inmunitaria, tales como uno o más de los siguientes: al menos un agente que mejore la presentación de antígenos tumorales (por ejemplo, vacuna de células dendríticas, vacunas celulares de secreción de GM-CSF, oligonucleótidos CpG, imiquimod); al menos un agente que inhiba la regulación inmunitaria negativa, por ejemplo, mediante la inhibición de la vía de CTLA4 y/o la eliminación o el bloqueo de Treg u otras células supresoras inmunitarias; una terapia que estimule la regulación inmunitaria positiva, por ejemplo, con agonistas que estimulen la vía de CD-137, OX-40 y/o GITR y/o estimulen la función efectora de los linfocitos T; al menos un agente que aumente sistémicamente la frecuencia de los linfocitos T antitumorales; una terapia que elimine o inhiba los Treg, tales como Treg en el tumor, por ejemplo, usando un antagonista del CD25 (por ejemplo, daclizumab) o mediante la eliminación de microesferas anti-CD25 *ex vivo*; al menos un agente que afecte la función de las células mieloides supresoras en el tumor; una terapia que aumente la inmunogenicidad de las células tumorales (por ejemplo, antraciclinas); la transferencia adoptiva de linfocitos T o linfocitos NK que incluye células genéticamente

- modificadas, por ejemplo, células modificadas por receptores de antígenos químéricos (terapia CAR-T); al menos un agente que inhiba una enzima metabólica tal como la indolamina dioxigenasa (IDO), dioxigenasa, arginasa u óxido nítrico sintetasa; al menos un agente que invierta/prevenga la anergia o el agotamiento de los linfocitos T; una terapia que desencadene una activación inmunitaria innata y/o inflamación en el sitio del tumor; la administración de citocinas inmunoestimuladoras o el bloqueo de citocinas inmunorrepresoras.
- Por ejemplo, una molécula de fusión de ECD de CD80 puede usarse con uno más agentes agonistas que liguen receptores coestimuladores positivos; uno o más antagonistas (agentes de bloqueo) que atenúen la señalización a través de los receptores inhibidores, tales como antagonistas que superen distintas vías immunosupresoras dentro del microentorno tumoral; uno o más agentes que aumenten sistémicamente la frecuencia de las células inmunitarias antitumorales, tales como los linfocitos T, eliminan o inhiben los Treg (por ejemplo, mediante la inhibición del CD25); uno o más agentes que inhiban enzimas metabólicas tales como IDO; uno o más agentes que inviertan/prevengan la anergia o el agotamiento de los linfocitos T; y uno o más agentes que desencadenen la activación inmunitaria innata y/o la inflamación en los sitios tumorales.
- En una realización, el al menos un agente inmunoestimulador comprende un agonista CTLA4, tal como un anticuerpo antagonista contra CTLA4. Los anticuerpos contra CTLA4 adecuados incluyen, por ejemplo, YERVOY (ipilimumab) o tremelimumab.
- En algunas realizaciones, el al menos un agente inmunoestimulador comprende un agonista LAG-3, tal como un anticuerpo antagonista contra LAG-3. Los anticuerpos contra LAG-3 adecuados incluyen, por ejemplo, BMS-986016 (documento de patente WO10/19570, WO14/08218) o IMP-731 o IMP-321 (documentos de patente WO08/132601, WO09/44273).
- En algunas realizaciones, el al menos un agente inmunoestimulador comprende un agonista CD137 (4-1BB), tal como un anticuerpo agonista contra CD137. Los anticuerpos contra CD137 adecuados incluyen, por ejemplo, urelumab y PF-05082566 (documento de patente WO12/32433).
- En algunas realizaciones, el al menos un agente inmunoestimulador comprende un agonista GITR, tal como un anticuerpo antagonista contra GITR. Los anticuerpos contra GITR adecuados incluyen, por ejemplo, TRX-518 (documentos de patente WO06/105021, WO09/009116), MK-4166 (documento de patente WO11/028683) o un anticuerpo contra GITR desvelado en el documento de patente WO2015/031667.
- En algunas realizaciones, el al menos un agente inmunoestimulador comprende un agonista OX40, tal como un anticuerpo agonista contra OX40. Los anticuerpos contra OX40 adecuados incluyen, por ejemplo, MEDI-6383, MEDI-6469 o MOXR0916 (RG7888; documento de patente WO06/029879).
- En algunas realizaciones, el al menos un agente inmunoestimulador comprende un agonista CD27, tal como un anticuerpo agonista contra CD27. Los anticuerpos contra CD27 adecuados incluyen, por ejemplo, varlilumab (CDX-1127).
- En algunas realizaciones, el al menos un agente inmunoestimulador comprende MGA271, que se dirige a B7H3 (documento de patente WO11/109400).
- En algunas realizaciones, el al menos un agente inmunoestimulador comprende un agonista KIR, tal como lirilumab.
- En algunas realizaciones, el al menos un agente inmunoestimulador comprende un antagonista de IDO. Los antagonistas de IDO incluyen, por ejemplo, INCB-024360 (documentos de patente WO2006/122150, WO07/75598, WO08/36653, WO08/36642), indoximod, NLG-919 (documentos de patente WO09/73620, WO09/1156652, WO11/56652, WO12/142237) o F001287.
- En algunas realizaciones, el al menos un agente inmunoestimulador comprende un agonista del receptor tipo Toll, por ejemplo, un agonista de TLR2/4 (por ejemplo, Bacillus Calmette-Guerin); un agonista de TLR7 (por ejemplo, Hiltonol o Imiquimod); un agonista de TLR7/8 (por ejemplo, Resiquimod); o un agonista de TLR9 (por ejemplo, CpG7909).
- En algunas realizaciones, el al menos un agente inmunoestimulador comprende un inhibidor de TGF-β, por ejemplo, GC1008, LY2157299, TEW7197 o IMC-TR1.
- En algunas realizaciones, la molécula de fusión de ECD de CD80 se administra para tratar uno de los cánceres anteriores en combinación con una cantidad eficaz de un inhibidor de PD-1/PD-L1.

Ejemplos de inhibidores de PD-1/PD-L1

Los inhibidores de PD-1/PD-L1 incluyen anticuerpos, proteínas de fusión y péptidos. Un ejemplo no limitante de proteína de fusión que es un inhibidor de PD-1/PD-L1 es AMP-224 (Amplimmune, GlaxoSmithKline). Un ejemplo no limitante de polipéptido que es un inhibidor de PD-1/PD-L1 es AUR-012. Otros ejemplos de inhibidores de PD-1/PD-

L1 incluyen anticuerpos que inhiben la PD-1, tales como anticuerpos anti-PD-1 y anticuerpos anti-PD-L1. Dichos anticuerpos pueden ser anticuerpos humanizados, anticuerpos químicos, anticuerpos de ratón y anticuerpos humanos.

- 5 En algunas realizaciones, la combinación da lugar a una respuesta antitumoral mejorada en un modelo de cáncer animal, tal como un modelo de xenoinjerto, en comparación con la administración de la molécula de fusión de ECD de CD80 o el inhibidor de PD-1/PD-L1 solo. En algunas realizaciones, la combinación da lugar a una respuesta sinérgica en un modelo de cáncer animal, tal como un modelo de xenoinjerto, en comparación con la administración de la molécula de fusión de ECD de CD80 o el inhibidor de PD-1/PD-L1 solo.
- 10 PD-1 es un receptor inmunitario del punto de control expresado por linfocitos T y B activados y media en la inmunosupresión. PD-1 es un miembro de la familia CD28 de receptores, que incluye CD28, CTLA4, ICOS, PD-1 y BTLA. Se han identificado dos ligandos de la glucoproteína de la superficie celular para PD-1, el ligando de muerte programada 1 (PD-L1) y el ligando de muerte programada 2 (PD-L2). Estos ligandos se expresan en células presentadoras de抗igenos, así como en muchos cánceres humanos y se ha mostrado que regulan por disminución la activación de linfocitos T y la secreción de citocinas tras la unión a PD-1. La inhibición de la interacción PD-1/PD-L1 media en una potente actividad antitumoral en modelos preclínicos.
- 15 Se han desvelado anticuerpos monoclonales humanos (HuMAb) que se unen específicamente a PD-1 con alta afinidad en la patente de EE. UU. N.º 8.008.449. Otros mAb anti-PD-1 se han descrito en, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 6.808.710, 7.488.802, 8.168.757 y 8.354.509, y la publicación PCT n.º WO 2012/145493. Cada uno de los HuMAb anti-PD-1 desvelados en la patente de EE. UU. n.º 8.008.449: (a) se une a human PD-1 con una K_D de 1×10^{-7} o menos, como se ha determinado por resonancia de plasmiones superficiales usando un sistema biosensor Biacore; (b) no se une sustancialmente a CD28, CTLA-4 o ICOS humanos; (c) aumenta la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción mixta de linfocitos (MLR); (d) aumenta la producción de interferón-γ en un ensayo MLR; (e) aumenta la secreción de IL-2 en un ensayo MLR; (f) se une a PD-1 humana y PD-1 de macaco cangrejero; (g) inhibe la unión de PD-L1 y/o PD-L2 a PD-1; (h) estimula las respuestas de memorias específicas de antígeno; (i) estimula las respuestas de anticuerpos; y/o (j) inhibe el crecimiento de células tumorales *in vivo*. Los anticuerpos anti-PD-1 utilizables en la presente invención incluyen anticuerpos que se unen específicamente a PD-1 humana y presentan al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco de las características (a) a (j) precedentes.
- 20 En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 es nivolumab. El nivolumab (también conocido como "Opdivo®"; anteriormente denominado 5C4, BMS-936558, MDX-1106 u ONO-4538) es un anticuerpo inhibidor inmunitario de los puntos de control de PD-1 de IgG4 humana de longitud completa (S228P) que evita selectivamente la interacción con los ligandos de PD-1 (PD-L1 y PD-L2), bloqueando así la regulación por disminución de las funciones antitumorales de los linfocitos T (patente de EE. UU. n.º 8.008.449; Wang et al., 2014 Cancer Immunol Res. 2(9):846-56).
- 25 En otra realización, el anticuerpo anti-PD-1 es pembrolizumab. Pembrolizumab (también conocido como "Keytruda®", lambrolizumab y MK-3475) es un anticuerpo IgG4 monoclonal humanizado dirigido contra el receptor de la superficie celular humana PD-1 (muerte programada 1 o muerte celular programada 1). Pembrolizumab se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 8.900.587; véase también el sitio con la dirección: "www.cancer.gov/drugdictionary?cdrid=695789" (último acceso: 14 de diciembre de 2014). Pembrolizumab ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de melanoma recidivante o refractario.
- 30 En otras realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es MEDI0608 (anteriormente AMP-514), que es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de PD-1. MEDI0608 se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 8.609.089 B2 o en www.cancer.gov/drugdictionary?cdrid=756047 (último acceso 14 de diciembre de 2014).
- 35 Los anticuerpos anti PD-1 utilizables en los usos médicos desvelados también incluyen anticuerpos aislados que se unen específicamente a PD-1 humana y compiten de forma cruzada por la unión a PD-1 humana con nivolumab (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 8.008.449; documento de patente WO 2013/173223). La capacidad de los anticuerpos para competir de forma cruzada por la unión a un antígeno indica que estos anticuerpos se unen a la misma región de epítopo del antígeno e impiden estéricamente la unión de otros anticuerpos que compiten de forma cruzada por esa región de epítopo particular. Se espera que estos anticuerpos que compiten de forma cruzada tengan propiedades funcionales muy similares a las de nivolumab en virtud de su unión a la misma región de epítopo de PD-1. Los anticuerpos que compiten de forma cruzada pueden ser fácilmente identificados basándose en su capacidad para competir de forma cruzada con nivolumab en ensayos de unión habituales de PD-1 tales como análisis Biacore, ensayos ELISA o citometría de flujo (véase, por ejemplo, el documento de patente WO 2013/173223).
- 40 En determinadas realizaciones, los anticuerpos que compiten de forma cruzada por la unión a PD-1 humana con la región de epítopo de PD-1 humana, o se unen a ella, como nivolumab, son anticuerpos monoclonales. Para la

administración a sujetos humanos, estos anticuerpos que compiten de forma cruzada pueden ser anticuerpos quiméricos, o pueden ser anticuerpos humanizados o humanos.

Los anticuerpos anti-PD-1 utilizables en los usos médicos de la invención desvelada también incluyen porciones de unión al antígeno de los anticuerpos anteriores. Los ejemplos incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1} ; y (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo.

10 Administración de ECD de CD80 o proteínas de fusión de ECD de CD80 en combinación con agentes inmunoestimuladores o inhibidores de PD-1/PD-L1

En algunas realizaciones, la molécula de fusión de ECD de CD80 y el agente inmunoestimulador o inhibidor de PD-1/PD-L1 se administran simultáneamente. En algunas realizaciones, la molécula de fusión de ECD de CD80 y el agente inmunoestimulador o inhibidor de PD-1/PD-L1 se administran uno detrás de otro. En algunas realizaciones, al menos una, al menos dos, al menos tres dosis, al menos cinco dosis, o al menos diez dosis de una molécula de fusión de ECD de CD80 se administra antes de la administración de un agente inmunoestimulador o inhibidor de PD-1/PD-L1. En algunas realizaciones, al menos una, al menos dos, al menos tres dosis, al menos cinco dosis, o al menos diez dosis de un agente inmunoestimulador o inhibidor de PD-1/PD-L1 se administra antes de la administración de una molécula de fusión de CD80. En algunas realizaciones, la última dosis del agente inmunoestimulador o inhibidor de PD-1/PD-L1 se administra al menos uno, dos, tres, cinco o diez días, o una, dos, tres, cinco, doce o veinticuatro semanas antes de la primera dosis de la molécula de fusión de CD80. En alguna otra realización, la última dosis de la molécula de fusión de CD80 se administra al menos una, dos, tres, cinco o diez días, o una, dos, tres, cinco, doce, o veinticuatro semanas antes de la primera dosis del agente inmunoestimulador o inhibidor de PD-1/PD-L1. En algunas realizaciones, un sujeto ha recibido, o está recibiendo, terapia con agente inmunoestimulador o inhibidor de PD-1/PD-L1, y se añade una molécula de fusión de CD80 a la pauta terapéutica.

En algunas realizaciones, el sujeto es un paciente que no responde de forma adecuada a agentes inmunoestimuladores o inhibidores de PD-1/PD-L1 (es decir, muestra resistencia a uno o más agentes inmunoestimuladores o inhibidores de PD-1/PD-L1). Un sujeto que es un paciente que no responde de forma adecuada a inhibidores de PD-1/PD-L1 puede haber respondido previamente a un inhibidor de PD-1/PD-L1, pero se ha vuelto menos sensible al inhibidor de PD-1/PD-L1, o el sujeto puede no haber respondido nunca al inhibidor de PD-1/PD-L1. La respuesta inadecuada a un agente inmunoestimulador o inhibidor de PD-1/PD-L1 significa que no mejoran los aspectos de la afección que cabría que mejoraran tras una dosis habitual del inhibidor de PD-1/PD-L1, y/o la mejora sólo ocurre si se administra más de una dosis habitual. En algunas realizaciones, un paciente que no responde de forma adecuada a agentes inmunoestimuladores o inhibidores de PD-1/PD-L1 ha experimentado, o está experimentando, una respuesta inadecuada al fármaco después de recibir una dosis habitual durante al menos dos semanas, al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos seis semanas o al menos doce semanas. Un profesional médico puede determinar una dosis "habitual" de un agente inmunoestimulador o inhibidor de PD-1/PD-L1, y puede depender de la edad, peso, antecedentes de salud, gravedad de la enfermedad, frecuencia de administración, etc., del sujeto. En algunas realizaciones, un paciente que no responde de forma adecuada a agentes inmunoestimuladores o inhibidores de PD-1/PD-L1 ha experimentado, o está experimentando, una respuesta inadecuada a un anticuerpo anti-PD-1 y/o un anticuerpo anti-PD-L1. En algunas realizaciones, un paciente que no responde de forma adecuada a inhibidores de PD-1/PD-L1 ha experimentado, o está experimentando, una respuesta inadecuada a AMP-224. En algunas realizaciones, un paciente que no responde de forma adecuada a inhibidores de PD-1/PD-L1 ha experimentado, o está experimentando, una respuesta inadecuada a un inhibidor de PD-1/PD-L1 seleccionado de nivolumab, pidilizumab y pembrolizumab.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, la combinación de la molécula de fusión de ECD de CD80 con el inhibidor de PD-1/PD-L1 que se administra al sujeto puede inhibir el crecimiento tumoral en un modelo de cáncer singénico o de xenoinjerto de ratón durante un período de 1 semana, 10 días o 2 semanas, por ejemplo, en al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 %. En cualquiera de los usos médicos que comprenden la terapia de combinación, la combinación de la molécula de fusión de ECD de CD80 con el inhibidor de PD-1/PD-L1 que se administra al sujeto puede reducir el volumen de al menos un tumor en el sujeto o en un sujeto del modelo animal en al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 %, por ejemplo, durante un período de un mes, dos meses, tres meses, seis meses o un año.

En cualquiera de estos usos médicos que comprenden la terapia de combinación, la molécula de fusión de ECD de CD80 puede ser una ECD de CD80-Fc que comprende 15-60 moles de SA por mol de proteína de ECD de CD80-Fc. En algunas realizaciones, el contenido es 15-40 moles de SA/mol de proteína, tal como 20-40 moles de SA/mol de proteína, 20-30 moles de SA/mol de proteína, 15-25 moles de SA/mol de proteína, 15-30 moles de SA por mol de proteína, o 30-40 moles de SA/mol de proteína. En algunas realizaciones, el contenido de SA es de al menos 15, tal como al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35 o al menos 40 moles de SA/mol de proteína. En algunas realizaciones, el contenido de SA es de 15, 20, 25, 30, 35 o 40 moles de SA/mol de proteína. En las moléculas de

fusión de ECD de CD80 de la invención, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1 humana y comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. La molécula de fusión de ECD de CD80 de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

5 **Vías de administración y vehículos**

En diversas realizaciones, los polipéptidos y las moléculas de fusión se pueden administrar *in vivo* por diversas vías, que incluyen, pero no se limitan a, oral, intrarterial, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, intracardíaca, intraventricular, intratraqueal, bucal, rectal, intraperitoneal, intradérmica, tópica, transdérmica e intratecal, o de otro modo mediante implantación o inhalación. Las composiciones objeto de la presente se pueden formular en preparados en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas; incluyendo, pero no se limitan a, comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, ungüentos, disoluciones, supositorios, enemas, inyecciones, inhalantes y aerosoles. Una molécula del ácido nucleico que codifica un polipéptido se puede recubrir sobre micropartículas de oro y administrarse por vía intradérmica mediante un dispositivo de bombardeo de partículas, o "pistola génica", como se describe en la bibliografía (véase, por ejemplo, Tang et al., *Nature* 356:152-154 (1992)). La formulación y vía de administración adecuadas se pueden seleccionar según la aplicación prevista.

En diversas realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden polipéptidos en formulaciones con una amplia variedad de vehículos farmacéuticamente aceptables (véase, por ejemplo, Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, 20.^a ed. (2003); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7.^a ed., Lippencott Williams y Wilkins (2004); Kibbe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3.^a ed., Pharmaceutical Press (2000)). Están disponibles diversos vehículos farmacéuticamente aceptables, que incluyen vehículos, adyuvantes y diluyentes. Además, también están disponibles diversas sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de ajuste y taponamiento del pH, agentes de ajuste de la tonicidad, estabilizadores, agentes humectantes y similares. Los ejemplos no limitantes de vehículos incluyen solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol, y combinaciones de los mismos.

En diversas realizaciones, las composiciones que comprenden polipéptidos y moléculas de fusión se pueden formular para inyección, incluyendo administración subcutánea, mediante la disolución, suspensión o emulsión en un disolvente acuoso o no acuoso, tal como aceites vegetales o de otro tipo, glicéridos de ácido alifático sintético, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilenglicol; y, si se desea, con aditivos convencionales tales como solubilizadores, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizadores y conservantes. En diversas realizaciones, las composiciones se pueden formular para inhalación, por ejemplo, mediante el uso de propulsores aceptables presurizados tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno, y similares. Las composiciones también se pueden formular, en diversas realizaciones, en microcápsulas de liberación sostenida, tal como con polímeros biodegradables o no biodegradables. Un ejemplo no limitante de formulación biodegradable incluye polímero de ácido poliláctico-ácido glicólico. Un ejemplo no limitante de formulación no biodegradable incluye un éster de ácido graso de poliglicerina. Determinados métodos de preparación de dichas formulaciones se describen, por ejemplo, en el documento de patente EP 1 125 584 A1.

También se proporcionan paquetes y kits farmacéuticos que comprenden uno o más recipientes, cada uno de los cuales contiene una o más dosis de un polipéptido o una combinación de polipéptidos. En algunas realizaciones, se proporciona una dosis unitaria, en donde la dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada de una composición que comprende un polipéptido o una combinación de polipéptidos, con o sin uno o más agentes adicionales. En algunas realizaciones, dicha dosis unitaria se administra en una jeringa precargada de un solo uso para la inyección. En diversas realizaciones, la composición contenida en la dosis unitaria puede comprender solución salina, sacarosa, o similares; un tampón, tal como fosfato, o similares; y/o formularse dentro de un intervalo de pH estable y eficaz. Alternativamente, en algunas realizaciones, la composición se puede proporcionar como un polvo liofilizado que puede reconstituirse tras la adición de un líquido adecuado, por ejemplo, agua estéril. En algunas realizaciones, la composición comprende una o más sustancias que inhiben la agregación de proteínas, que incluyen, pero no se limitan a, la sacarosa y arginina. En algunas realizaciones, una composición de la invención comprende heparina y/o un proteoglucano.

Las composiciones farmacéuticas se administran en una cantidad eficaz para el tratamiento o la profilaxis de la indicación específica. La cantidad terapéuticamente eficaz depende normalmente del peso del sujeto a tratar, su estado físico o de salud, la extensión de la afección a tratar, o la edad del sujeto que se haya de tratar. En algunas realizaciones, un inhibidor de PD-1/PD-L1, tal como un anticuerpo o proteína de fusión, se administra con la molécula de fusión de ECD de CD80 a una dosis de 1 a 4 mg/kg. En algunas realizaciones, un inhibidor de PD-1/PD-L1 se administra a una dosis de 1, 2, 3 o 4 mg/kg.

La determinación de la frecuencia de administración puede ser realizada por personas expertas en la materia, tales como un médico tratante, basándose en consideraciones sobre la afección a tratar, la edad del sujeto a tratar, la gravedad de la afección a tratar, el estado general de salud del sujeto a tratar y similares. En algunas realizaciones, una dosis eficaz de una molécula de fusión de ECD de CD80 se administra a un sujeto una o más veces. En diversas realizaciones, una dosis eficaz se administra al sujeto una vez al mes, menos de una vez al mes, tal como, por ejemplo,

cada dos meses o cada tres meses. En otras realizaciones, una dosis eficaz se administra más de una vez al mes, tal como, por ejemplo, cada tres semanas, cada dos semanas o cada semana. En otras realizaciones, una dosis eficaz se administra una vez cada 1, 2, 3, 4 o 5 semanas. En otras realizaciones, una dosis eficaz se administra dos veces o tres veces por semana. Una dosis eficaz se administra al sujeto al menos una vez. En algunas realizaciones, la dosis eficaz se puede administrar múltiples veces, incluyendo durante períodos de al menos un mes, al menos seis meses o al menos un año.

Terapias de combinación adicionales

- 10 Las moléculas de fusión de ECD de CD80 se pueden administrar solas, con inhibidores de PD-1/PD-L1, y/o con otros modos de tratamiento. Las moléculas de fusión de ECD de CD80 se pueden proporcionar antes, sustancialmente al mismo tiempo o después de otros modos de tratamiento, por ejemplo, cirugía, quimioterapia, radioterapia o la administración de otro producto biológico. En algunas realizaciones, el cáncer ha reaparecido o progresado después de una terapia seleccionada de cirugía, quimioterapia y radioterapia, o una combinación de las mismas.
- 15 Para el tratamiento del cáncer, las moléculas de fusión de ECD de CD80 se pueden administrar junto con uno o más agentes antineoplásicos adicionales, tales como agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes antiangiogénesis y/o composiciones antineoplásicas. También se proporcionarán ejemplos no limitantes de agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes antiangiogénesis, agentes contra el cáncer y composiciones antineoplásicas que se pueden usar en combinación con los anticuerpos de la presente invención en las definiciones que siguen.
- 20 En cualquiera de los usos médicos anteriores que comprenden la terapia de combinación, la terapia administrada al sujeto puede inhibir el crecimiento tumoral en un modelo de cáncer singénico o de xenoinjerto de ratón durante un período de 1 semana, 10 días o 2 semanas, por ejemplo, en al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 %. En cualquiera de los usos médicos que comprenden la terapia de combinación, la terapia administrada al sujeto puede reducir el volumen de al menos un tumor en el sujeto o en un sujeto del modelo animal en al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 %, por ejemplo, durante un período de un mes, dos meses, tres meses, seis meses o un año.
- 25 En cualquiera de estos usos médicos adicionales que comprenden la terapia de combinación, la molécula de fusión de ECD de CD80 es una ECD de CD80-Fc que comprende 15-60 moles de SA por mol de proteína de ECD de CD80-Fc. En algunas realizaciones, el contenido es 15-40 moles de SA/mol de proteína, tal como 20-40 moles de SA/mol de proteína, 20-30 moles de SA/mol de proteína, 15-25 moles de SA/mol de proteína, 15-30 moles de SA por mol de proteína, o 30-40 moles de SA/mol de proteína. En algunas realizaciones, el contenido de SA es de al menos 15, tal como al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35 o al menos 40 moles de SA/mol de proteína. En algunas realizaciones, el contenido de SA es de 15, 20, 25, 30, 35 o 40 moles de SA/mol de proteína. En las moléculas de fusión de ECD de CD80 de la invención, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1 humana y comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. La molécula de fusión de ECD de CD80 de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.
- 30 Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes tales como tiotepa y la ciclosfosfamida Cytoxan®; alquilsulfonatos tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carbocuona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (en especial bulatacin y bulatacinona); una camptotecina (incluido el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluidos sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (en particular criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluidos los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictíntina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, en especial caliqueamicina gamma 11 y caliqueamicina omega1 (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluida la dinemicina A; bisfosfonatos, tales como el clodronato; una esperamicina; así como cromóforo de neocarcinostatina y cromóforos antibióticos de cromoproteína enediina relacionados), aclacinomicinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cronomicina, dactinomicina, daunorrubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, la doxorubicina Adriamycin® (que incluye morfolino-doxorubicina, cianomorfólico-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potifromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purinas tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de

pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiruridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutehimida, mitotano, trilostano; regeneradores de ácido fólico tales como el ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidaina; maitansinoides tales como la maitansina y ansamitocina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazina; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sизofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromo; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, el paclitaxel Taxol® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), la formulación de paclitaxel con nanopartículas modificadas con albúmina sin Cremofor Abraxane® (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois) y el docetaxel Taxotere® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranbucilo; la gemcitabina Gemzar®, 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; la vinorelbina Navelbine®; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecán (Camptosar, CPT-11) (incluido el régimen de tratamiento de irinotecán con 5-FU y leucovorina); inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; combretastatina; leucovorina (LV); oxaliplatino, incluido el régimen de tratamiento con oxaliplatino (FOLFOX); inhibidores de PKC-alfa, Raf, H-Ras, EGFR (por ejemplo, erlotinib (Tarceva®)) y VEGF-A que reducen la proliferación celular y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Ejemplos adicionales de agentes quimioterapéuticos ejemplares no limitativos incluyen agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre cánceres tales como antiestrógenos y moduladores de receptores de estrógenos selectivos (SERM), lo cual incluye, por ejemplo, tamoxifeno (incluido el tamoxifeno Nolvadex®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y el toremifeno Fareston®; inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, el acetato de megestrol Megase®, Aromasin® exemestano, formestan, fadrozol, el vorozol Rvisor®, el letrozol Femara® y el anastrozol Arimidex®; y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuproldila y goserelina; así como troxacitabina (un análogo de citosina de nucleósido de 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en vías de señalización involucradas en la proliferación de células aberrantes, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Ralf y H-Ras; ribozimas tales como un inhibidor de la expresión del VEGF (por ejemplo, la ribozima Angiozyme®) y un inhibidor de la expresión de HER2; vacunas tales como las vacunas de terapia génica, por ejemplo, la vacuna Allovectin®, la vacuna Eeuvectin® y la vacuna Vaxid®; rIL-2 Proleukin®; Inhibidor de la topoisomerasa 1 Eurtotecan®; rmRH Abarelix®, y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Un "agente antiangiogénesis" o "inhibidor de la angiogénesis" se refiere a una sustancia de poco peso molecular, un polinucleótido (incluyendo, por ejemplo, un ARN inhibidor (ARNi o ARNip)), un polipéptido, una proteína aislada, una proteína recombinante, un anticuerpo, o conjugados o proteínas de fusión de los mismos, que inhibe la angiogénesis, la vasculogénesis o la permeabilidad vascular no deseada, ya sea directa o indirectamente. Se debería comprender que el agente antiangiogénesis incluye los agentes que se unen al factor angiogénico o su receptor y bloquean su actividad angiogéntica. Por ejemplo, un agente antiangiogénesis es un anticuerpo u otro antagonista de un agente angiogénico, por ejemplo, anticuerpos contra VEGF-A (por ejemplo, bevacizumab (Avastin®)) o contra el receptor de VEGF-A (por ejemplo, receptor KDR o receptor de Flt-1), inhibidores anti-PDGFR tales como Gleevec® (mesilato Imatinib), moléculas pequeñas que bloquean la señalización del receptor de VEGF (por ejemplo, PTK787/ZK2284, SU6668, Sutent®/SU11248 (malato sunitinib), AMG706, o los que se describen en, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 2004/113304). Los agentes antiangiogénesis también incluyen inhibidores de la angiogénesis nativos, por ejemplo, angiostatina, endostatina, etc. Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore (1991) Annu. Rev. Physiol. 53:217-39; Streit y Detmar (2003) Oncogene 22:3172-3179 (por ejemplo, la Tabla 3 que enumera la terapia antiangiogéntica en el melanoma maligno); Ferrara y Alitalo (1999) Nature Medicine 5(12):1359-1364; Tonini et al. (2003) Oncogene 22:6549-6556 (por ejemplo, la Tabla 2 que enumera factores antiangiogénicos conocidos); y Sato (2003) Int. J. Clin. Oncol. 8:200-206 (por ejemplo, la Tabla 1 que enumera los agentes antiangiogénicos usados en ensayos clínicos).

Un "agente inhibidor del crecimiento", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula (tal como una célula que expresa VEGF) *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduzca significativamente el porcentaje de células (tal como una célula que expresa VEGF) en la fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen, pero no se limitan a, agentes que bloquen la progresión del ciclo celular (en un lugar que no sea la fase S), tales como agentes que induzcan la detención de G1 y la detención de la fase M. Los bloqueadores de la fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), los taxanos y los inhibidores de la topoisomerasa II, tales como doxorubicina, epirubicina, daunorrubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen G1 también llegan a detener la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina,

5 cisplatino, metotrexato, 5-fluoruracilo y ara-C. Se puede encontrar información adicional en Mendelsohn e Israel, eds., The Molecular Basis of Cancer, Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" de Murakami et al. (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995), por ejemplo, p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticancerígenos derivados del árbol de tejo. El docetaxel (Taxotere®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético del paclitaxel (Taxol®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan microtúbulos al evitar la despolimerización, que da lugar a la inhibición de la mitosis en las células.

10 La expresión "**composición antineoplásica**" se refiere a una composición útil en el tratamiento del cáncer que comprende al menos un agente terapéutico activo. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes usados en la radioterapia, agentes antiangiogénesis, otros agentes inmunoterapéuticos contra el cáncer además de los inhibidores de PD-1/PD-L1, agentes apoptóticos, agentes antitubulina y otros agentes para tratar el cáncer, tales como 15 anticuerpos anti-HER-2, anticuerpos anti-CD20, un antagonista del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, un inhibidor de tirosina cinasas), inhibidor de HER1/EGFR (por ejemplo, erlotinib (Tarceva®), inhibidores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (por ejemplo, Gleevec® (mesilato de imatinib)), un inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferones, inhibidores de CTLA-4 (por ejemplo, el anticuerpo anti-CTLA ipilimumab (YERVOY®)), inhibidores de PD-L2 (por ejemplo, anticuerpos anti-PD-L2), inhibidores de TIM3 (por ejemplo, anticuerpos anti-TIM3), citocinas, antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que se unan a una o más de las siguientes dianas ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA, PD-L2, CTLA-4, TIM3 o receptor(es) de VEGF, TRAIL/Apo2, y otros agentes químicos bioactivos y orgánicos, etc. Las combinaciones de estos 20 también están incluidas en la invención.

EJEMPLOS

25 Se pretende que los ejemplos que se indicarán a continuación sean puramente ilustrativos de la invención y no debería considerarse que limiten la invención de ningún modo. No se pretende que los ejemplos representen que los siguientes experimentos sean todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos por asegurar la exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero se deben tener en cuenta ciertos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura está en grados centígrados y la presión es o está cercana a la atmosférica.

30 Ejemplo 1: Una molécula de fusión de ECD de CD80-Fc reduce el crecimiento tumoral en ratones implantados con la línea celular de carcinoma colorrectal murino CT26

35 Se compraron ratones BALB/c hembra de siete semanas de Charles River Laboratories (Hollister, CA) y se aclimataron durante dos semanas antes del inicio del estudio. La línea celular de cáncer colorrectal murino CT26 se implantó por vía subcutánea en el flanco derecho de los ratones a $1,0 \times 10^6$ células/200 μl /ratón. Antes de la inoculación, las células 40 se cultivaron durante no más de tres pasos en medio RPMI 1640 complementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS), L-glutamina 2 mM. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. Al llegar al 80-85 % de confluencia, las células se recogieron y se resuspendieron en un mezcla 1:1 de RPMI 1640 sin suero y Matrigel® a 5×10^6 células por mililitro.

45 Se monitorizó a los ratones dos veces de la semana tras la implantación de las células para el crecimiento tumoral. Para las mediciones del tumor, se midió la longitud y la anchura de cada tumor usando un compás calibrador y el volumen se determinó según la fórmula: Volumen tumoral (mm^3) = (ancho (mm) × largo (mm))²/2. El día 7, se midieron todos los tumores, y los ratones fueron asignados aleatoriamente a grupos de tratamiento. El volumen tumoral medio para todos los animales reclutados en los grupos de tratamiento fue de 175 mm^3 . A los ratones se les administró 50 solución salina o ADN de plásmido a través de RIPPSSM. El ADN de plásmido que se administró a través de RIPPSSM contuvo la secuencia para el dominio extracelular (ECD) de CD80 murino o CTLA4, además del dominio Fc de IgG2a humana. Se siguió midiendo los tumores al menos dos veces por semana hasta que el volumen tumoral superó el 10 % del peso del animal, o aproximadamente 2000 mm^3 .

55 El cambio en el volumen tumoral se muestra representando gráficamente el volumen tumoral medio con respecto al día en el que los animales fueron inoculados con células CT26. (Fig. 1a.) RIPPS con ECD de CD80 de ratón redujo significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el control de solución salina ($p<0,05$) empezando en el día 11. (Fig. 1a-b.) Se calcularon los valores de p usando análisis de la prueba de la t bilateral de los volúmenes tumorales calculados en cada día del estudio (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$). Se determinó que la inhibición del crecimiento tumoral por ECD de CD80 era del 78,8 % en comparación con el control de solución salina, que se calculó como $100 \times (1 - (\text{cambio medio en el volumen tumoral para CD80} / \text{cambio medio en el volumen tumoral para solución salina}))$. Como también se muestra en la Fig. 1a, RIPPS con ECD de CTLA4-Fc de ratón potenció en realidad el crecimiento tumoral en comparación con el control de solución salina. Una explicación para este resultado es que la construcción de ECD de CTLA4-Fc podría haber actuado de trampa de ligando para CD80, previniendo la unión de CD80 a CD28 y estimulando la actividad de linfocitos T contra las células tumorales.

Ejemplo 2: Una molécula de fusión de ECD de CD80-Fc en combinación con un anticuerpo anti-PD-1 reduce el crecimiento tumoral en ratones implantados con la línea celular de carcinoma colorrectal murino CT26

5 Se compraron ratones BALB/c hembra de siete semanas de Charles River Laboratories (Hollister, CA) y se aclimataron durante 12 días antes del inicio del estudio. La línea celular de cáncer colorrectal murino CT26 se implantó por vía subcutánea en el flanco derecho de los ratones a $1,0 \times 10^6$ células/200 μl /ratón. Antes de la inoculación, las células se cultivaron durante no más de tres pases en medio RPMI 1640 complementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS), L-glutamina 2 mM. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. Al llegar al 80-85 % de confluencia, las células se recogieron y se resuspendieron en un mezcla 1:1 de RPMI 1640 sin suero y Matrikel® a 5×10^6 células por mililitro.

10 Se monitorizó a los ratones dos veces de la semana tras la implantación de las células para el crecimiento tumoral. Para las mediciones del tumor, se midió la longitud y la anchura de cada tumor usando un compás calibrador y el volumen se determinó según la fórmula: Volumen tumoral (mm^3) = (ancho (mm) × largo (mm))²/2. El día 7, se midieron todos los tumores, y los ratones fueron asignados aleatoriamente a grupos de tratamiento. El volumen tumoral medio para todos los animales reclutados en los grupos de tratamiento fue aproximadamente de 150 mm^3 . A los ratones se les administró el ADN de plásmido que codificaba el ECD de CD80 de ratón más Fc de IgG2a humana o Fc solo (control negativo) a través de RIPPSSM. Se administró proteína para anti-PD1 (clon RMP1-14) o IgG2a de rata (clon 2A3, control negativo). Los grupos de administración fueron los siguientes: 1) Fc RIPPSSM más IgG2a de rata, 2) CD80 RIPPSSM más IgG2a de rata, 3) Fc RIPPSSM más anti-PD1, o 4) CD80 RIPPSSM más anti-PD1. Se siguió midiendo los tumores al menos dos veces por semana hasta que el volumen tumoral superó el 10 % del peso del animal, o aproximadamente 2000 mm^3 .

15 25 El cambio en el volumen tumoral se muestra representando gráficamente el peso tumoral medio para todos los grupos al final del estudio. (Fig. 2a.) RIPPSSM con ECD de CD80 de ratón o la administración de anti-PD1 redujeron el crecimiento tumoral en comparación con el control. (Fig. 2a-b.) La combinación de CD80 RIPPSSM y anti-PD1 dio lugar a un crecimiento tumoral significativamente reducido en comparación con cualquiera de CD80 ($p<0,01$ empezando después del día 9) o anti-PD-1 ($p<0,01$ en el día 14) solo ($p<0,05$) empezando nueve días después del inicio del tratamiento. Se calcularon los valores de p usando análisis de la prueba de la t bilateral de los volúmenes tumorales calculados en cada día de la medición.

20 30 35 Se determinaron que la inhibición del crecimiento tumoral (TGI) por ECD de CD80 y anti-PD1 era del 28,7 % y 41,5 %, respectivamente, en comparación con el control. Se determinó que la TGI por la combinación de ECD de CD80 y anti-PD1 era del 83 %. (véase la Figura 2b). TGI se calculó usando la fórmula $100 \times (1 - (\Delta\text{volumen medio del grupo de tratamiento} / \Delta\text{volumen medio de solución salina}))$.

Ejemplo 3: Comparación de la actividad de las moléculas de fusión de ECD de CD80-Fc con secuencias del polipéptido de fusión de IgG1-Fc humana natural y mutante

40 45 Se compraron ratones BALB/c hembra de siete semanas de Charles River Laboratories (Hollister, CA) y se aclimataron durante dos semanas antes del inicio del estudio. La línea celular de cáncer colorrectal murino CT26 se implantó por vía subcutánea en el flanco derecho de los ratones a $1,0 \times 10^6$ células/200 μl /ratón. Antes de la inoculación, las células se cultivaron durante no más de tres pases en medio RPMI 1640 complementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS), L-glutamina 2 mM. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. Al llegar al 80-85 % de confluencia, las células se recogieron y se resuspendieron en un mezcla 1:1 de RPMI 1640 sin suero y Matrikel® a 5×10^6 células por mililitro.

50 55 60 Se monitorizó a los ratones dos veces de la semana tras la implantación de las células para el crecimiento tumoral. Para las mediciones del tumor, se midió la longitud y la anchura de cada tumor usando un compás calibrador y el volumen se determinó según la fórmula: Volumen tumoral (mm^3) = (ancho (mm) × largo (mm))²/2. El día 5, se midieron todos los tumores, y los ratones fueron asignados aleatoriamente a grupos de tratamiento. El volumen tumoral medio para todos los animales reclutados en los grupos de tratamiento fue de 175 mm^3 . A los ratones se les administró solución salina o ADN de plásmido a través de RIPPSSM. El ADN de plásmido que se administró a través de RIPPSSM contuvo la secuencia para el dominio extracelular (ECD) de CD80 murino con el dominio Fc de IgG1 humana. Se administraron dos clones a través de RIPPSSM, uno con Fc de IgG1 humana natural (CD80-IgG1 WT) y el otro con este Fc que portaba tres aminoácidos mutados (L234F/L235E/P331S) con el fin de alterar la interacción de Fc con receptores de Fc gamma (CD80-IgG1 MT). Se siguió midiendo los tumores al menos dos veces por semana hasta que el volumen tumoral superó el 10 % del peso del animal, o aproximadamente 2000 mm^3 .

65 70 75 El cambio en el volumen tumoral se muestra representando gráficamente el volumen tumoral medio con respecto al día en el que los animales fueron inoculados con células CT26. (Fig. 3a-b.) RIPPSSM con CD80-IgG1 WT redujo significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el control de solución salina ($p<0,05$) empezando en el día 14. CD80-IgG MT redujo significativamente el crecimiento tumoral en comparación con CD80-IgG1 WT ($p<0,01$) empezando en el día 14. Se calcularon los valores de p usando análisis de la prueba de la t bilateral de los volúmenes tumorales calculados en cada día del estudio (* $p<0,05$, ** $p<0,01$). Se determinó que la inhibición del crecimiento tumoral (TGI) por CD80-IgG1 WT era del 69,4 % en comparación con el control de solución salina, en comparación

con TGI para CD80-IgG MT, que se calculó como el 98 %. (véase la **Figura 3b**). TGI se determinó usando la fórmula $100 \times (1 - (\Delta\text{volumen medio del grupo de tratamiento} / \Delta\text{volumen medio de solución salina}))$.

Ejemplo 4: Efectos de las moléculas de fusión de ECD de CD80-Fc con secuencias del polipéptido de fusión de IgG1-Fc humana natural y mutante sobre linfocitos T infiltrantes en tumores CT26

Se realizó un estudio separado *in vivo* para analizar los efectos de CD80-IgG1 WT y CD80- IgG1 MT sobre los linfocitos T infiltrantes en tumores CT26 en un estadio temprano del tratamiento.

Se compraron ratones BALB/c hembra de siete semanas de Charles River Laboratories (Hollister, CA) y se aclimataron durante dos semanas antes del inicio del estudio. La línea celular de cáncer colorrectal murino CT26 se implantó por vía subcutánea en el flanco derecho de los ratones a $1,0 \times 10^6$ células/200 μl /ratón. Antes de la inoculación, las células se cultivaron durante no más de tres pasos en medio RPMI 1640 complementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS), L-glutamina 2 mM. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. Al llegar al 80-85 % de confluencia, las células se recogieron y se resuspendieron en un mezcla 1:1 de RPMI 1640 sin suero y Matrigel® a 5×10^6 células/ml.

Se monitorizó a los ratones dos veces de la semana tras la implantación de las células para el crecimiento tumoral. Para las mediciones del tumor, se midió la longitud y la anchura de cada tumor usando un compás calibrador y el volumen se determinó según la fórmula: Volumen tumoral (mm^3) = (ancho (mm) × largo (mm))²/2. El día 5, se midieron todos los tumores, y los ratones fueron asignados aleatoriamente a grupos de tratamiento (n= 5 ratones por grupo). El volumen tumoral medio para todos los animales reclutados en los grupos de tratamiento fue de 72 mm^3 . A los ratones se les administró solución salina, un dominio extracelular murino (ECD) de CD80 con Fc de IgG1 humana natural (CD80-IgG1 WT) o un ECD de CD80 murino con un Fc de IgG1 humana mutada CD80-IgG1 MT, L234F/L235E/P331S mutada) para alterar la interacción con los receptores de Fc gamma. Los tumores se midieron en los días 5 y 11.

El día 12, se sacrificó a los ratones con CO₂ y se perfundieron con solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4. Brevemente, se abrió rápidamente el pecho del ratón y se usó una jeringa de calibre 20 para infundir 40 ml de PBS en la aorta a través de una incisión en el ventrículo izquierdo. La sangre y la PBS salieron a través de una abertura en la aurícula derecha. Se extirparon los tumores y se sumergieron en 10 % de formol tamponado neutro a 4 °C. Después de 2 horas, los tejidos se aclararon 3 veces en PBS y a continuación se transfirieron a 30 % de sacarosa en PBS durante la noche. Al día siguiente, los tumores se congelaron en un compuesto de OCT y se conservaron a -80 °C.

Se cortaron secciones de criostato de 20 μm de espesor. Las secciones se secaron en portaobjetos Superfrost® Plus durante 1 a 2 horas. Se permeabilizaron los especímenes con PBS que contenía 0,3 % de Triton® X-100 y se incubaron en 5 % de suero normal de cabra en PBS 0,3 % de Triton® X-100 (disolución de bloqueo) durante 1 hora a temperatura ambiente para boquear la unión de anticuerpos no específicos. Para detectar los linfocitos T, se incubaron secciones con el anticuerpo anti-CD4 de rata (GK1.5/ eBiosciences) y anti-CD3 de conejo (SP7/ Thermo Scientific), ambos diluidos 1:500 en disolución de bloqueo durante la noche. Se incubaron especímenes de control en 5 % de suero normal en lugar del anticuerpo primario durante el mismo periodo. Después de enjuagar con PBS que contenía 0,3 % de Triton® X-100, los especímenes se incubaron durante 4 horas a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios anti-rata de cabra marcados con Alexa® 594 y anti-conejo de cabra marcados con Alexa® 488 diluidos 1:400 en PBS (Jackson ImmunoResearch). Los especímenes se enjuagaron con PBS que contenía 0,3 % de Triton® X-100, se fijaron en 1 % de paraformaldehído (PFA), se enjuagaron de nuevo con PBS y se montaron en medio de montaje antidecoloración Vectashield con DAPI (Vector laboratories).

Los especímenes se examinaron con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiphot® 2 plus equipado con una cámara AxioCam® HRc. Se recopilaron imágenes de especímenes para cada grupo experimental que mostraban la cantidad y distribución de células CD3+ y CD4+ dentro del tumor y se muestran en las **Fig. 4a y 4b**.

El tratamiento con CD80- IgG1 WT o CD80- IgG1 MT aumentó el número de células CD3+ and CD4+ intratumorales en comparación con solución salina (**Fig. 4a y 4b**). Aunque la cantidad de células CD4+ era similar entre los tumores tratados con CD80-IgG1 WT o CD80-IgG1 MT, el tratamiento con CD80-IgG1 MT condujo a un mayor aumento de linfocitos T CD3+ infiltrantes del tumor en comparación con CD80-IgG1 WT (**Fig. 4b**). La proporción entre células CD3+ y CD4+ aumentó CD80-IgG1 MT en comparación con CD80-IgG1 WT.

Ejemplo 5: Efectos de la liberación de citocinas sobre una molécula de fusión de ECD de CD80-Fc

60 Métodos

Tratamientos de proteínas

Se unió una molécula de fusión de ECD de CD80 humano-Fc de IgG1 (CD80-Fc) a perlas magnéticas de proteína A (Life Technologies) en medios de proliferación de linfocitos T que contenían RPMI 1640, 100 UI de penicilina/100 ug/ml de estreptomicina, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 100 nM, 2-mercaptopetanol 55 uM y 10 % de suero

bovino fetal de IgG ultra-baja. Las reacciones de unión se llevaron a cabo en placas de cultivo de tejido de fondo plano de 96 pocillos en un volumen de 100 μ l por pocillo con una concentración de perlas de 3 millones de perlas por ml. CD80-Fc se unió a las perlas en una serie de concentraciones: 10, 1, 0,1 ug/ml. Se realizó también un conjunto adicional de reacciones de unión con la adición de 3 ng/ml de OKT3-scFv. Se permitió que las proteínas se unieran durante 1 hora a temperatura ambiente en una plataforma oscilante, tras lo cual se añadieron 100 μ l de 20 ug/ml (concentración final 10 ug/ml) de Fc libre de IgG1 (FPT) a cada pocillo y se permitió que se unieran durante una hora adicional con el fin de bloquear cualquier sitio de unión de proteína A no ocupado en las perlas. Las perlas completamente cargadas y bloqueadas se lavaron a continuación 3 veces con PBS usando un soporte de placa magnética de 96 pocillos para retirar las proteínas no unidas. A continuación, se añadieron 100 μ l de linfocitos Pan-T humanos en una concentración de 1×10^6 células/ml a cada pocillo de perlas lavadas secadas. Cada condición se probó por triplicado.

Células

Se aislaron CMSP humanas de sangre Enriquecida mediante aféresis (capa leucoplaquetaria) recogida de donantes sanos ~18 h antes del aislamiento usando centrifugación de gradiente de densidad en Ficoll® (Biochrom). A continuación, se aislaron los linfocitos Pan-T de CMSP usando un kit de aislamiento de linfocitos Pan-T humanos (Miltenyi). Se sembraron linfocitos T a una densidad de 1 millón de células/ml en matraces de cultivo de tejido T225 en medio de proliferación (anterior) complementado con 8 ng/ml de IL-2 y Dynabeads® activadoras de linfocitos T humanos (Life Tech) a 1 perla/célula. Tras la siembra, las células se alimentaron con IL-2 fresca y se mantuvieron continuamente a una concentración de 0,3 millones de células/ml mediante la adición de medio de proliferación fresco cada 2 días. Las células se mantuvieron en una incubadora con camisa de agua a 37 °C mantenida a 5 % de CO₂. Despues de 6 días de expansión, las perlas activadoras se retiraron usando un soporte de tubo magnético y las células se resuspendieron a una concentración de 1 millón de células/ml en medio de proliferación fresco sin IL-2. 24 horas después, las células se pusieron en el ensayo con proteínas inmovilizadas sobre perlas de proteína A.

Mediciones de citocinas

Se midieron los niveles de interferón gamma (IFN- γ) soluble y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en los sobrenadantes usando los kits HTRF-ELISA (Cisbio) 24 horas después de que las células se hubieran tratado con las proteínas inmovilizadas sobre perlas de proteína A según las instrucciones del fabricante.

Resultados

CD80-Fc inmovilizado en perlas solo no causó una activación significativa de linfocitos T, como se mide por la producción de citocinas solubles (**Fig. 5a y c**). Sin embargo, cuando una pequeña cantidad de OKT3-scFv se inmovilizó junto con CD80-Fc, se observó una gran liberación de IFN- γ y TNF- α dependiente de CD80 (**Fig. 5b y d**). La cantidad de OKT3-scFv usada aquí fue demasiado baja para causar la estimulación de linfocitos T por sí mismos y, por lo tanto, requirió la presencia de CD80 como una proteína coestimuladora. Estos resultados confirman que CD80-Fc usada en este ensayo fue, de hecho, biológicamente activa.

Aunque la liberación de IFN- γ y TNF- α en este ensayo mostró que CD80-Fc era biológicamente activa, puede ser perjudicial una liberación en exceso de citocinas, tales como IFN- γ y TNF- α . Por lo tanto, para tratar la posible seguridad del tratamiento con ECD de CD80-Fc, se compararon estos resultados con los resultados anteriormente publicados con TGN1412, un anticuerpo anti-CD28 monoclonal, que se mostró que era un "superagonista" de linfocitos T y que liberaba niveles excesivos y perjudiciales de citocinas, tales como IFN- γ y TNF- α en sujetos humanos.

TGN1412 inmovilizado solo parece ser significativamente más potente en la inducción de la liberación de citocinas de linfocitos T humanos que CD80 humano solo. Findlay et al., J. Immunological Methods 352: 1-12 (2010), informaron que 1 ug/pocillo de TGN1412 provocó una gran liberación de TNFa, ~2000 pg/ml, y Vessillier et al., J. Immunological Methods 424: 43-52 (2015), informaron que la misma cantidad de TGN1412 provocó una fuerte IFN- γ , -10000 pg/ml. En nuestro ensayo, la misma cantidad de CD80-Fc inmovilizado no provocó una liberación significativa de cualquier citocina. Estos resultados indican que CD80-Fc es al menos 1000 veces menos potente en inducir la liberación de citocinas en comparación con TGN1412 y, por lo tanto, plantea una riesgo significativamente menor de inducción de una hipercitocinemia en humanos que TGN1412.

Ejemplo 6: Efectos de una molécula de fusión de ECD de CD80-Fc en tumores CT26 *in vivo* con dominios Fc con diferente contenido de ácido siálico (SA)

Se realizó un estudio *in vivo* en tumores CT26 para analizar los efectos de tres lotes diferentes de ECD de CD80 fusionado con Fc de IgG1 humana natural que tenía diferentes contenidos de ácido siálico (SA). Específicamente, el lote E de ECD de CD80-Fc contiene 20 moles de SA/mol de proteína, el lote D contiene 15 moles de SA/mol de proteína y el lote A contiene 5 moles de SA/mol de proteína.

Se compraron ratones BALB/c hembra de siete semanas de Charles River Laboratories (Hollister, CA) y se aclimataron durante una semanas antes de que el estudio se iniciara. La línea celular de cáncer colorrectal murino CT26 se

implantó por vía subcutánea en el flanco derecho de los ratones a $1,0 \times 10^6$ células/200 μ l/ratón. Antes de la inoculación, las células se cultivaron durante no más de tres pasos en medio RPMI 1640 complementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS), L-glutamina 2 mM. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. Al llegar al 80-85 % de confluencia, las células se recogieron y se resuspendieron en un mezcla 1:1 de RPMI 1640 sin suero y Matrigel® a 5×10^6 células por millilitro.

Se monitorizó a los ratones para el crecimiento tumoral dos veces a la semana tras la implantación de las células. Para las mediciones del tumor, se midió la longitud y la anchura de cada tumor usando un compás calibrador y el volumen se determinó según la fórmula: Volumen tumoral (mm^3) = (ancho (mm) × largo (mm))²/2. El día 7, se midieron todos los tumores, y los ratones fueron asignados aleatoriamente a siete grupos de tratamiento (n= 10 ratones por grupo experimental). El volumen tumoral medio para todos los animales reclutados fue de 94 mm^3 . Al primer grupo se le inyectó 200 μ l de PBS (control) por vía intravenosa (i.v.) en la vena de la cola. Al segundo grupo se le inyectó ECD de CD80-Fc a 20 moles de SA/mol de proteína (lote E) i.v. administrado a 0,3 mg/kg. Al tercer grupo se le inyectó ECD de CD80-Fc a 20 moles de SA/mol de proteína (lote E) i.v. administrado a 0,6 mg/kg. Al cuarto grupo se le inyectó ECD de CD80-Fc a 15 moles de SA/mol de proteína (lote D) i.v. administrado a 0,3 mg/kg. Al quinto grupo se le inyectó ECD de CD80-Fc a 15 moles de SA/mol de proteína (lote D) i.v. administrado a 0,6 mg/kg. Al sexto grupo se le inyectó ECD de CD80-Fc a 5 moles de SA/mol de proteína (lote A) i.v. administrado a 0,3 mg/kg. Al séptimo grupo se le inyectó ECD de CD80-Fc a 5 moles de SA/mol de proteína (lote A) i.v. administrado a 0,6 mg/kg. Los tumores se midieron en los días 10, 14, 16, 18, 22, 24.

El tratamiento con ECD de CD80-Fc a 20 moles de SA/mol de proteína (lote E) administrado a 0,3 o 0,6 mg/kg dio lugar a una inhibición del 93 % y 98 % del crecimiento tumoral en comparación con el control ($P<0,001$). El tratamiento con ECD de CD80-Fc a 15 moles de SA/mol de proteína (lote D) administrado a 0,3 o 0,6 mg/kg dio lugar a una inhibición del 93 % y 95 % del crecimiento tumoral en comparación con el control ($P<0,001$). En comparación, el tratamiento con el lote A de ECD de CD80-Fc a 0,3 mg/kg (con 5 moles de SA/mol de proteína) no inhibió el crecimiento tumoral en comparación con el control y cuando se administró a 0,6 mg/kg sólo indujo una inhibición del 70 % ($P<0,001$) (Fig. 6).

La incidencia de los ratones sin tumores se analizó en el día 37. El tratamiento con ECD de CD80-Fc a 20 moles/mol de SA (lote E) administrado a 0,3 o 0,6 mg/kg condujo a una regresión tumoral completa en 8/10 (80 %) o 10/10 (100 %) de los ratones. El tratamiento con ECD de CD80-Fc a 15 moles/mol de SA (lote D) administrado a 0,3 o 0,6 mg/kg condujo a una regresión tumoral completa en 9/10 (90 %) de los ratones. En comparación, el tratamiento con el lote A de ECD de CD80-Fc administrado a 0,6 mg/kg indujo la regresión tumoral sólo en 1/10 (10%) de los ratones, como se muestra en la tabla a continuación.

| Grupo de tratamiento | Ratones sin tumor en el día 37 |
|---|--------------------------------|
| Solución salina | 0 % (0/10 ratones) |
| ECD de CD80-Fc SA 20 moles/mol (lote E) a 0,3 mg/kg 1 dosis | 80 % (8/10 ratones) |
| ECD de CD80-Fc SA 20 moles/mol (lote E) a 0,6 mg/kg 1 dosis | 100 % (10/10 ratones) |
| ECD de CD80-Fc SA 15 moles/mol (lote D) a 0,3 mg/kg 1 dosis | 90 % (9/10 ratones) |
| ECD de CD80-Fc SA 15 moles/mol (lote D) a 0,6 mg/kg 1 dosis | 90 % (9/10 ratones) |
| ECD de CD80-Fc SA 5 moles/mol (lote A) a 0,3 mg/kg 1 dosis | 0 % (0/10 ratones) |
| ECD de CD80-Fc SA 5 moles/mol (lote A) a 0,6 mg/kg 1 dosis | 10 % (1/10 ratones) |

Ejemplo 7: Efectos de una molécula de fusión de ECD de CD80 murino-Fc murino sobre el crecimiento tumoral en tres modelos de tumor singénico diferentes

Se realizaron estudios *in vivo* usando un sustituto de ratón que comprendía el dominio extracelular (ECD) de CD80 murino asociado al dominio Fc de IgG2a murina natural (ECD de CD80-Fc murino). Los efectos de ECD de CD80-Fc murino se compararon con los del clon 9D9 del anticuerpo anti-CTLA4 (IgG2b) en tres modelos de tumor singénico diferentes: los modelos de carcinoma de colon CT26, de carcinoma de colon MC38 y de melanoma B16.

Modelo de tumor CT26

Se compraron ratones BALB/c hembra de siete semanas de Charles River Laboratories (Hollister, CA) y se aclimataron durante una semanas antes de que el estudio se iniciara. La línea celular de cáncer colorrectal murino CT26 se implantó por vía subcutánea en el flanco derecho de los ratones a $1,0 \times 10^6$ células/200 μ l/ratón. Antes de la inoculación, las células se cultivaron durante no más de tres pasos en medio RPMI 1640 complementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS), L-glutamina 2 mM. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. Al llegar al 80-85 % de confluencia, las células se recogieron y se resuspendieron en un mezcla 1:1 de RPMI 1640 sin suero y Matrigel®.

Se monitorizó a los ratones dos veces de la semana tras la implantación de las células para el crecimiento tumoral. Para las mediciones del tumor, se midió la longitud y la anchura de cada tumor usando un compás calibrador y el volumen se determinó según la fórmula: Volumen tumoral (mm^3) = (ancho (mm) × largo (mm)) 2 /2. El día 7 se midieron todos los tumores, y los ratones fueron asignados aleatoriamente a siete grupos de tratamiento (n= 15 ratones por grupo experimental). El volumen tumoral medio para todos los animales reclutados fue de 96 mm^3 . Se administró a los ratones 3 veces, en el día 4, 7 y 11. Al primer grupo se le inyectó IgG2b de ratón (mlgG2b) i.p. administrada a 10 mg/kg (control). Al segundo grupo se le inyectó ECD de CD80-Fc murino a 20 moles/mol de SA i.v. administrada a 0,3 mg/kg. Al tercer grupo se le inyectó el clon 9D9 del anticuerpo anti-CTLA4 (IgG2b) i.p. administrado a 1,5 mg/kg. Al cuarto grupo se le inyectó el clon 9D9 del anticuerpo anti-CTLA4 (IgG2b) i.p. administrado a 10 mg/kg. Los tumores se midieron en los días 10, 13, 17, 19, 21, 24.

En el día 21 (cuando todos los controles estaban todavía en el estudio), el tratamiento con ECD de CD80-Fc murino a 20 moles/mol de SA administrado a 0,3 mg/kg dio lugar al 90 % de inhibición del crecimiento tumoral en comparación con el control ($P<0,001$). El tratamiento con el anticuerpo anti-CTLA4 a 10 mg/kg dio lugar a una inhibición del 75 % del crecimiento tumoral en comparación con el control ($P<0,001$). En comparación, el tratamiento con el anticuerpo anti-CTLA4 a 1,5 mg/kg solo indujo una inhibición del 53 % del crecimiento tumoral ($P<0,001$) (Fig. 7). El día 21, el impacto del tratamiento con ECD de CD80-Fc murino a 20 moles/mol de SA administrado a 0,3 mg/kg sobre el crecimiento tumoral fue significativamente mayor que el anticuerpo anti-CTLA4 administrado a 1,5 mg/kg ($P<0,001$) o a 10 mg/kg ($P=0,009$).

La incidencia de los ratones sin tumores se analizó en el día 37. El tratamiento con ECD de CD80-Fc murino a 20 moles/mol de SA administrado a 0,3 mg/kg condujo a una regresión tumoral completa en 7/15 (47 %) de los ratones. El tratamiento con el anticuerpo anti-CTLA4 a 10 mg/kg condujo a una regresión tumoral completa en 3/15 (20 %) de los ratones. Ninguno de los ratones tratado con el anticuerpo anti-CTLA4 a 1,5 mg/kg tuvo regresión tumoral completa.

Modelo de tumor MC38

Se compraron ratones C57Bl/6 hembra de siete semanas de Charles River Laboratories (Hollister, CA) y se aclimataron durante una semanas antes de que el estudio se iniciara. La línea celular de cáncer colorrectal murino MC38 se implantó por vía subcutánea en el flanco derecho de los ratones a $0,5 \times 10^6$ células/100 μl /ratón. Antes de la inoculación, las células se cultivaron durante no más de tres pasos en medio RPMI 1640 complementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS), L-glutamina 2 mM. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. Al llegar al 80-85 % de confluencia, las células se recogieron y se resuspendieron en un mezcla 1:1 de RPMI 1640 sin suero y Matrigel.

Se monitorizó a los ratones dos veces de la semana tras la implantación de las células para el crecimiento tumoral. Para las mediciones del tumor, se midió la longitud y la anchura de cada tumor usando un compás calibrador y el volumen se determinó según la fórmula: Volumen tumoral (mm^3) = (ancho (mm) × largo (mm)) 2 /2. El día 7, se midieron todos los tumores, y los ratones fueron asignados aleatoriamente a siete grupos de tratamiento (n= 15 ratones por grupo experimental). El volumen tumoral medio para todos los animales reclutados fue de 78 mm^3 . Se administró a los ratones 3 veces, en el día 7, 10 y 14. Al primer grupo se le inyectó IgG2b de ratón (mlgG2b) i.p. administrada a 10 mg/kg (control). Al segundo grupo se le inyectó ECD de CD80-Fc murino a 20 moles/mol de SA i.v. administrada a 3 mg/kg. Al tercer grupo se le inyectó el clon 9D9 del anticuerpo anti-CTLA4 (IgG2b) i.p. administrado a 1,5 mg/kg. Al cuarto grupo se le inyectó el clon 9D9 del anticuerpo anti-CTLA4 (IgG2b) i.p. administrado a 10 mg/kg. Los tumores se midieron en los días 11, 14, 17 y 19.

En el día 19 (cuando todos los controles estaban todavía en el estudio), el tratamiento con ECD de CD80-Fc murino a 20 moles/mol de SA administrado a 3 mg/kg dio lugar al 79 % de inhibición del crecimiento tumoral en comparación con el control ($P<0,001$). Además, ECD de CD80-Fc murino a 20 moles/mol de SA tuvo un mayor impacto sobre el crecimiento tumoral en comparación con el anticuerpo anti-CTLA4 ($P<0,001$). El tratamiento con el anticuerpo anti-CTLA4 a 10 mg/kg redujo el crecimiento tumoral en 21 % en comparación con el control ($P=0,05$) mientras que a 1,5 mg/kg no afectó significativamente el tamaño del tumor (Fig. 8). El día 21, el impacto del tratamiento con ECD de CD80-Fc murino a 20 moles/mol de SA administrado a 3 mg/kg sobre el crecimiento tumoral fue significativamente mayor que el anticuerpo anti-CTLA4 administrado a 1,5 mg/kg ($P<0,001$) o a 10 mg/kg ($P=0,009$).

Aunque se usó una dosis de 3 mg/kg de ECD de CD80-Fc para estos experimentos, una dosis de 0,3 mg/kg de ECD de CD80-Fc también redujo el crecimiento de células tumorales en el modelo de tumor MC38 (datos no mostrados).

Modelo de tumor B16

Se compraron ratones C57Bl/6 hembra de siete semanas de Charles River Laboratories (Hollister, CA) y se aclimataron durante una semanas antes de que el estudio se iniciara. La línea celular de melanoma murino B16-F10 se implantó por vía subcutánea en el flanco derecho de los ratones a $0,5 \times 10^6$ células/100 μl /ratón. Antes de la inoculación, las células se cultivaron durante no más de tres pasos en medio DMEM complementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS), L-glutamina 2 mM. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera

humidificada con 5 % de CO₂. Al llegar al 80-85 % de confluencia, las células se recogieron y se resuspendieron en un mezcla 1:1 de DMEM sin suero y Matrigel.

- Se monitorizó a los ratones dos veces de la semana tras la implantación de las células para el crecimiento tumoral.
- 5 Para las mediciones del tumor, se midió la longitud y la anchura de cada tumor usando un compás calibrador y el volumen se determinó según la fórmula: Volumen tumoral (mm³) = (ancho (mm) × largo (mm))²/2. El día 7, se midieron todos los tumores, y los ratones fueron asignados aleatoriamente a siete grupos de tratamiento (n= 15 ratones por grupo experimental). El volumen tumoral medio para todos los animales reclutados fue de 70 mm³. Se administró a los ratones 3 veces, en el día 3, 6 y 10. Al primer grupo se le inyectó IgG2b de ratón (mlgG2b) i.p. administrada a 10 mg/kg (control). Al segundo grupo se le inyectó ECD de CD80-Fc murino a 20 moles/mol de SA i.v. administrada a 3 mg/kg. Al tercer grupo se le inyectó el clon 9D9 del anticuerpo anti-CTLA4 (IgG2b) i.p. administrado a 1,5 mg/kg. Al cuarto grupo se le inyectó el clon 9D9 del anticuerpo anti-CTLA4 (IgG2b) i.p. administrado a 10 mg/kg. Los tumores se midieron en los días 10, 13, 15, 16, 17.
- 10 15 En el día 13 (cuando todos los controles estaban todavía en el estudio), el tratamiento con ECD de CD80-Fc murino a 20 moles/mol de SA administrado a 3 mg/kg dio lugar al 41 % de inhibición del crecimiento tumoral en comparación con el control (P<0,001). El tratamiento con el anticuerpo anti-CTLA4 a 10 mg/kg o 1,5 mg/kg no afectó significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el control (**Fig. 9**).
- 20 **TABLA DE SECUENCIAS**

La siguiente tabla proporciona un listado de determinadas secuencias a las que se hace referencia en el presente documento.

| SEQ. ID. NO. | Descripción | Secuencia |
|--------------------|---|--|
| 1 | Secuencia de aminoácidos precursora de CD80 humano (con secuencia señalizadora) | MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCGVIHVTK EVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSG DMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVIALRPSDEGTYECSVVKY EKDAFKREHLAEVTLSVKADFPTPSISDFEIPTSNI SGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKL DFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTFNWNTTKQEHPDNL LPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRRES VRPV |
| 2 | Secuencia de aminoácidos precursora de CD80 de ratón (con secuencia señalizadora) | MACNCQLMQDTPLLKFPCCPRLLFVLLIRLSQVSSDVDEQ LSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHDKVLSVI AGKLKWPEYKNRTLYDNTTSLIILGLVLSDRGTYSCVV QKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSADTKR ITCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGINTTISQDPESELYTI SSQLDFNTTRNHTIKCLIKYGAHVSEDFTWEEKPPEDPPD SKNTLVFGAGFGAVITVVIVVIIKCFCKHRSCFRRNEAS RETNNSLTFGPEEALAEQTVFL |
| 3 | Isoforma de CD80 humano 2 (sin secuencia señalizadora) | VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVL TMMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVIALRPSDEGTYE CVVLKYEKDAFKREHLAEVTLSVKADFPTPSISDFEIPTSNI RRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELY AVSSKLDNFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTFNWNTSFAP RCRERRRNERLRRRESVRPV |

| SEQ. ID. NO. | Descripción | Secuencia |
|--------------------|--|---|
| 4 | Isoforma de CD80 humano 3 (sin secuencia señalizadora) | VIHVTKEVKEVALSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVL TMMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILRPSDEGTYE CVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVKGFAPRCRERRRNERL RRESVRPV |
| 5 | Secuencia de ECD de CD80 humano (sin secuencia señalizadora) | VIHVTKEVKEVALSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVL TMMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILRPSDEGTYE CVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVKADFPTPSISDFEIPTSNI RRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELY AVSSKLDFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTFNWNNTKQE HFPDN |
| 6 | Secuencia de ECD de CD80 de ratón (sin secuencia señalizadora) | VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHDKV VLSVIAGKLKWPEYKNRTLYDNTTYSIIILGLVLSDRGTY SCVVQKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSA DTKRITCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGINTTISQDPES ELYTISSQLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAHVSEDFTWEPPE DPPDSKN |
| 7 | Secuencia señalizadora de CD80 humano | MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSG |
| 8 | Secuencia señalizadora de CD80 de ratón | MACNCQLMQDTPLLKFPCPRLILLFVLLIRLSQVSSD |
| 9 | Fc C237S | EPKSSDKHTT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPREGQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV CLVKGFYPSDI AVIEWESNGQQ PENNYKTPPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 10 | Fc | ERKCCVECAPP CPAPPVAGPS VFLPPPDK TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAAKT KPREEQFNST FRVVSVLTW HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTIKT KGQPREGQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDI AVIEWESNGQQ PENNYKTPPP SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK |

| SEQ. ID. NO. | Descripción | Secuencia |
|--------------------|--|---|
| 11 | Fc | ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPSSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESENQPE NNYKTPPVVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK |
| 12 | Mutante L234F, L235E, P331S de Fc de IgG1 humana | EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY SDIAVEWESENQPE PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 13 | Mutante N297 de Fc de IgG1 humana | EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYGSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESENQPE PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVK KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 14 | Fc de IgG1 humana | EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY SDIAVEWESENQPE PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 15 | Fc de IgG3 humana | ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDT PPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESENQPE PENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRTQKSLSLSPGK |

| SEQ. ID. NO. | Descripción | Secuencia |
|--------------------|---|---|
| 16 | Fc de IgG4 humana | <p>ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSVQEDPEVQFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVTLPSSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVVMHEALHNHYTQKSLSSLGK</p> |
| 17 | ECD de CD80 de ratón-Fc de ratón | VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHDKVLSVIAGKLKWPEYKNRTLYDNTTYSLIILGLVLSDRGTY |
| | IgG2a (parte de Fc subrayada) | <p>SCVVQKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSADTKRITCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGINTTISQDPSELYTISSQLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAHVSEDFTWEPKPEDPPDSKNEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNEVHTAQ<u>TQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPPEEEMTKQVLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHHHHTTKSFRTPKGK</u></p> |
| 18 | ECD de CD80 de ratón-Fc de IgG1 humana WT (parte de Fc subrayada) | <p>VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHDKVLSVIAGKLKWPEYKNRTLYDNTTYSLIILGLVLSDRGTYSCVVQKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSADTKRITCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGINTTISQDPSELYTISSQLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAHVSEDFTWEPKPEDPPDSKNE<u>EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIERTISKAKGQPREPQVTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVMHEALHNHYTQKSLSSLGK</u></p> |

| SEQ. ID. NO. | Descripción | Secuencia |
|--------------------|--|--|
| 19 | ECD de CD80 de ratón-Fc de IgG1 humana MT (234, 235, 331) (parte de Fc subrayada; mutantes mostrados en negrita) | VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHDKV VLSVIAGKLKWPEYKNRTLYDNTTYSIIILGLVLSDRGTY SCVVQKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSA DTKRITCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGINTTISQDPES ELYTISSQLDFNTRRNHTIKCLIKYGDAHVSEDFTWEPKPE DPPDSKNEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEFGGPSVFLFPPKP <u>KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN</u> AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTQNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP <u>PGK</u> |
| 20 | ECD de CD80 humano-Fc de IgG1 humana WT (parte de Fc subrayada) | VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVL TMMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVIALRPSDEGTYE CVVLKYEKDAFKREHHLAEVTLSVKADFPTPSISDFEIPTSNI RRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELY AVSSKLDNFNMTTNHSFMCLIKYGHRLRVNQTFNWNTTKQE HFPDNEPKSSDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKD <u>LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN</u> AKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K |
| 21 | ECD de CD80 humano-Fc de IgG1 humana L234F, L235E, P331S MT (parte de Fc subrayada; mutantes en negrita) | VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVL TMMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVIALRPSDEGTYE CVVLKYEKDAFKREHHLAEVTLSVKADFPTPSISDFEIPTSNI RRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELY AVSSKLDNFNMTTNHSFMCLIKYGHRLRVNQTFNWNTTKQE HFPDNEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEFGGPSVFLFPPKPKD <u>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN</u> AKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTQNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP <u>GK</u> |
| 22 | PD-1 humana | MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLLDSPDR |

| SEQ. ID. NO. | Descripción | Secuencia |
|--------------------|---|--|
| | precursor (con secuencia señalizadora) UniProtKB/Swiss-Prot: Q15116.3, 01-OCT-2014 | PWNPPPTFSPA LLVVTEGDNA TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLWWLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT IVFPGMGTSPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCWPL |
| 23 | PD-1 humana (madura, sin secuencia señalizadora) | PGWFLDSPDR PWNPPPTFSPA LLVVTEGDNA TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLWWLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT IVFPGMGTSPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCWPL |
| 24 | precursor de PD-L1 humana (con secuencia señalizadora) UniProtKB/Swiss-Prot: Q9NZQ7.1, 01-OCT-2014 | MRIFAVFIFM TYWHLLNAFT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEIME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPVTS HELTCQAEGY PKAEVWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVTSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAELVIPELP LAHPPNERTH LVLGAILLC LGVALTFIFR LRKGGRMMMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET |
| 25 | PD-L1 humana (madura, sin secuencia señalizadora) | FT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEIME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPVTS HELTCQAEGY PKAEVWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVTSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAELVIPELP LAHPPNERTH LVLGAILLC LGVALTFIFR LRKGGRMMMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET |

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende (i) moléculas de fusión del dominio extracelular (ECD) de CD80 que comprenden un polipéptido de ECD de CD80 humano y una dominio Fc de IgG1 humana, y (ii) al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
 en donde las moléculas de fusión de ECD de CD80 comprenden al menos 15 moles o al menos 20 moles de ácido siálico (SA) por mol de proteína de fusión de ECD de CD80, y en donde las moléculas de fusión de ECD de CD80 comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, en donde las moléculas de fusión de ECD de CD80 comprenden 15-60 moles de SA por mol de proteína de fusión de ECD de CD80, o en donde las moléculas de fusión de ECD de CD80 comprenden 15-40, 15-30 o 20-30 moles de SA por mol de proteína de fusión de ECD de CD80.
- 15 3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en donde la composición sola no provoca una liberación significativa de interferón gamma o TNF alfa de linfocitos T *in vitro*.
- 20 4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la composición sola provoca menos liberación de interferón gamma o TNF alfa de linfocitos T *in vitro* que TGN1412 solo, opcionalmente la composición es al menos 1000 veces menos potente en la inducción de la liberación de interferón gamma o TNF alfa en comparación con TGN1412 solo.
- 25 5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además un agente terapéutico adicional.
- 30 6. La composición de la reivindicación 5, en donde el agente terapéutico adicional comprende un inhibidor de muerte celular programada 1 (PD-1) / ligando de muerte celular programada 1 (PD-L1).
- 35 7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la composición es capaz de inhibir el crecimiento tumoral en al menos un 90% en al menos un modelo de cáncer singénico de ratón durante un periodo de al menos una semana, 10 días, dos semanas o tres semanas tras la administración de una dosis única de la composición de 0,3 a 0,6 mg/kg, opcionalmente en donde el modelo de cáncer singénico de ratón es un modelo de tumor CT26.
- 40 8. Una molécula de fusión de ECD de CD80 que comprende un polipéptido de ECD de CD80 y un dominio Fc de IgG1 humana, en donde la molécula de fusión de ECD de CD80 comprende 15-60 moles de SA por mol de la proteína de fusión de ECD de CD80, en donde la molécula de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.
- 45 9. La molécula de fusión de la reivindicación 8, en donde la molécula de fusión comprende 15-40, 15-30 o 20-30 moles de SA por mol de proteína de fusión de ECD de CD80.
- 50 10. La molécula de fusión de la reivindicación 8 o 9, en donde la molécula de fusión sola no provoca una liberación significativa de interferón gamma o TNF alfa de linfocitos T *in vitro*.
- 55 11. La molécula de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde la molécula de fusión sola provoca menos liberación de interferón gamma o TNF alfa de linfocitos T *in vitro* que TGN1412 solo, opcionalmente en donde la molécula de fusión es al menos 1000 veces menos potente en la inducción de la liberación de interferón gamma o TNF alfa en comparación con TGN1412 solo.
- 60 12. La molécula de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en donde la molécula de fusión es capaz de inhibir el crecimiento tumoral en al menos un 90 % en al menos un modelo de cáncer singénico de ratón durante un periodo de al menos 1 semana, 10 días, dos semanas o tres semanas tras la administración de una dosis única de la molécula de fusión de 0,3 a 0,6 mg/kg, opcionalmente en donde el modelo de cáncer singénico de ratón es un modelo de tumor CT26.
- 65 13. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o la molécula de fusión de ECD de CD80 según una cualquiera de las reivindicaciones 8-12 para su uso en el tratamiento del cáncer, opcionalmente en donde el cáncer se selecciona de cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer gástrico, carcinoma broncopulmonar no microcítico, melanoma, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer pancreático, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, cáncer de vejiga y cáncer de endometrio.
14. La composición para su uso o la molécula de fusión para su uso según la reivindicación 13, en donde el cáncer es un tumor sólido.
15. La composición para su uso o la molécula de fusión para su uso según la reivindicación 13 o 14, en donde el cáncer es recurrente o progresivo después de una terapia seleccionada de cirugía, quimioterapia, radioterapia, y una combinación de las mismas.

Crecimiento tumoral

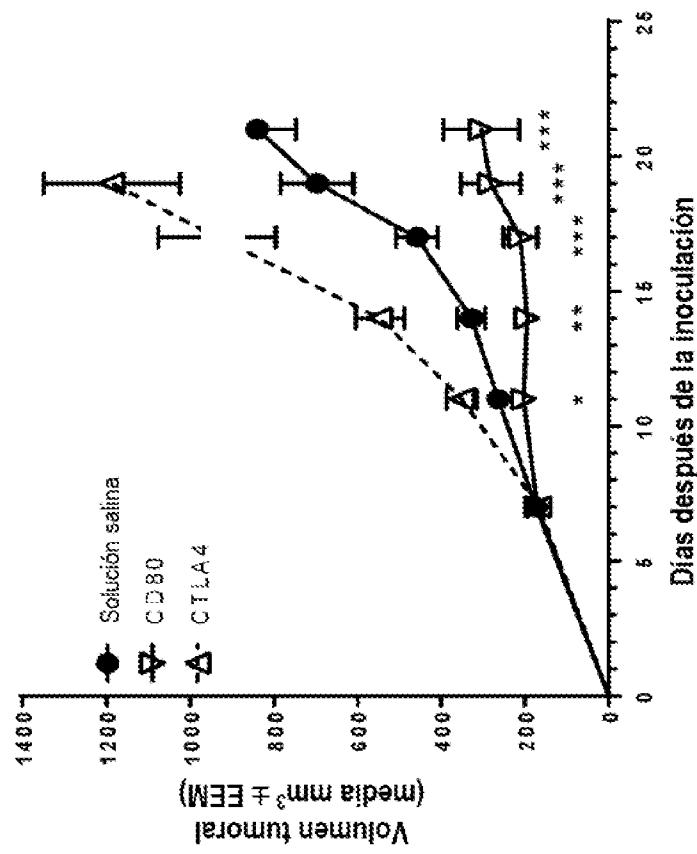


Fig. 1A

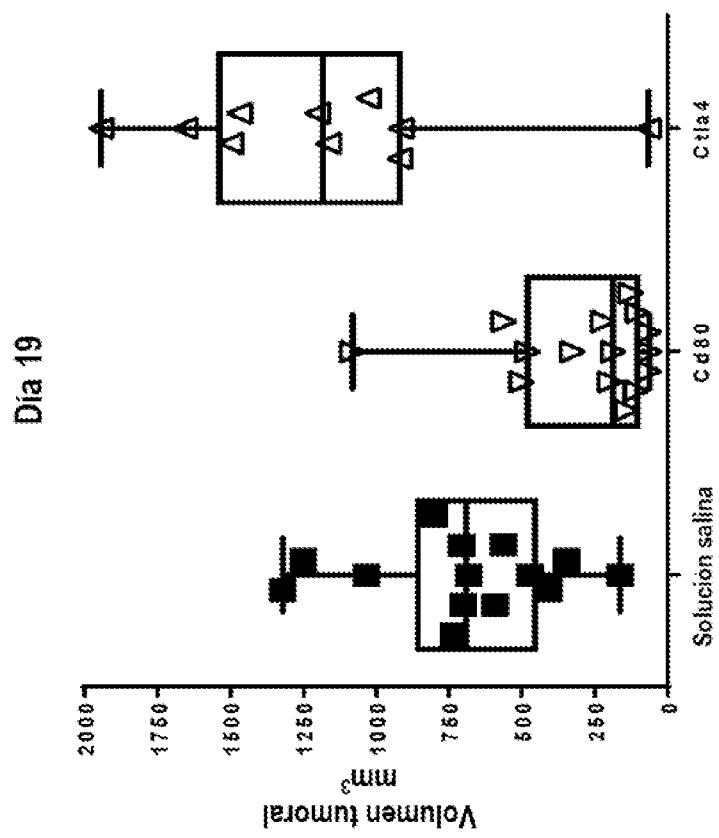


Fig. 1B

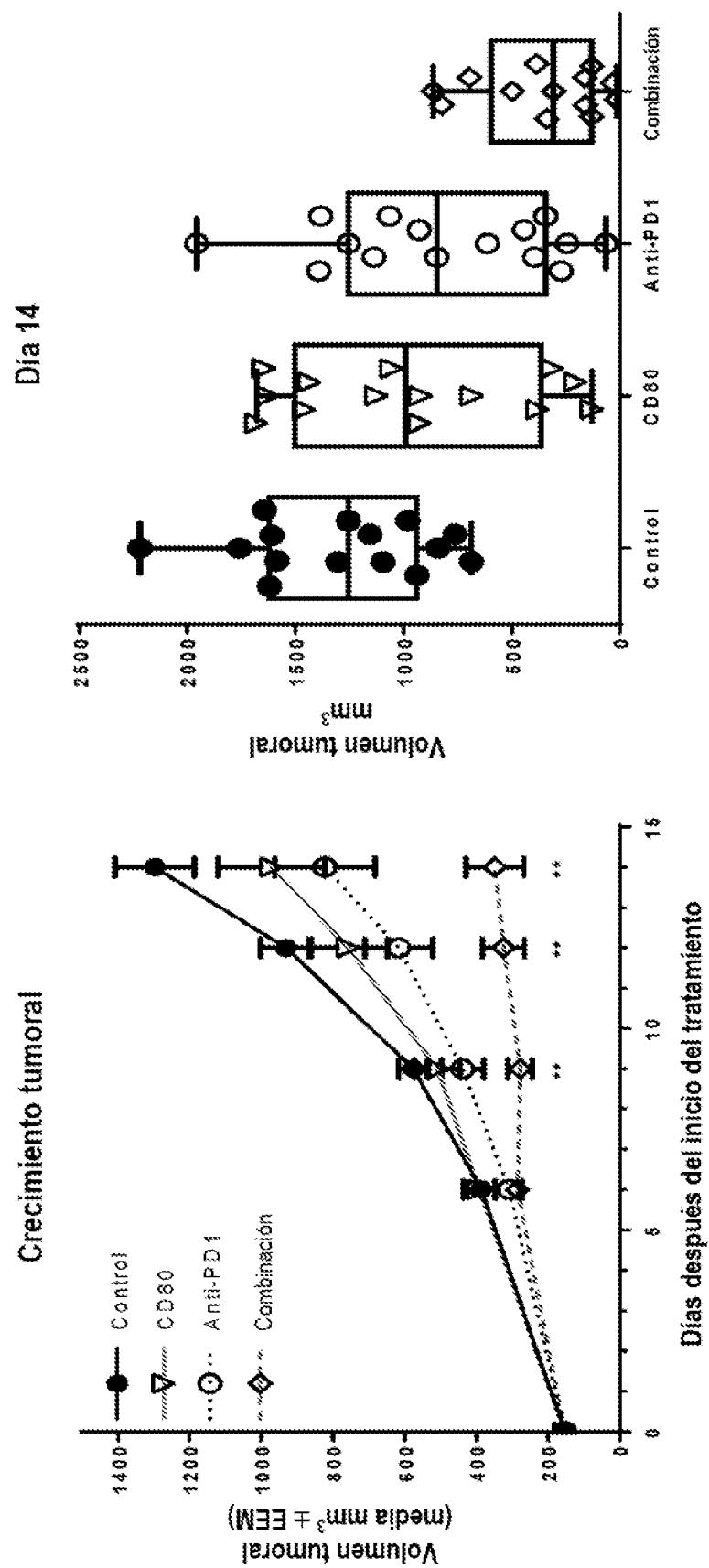
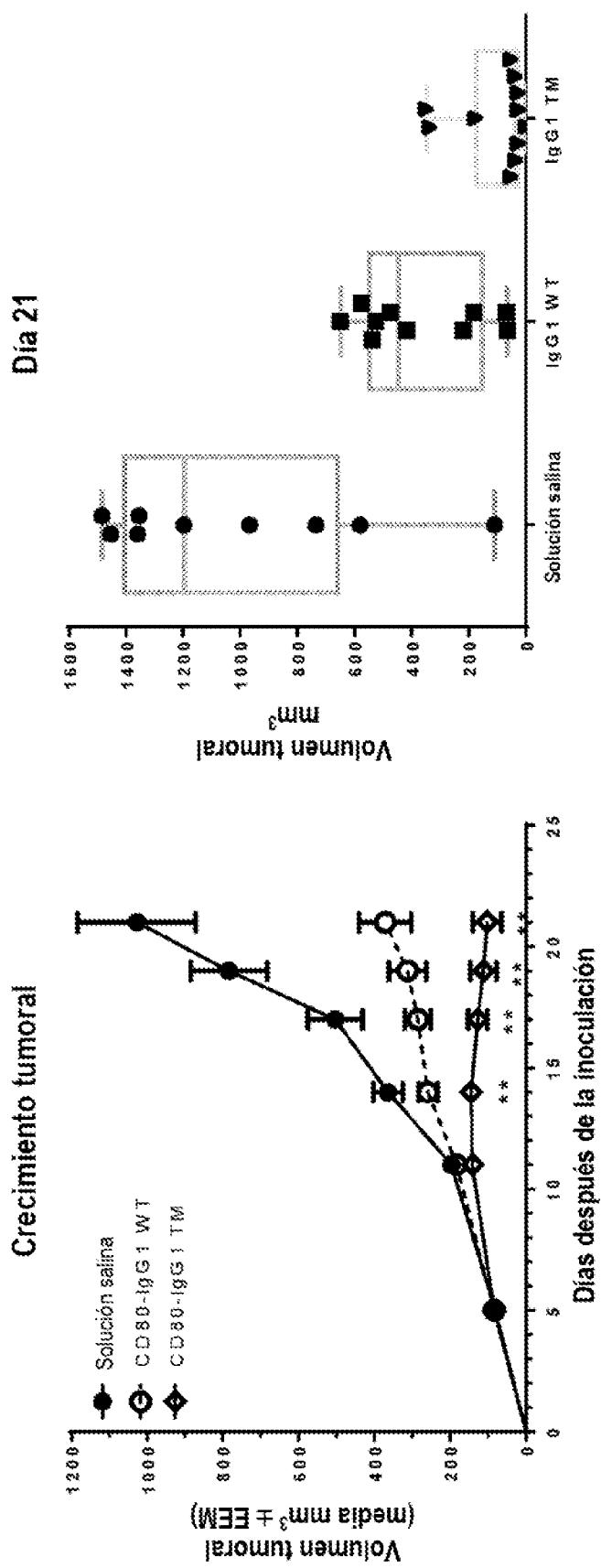


Fig. 2A

Fig. 2B

**Fig. 3B****Fig. 3A**

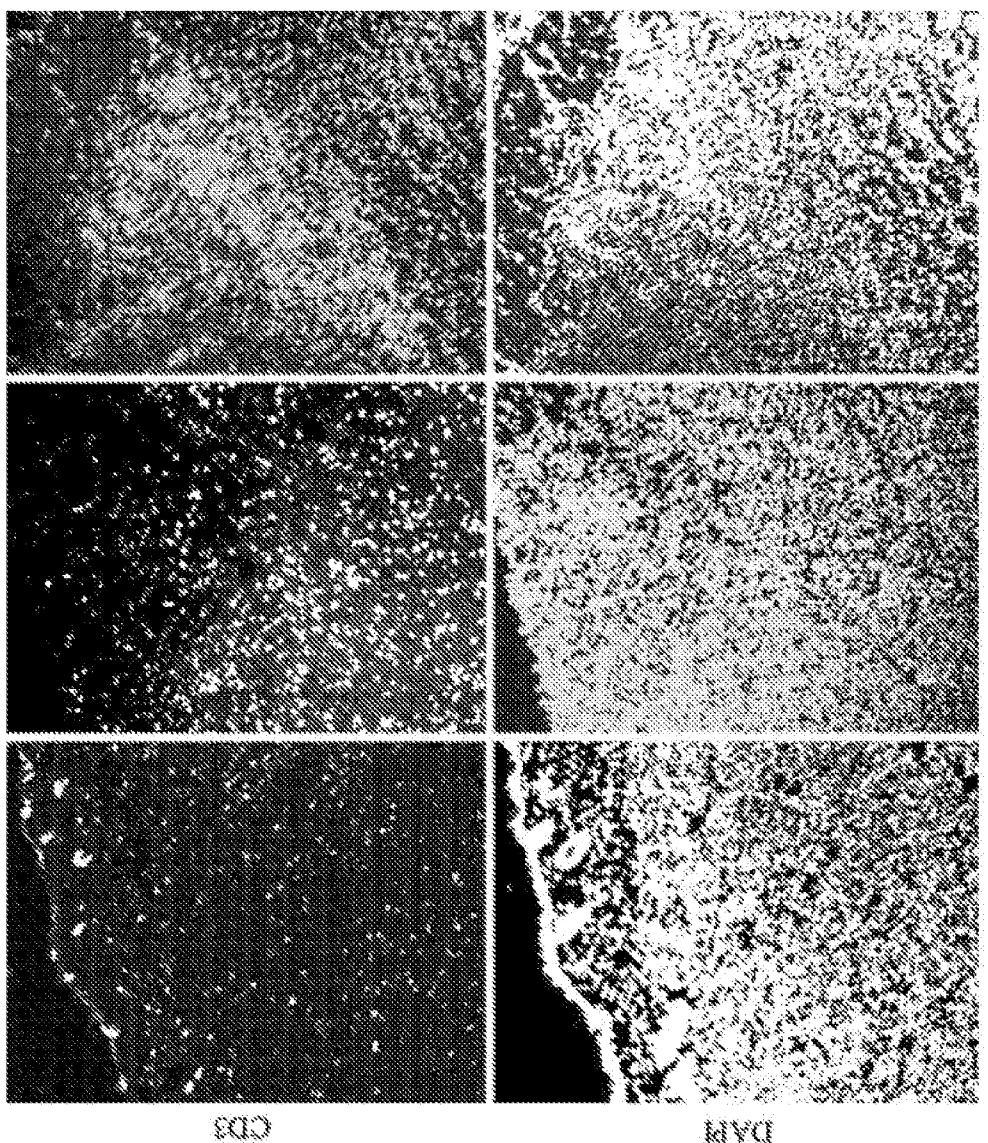


Fig. 4A

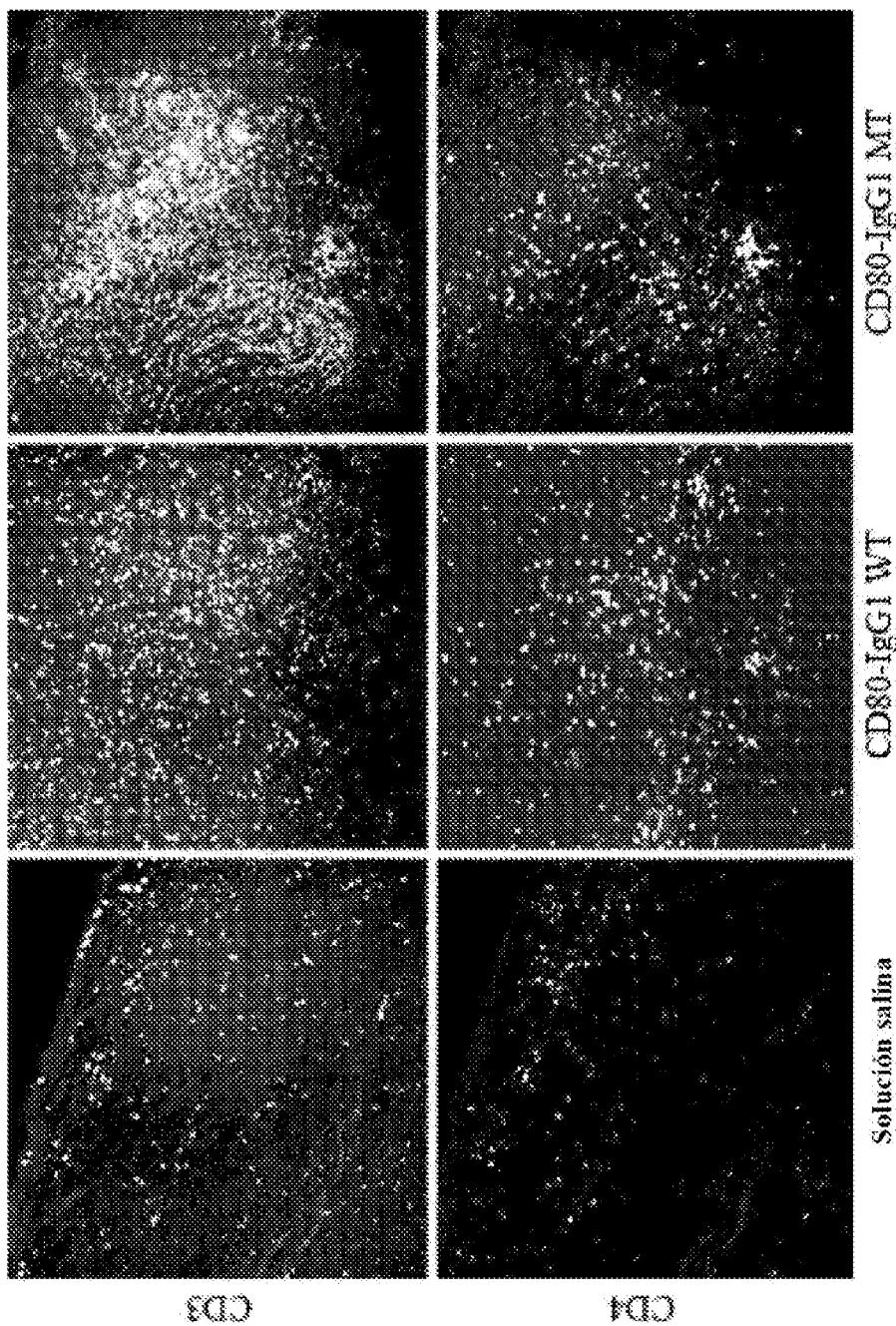


Fig. 4B

ug/pocillo de CD80-Fc inmovilizada

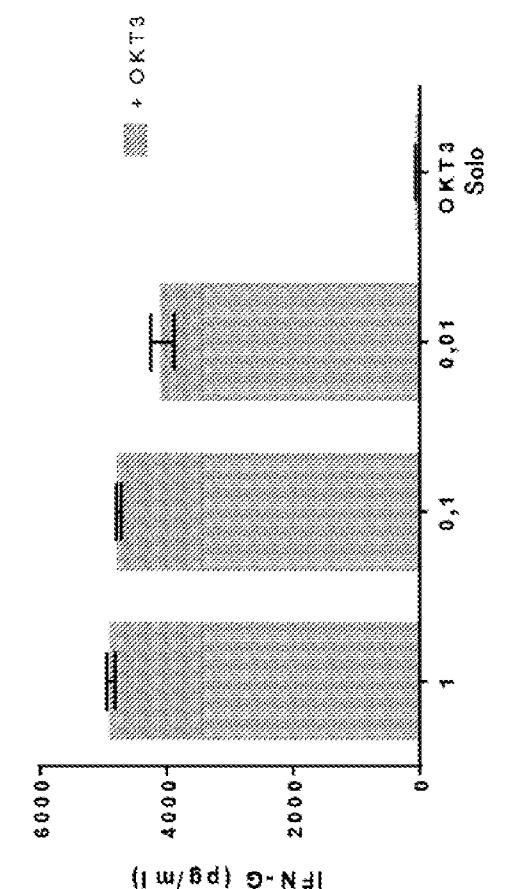


Fig. 5A

ug/pocillo de CD80-Fc inmovilizada

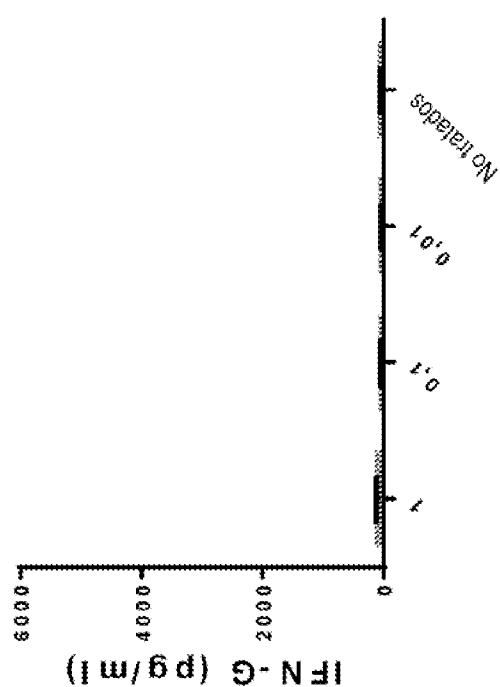


Fig. 5B

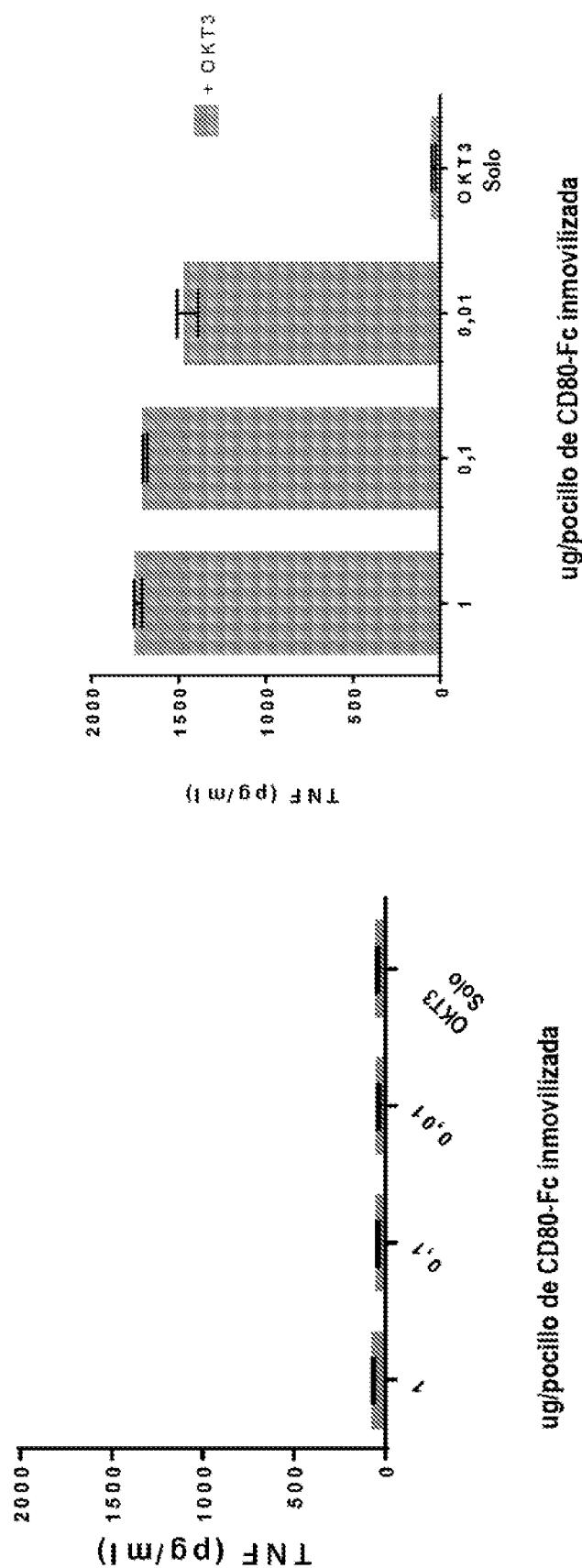


Fig. 5D

Fig. 5C

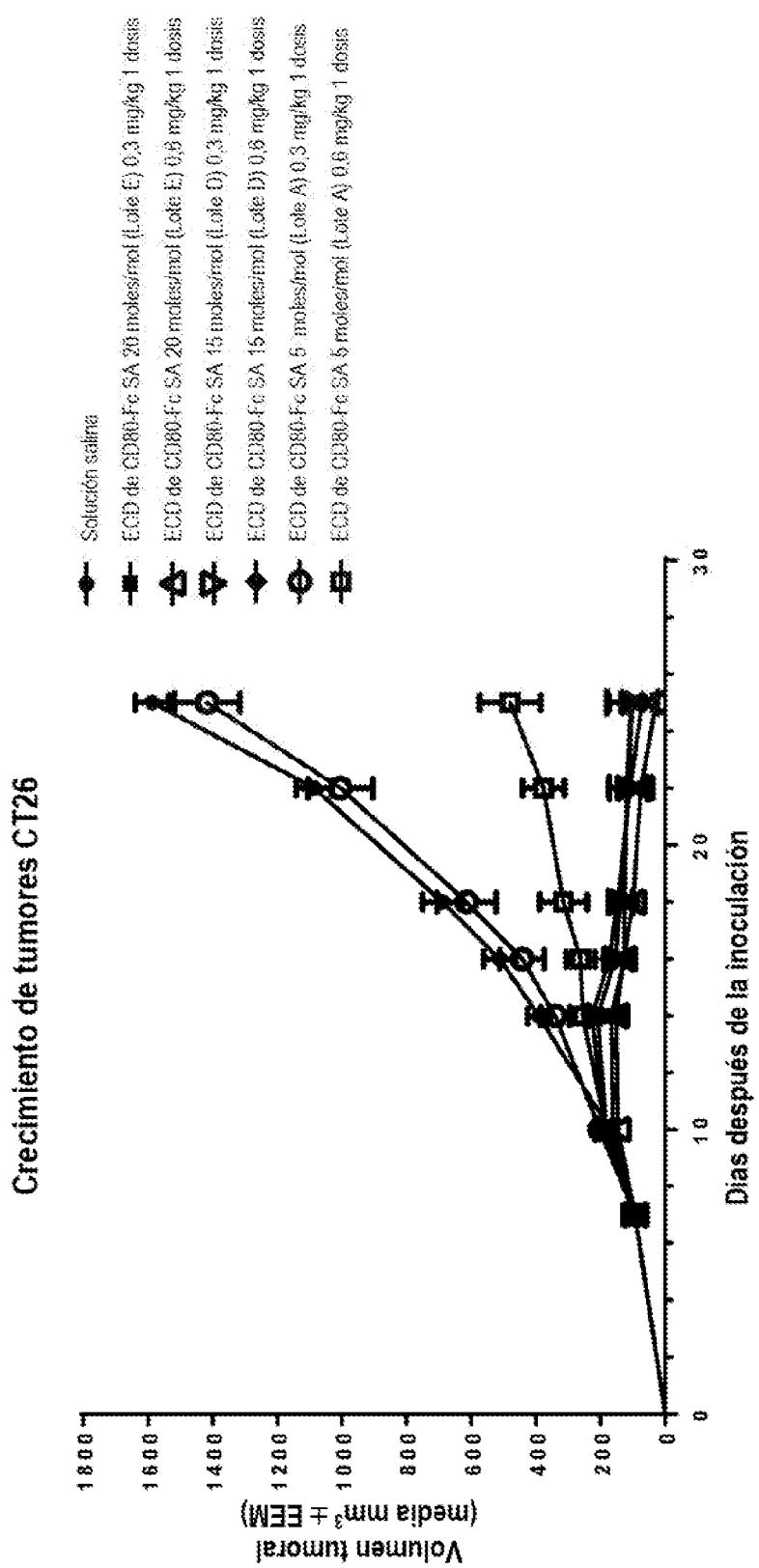


Fig. 6

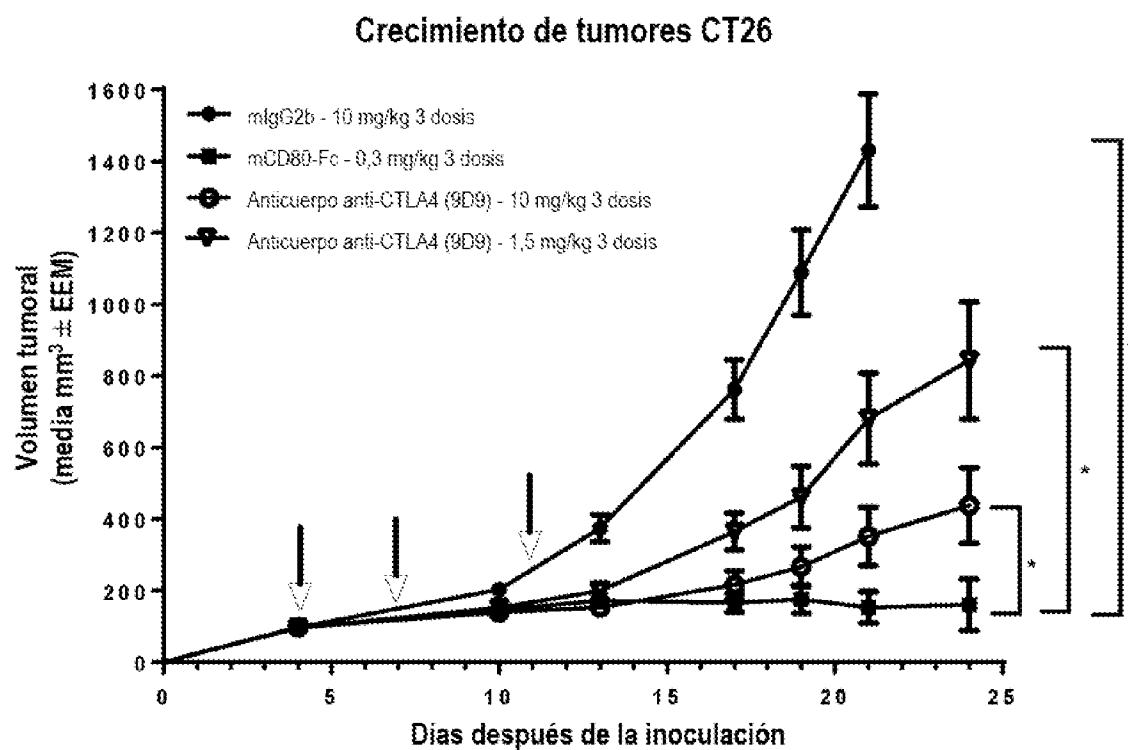


Fig. 7

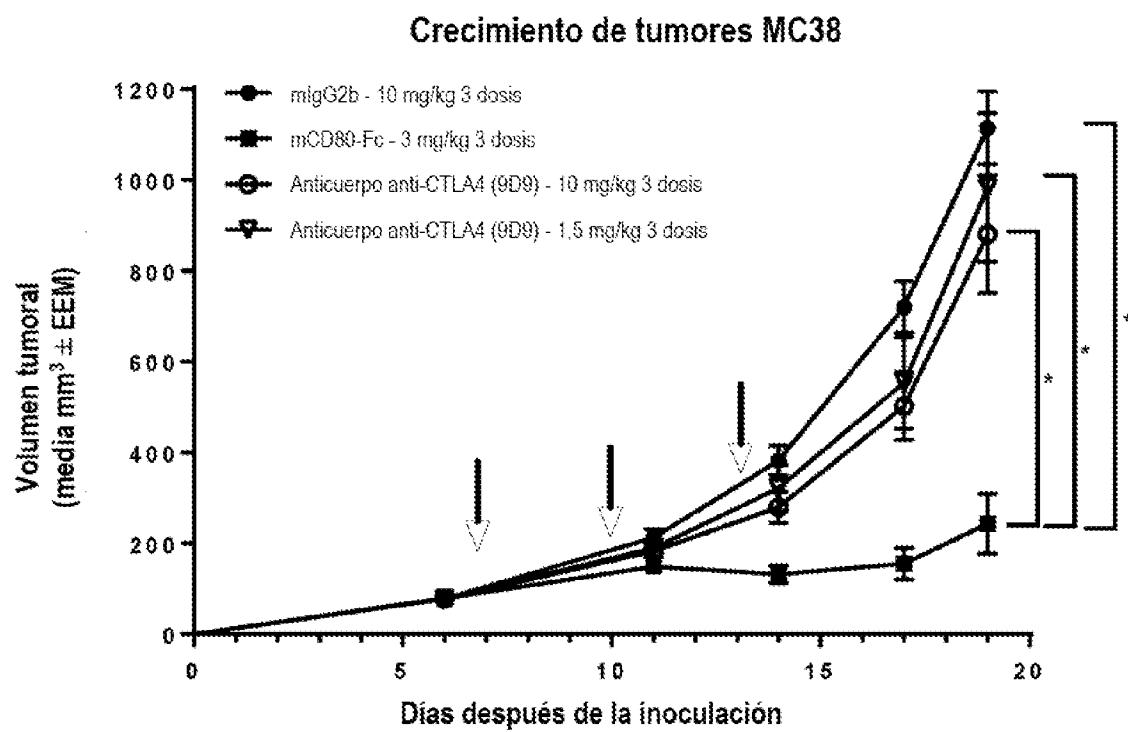


Fig. 8

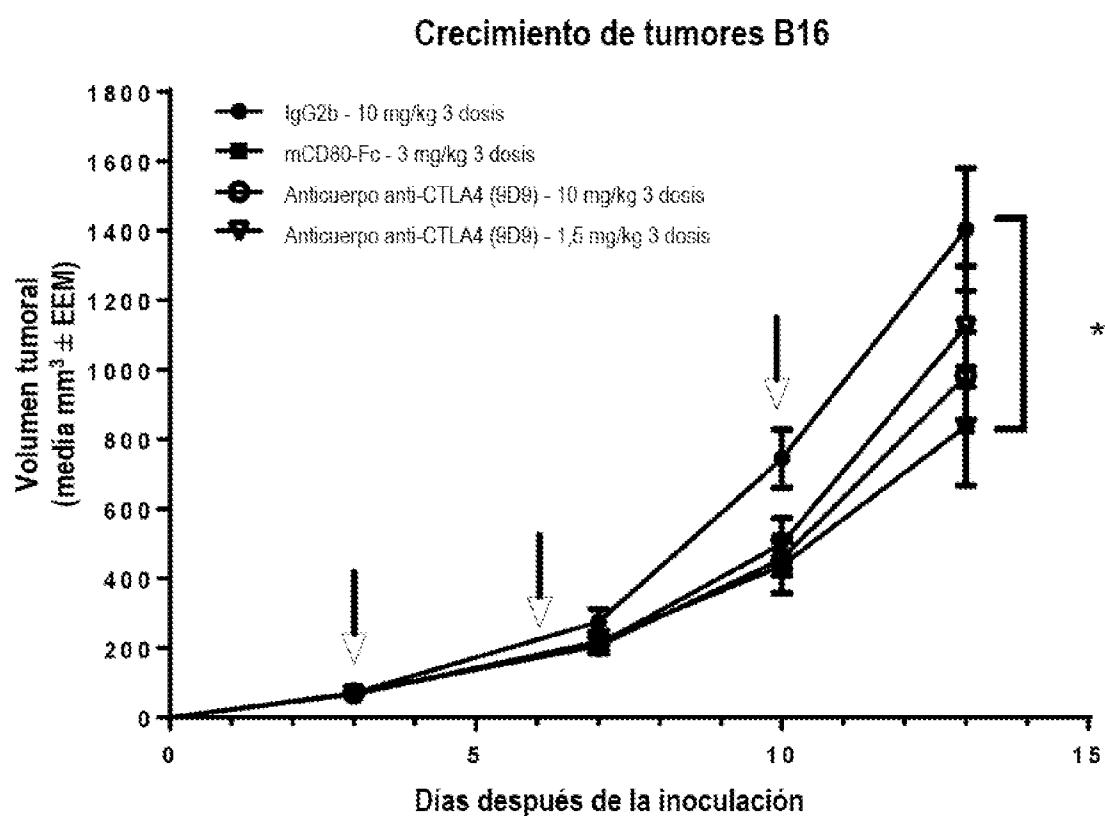


Fig. 9