

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 916 923**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2015 E 17188907 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2022 EP 3309174**

(54) Título: **Anticuerpos anti-PD-L1 y usos diagnósticos de los mismos**

(30) Prioridad:

11.07.2014 US 201462023741 P

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

06.07.2022

(73) Titular/es:

**VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (100.0%)
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, Arizona 85755, US**

(72) Inventor/es:

**BOYD, ZACHARY;
KOWANETZ, MARCIN;
ROCHE, PATRICK C.;
VENNAPUSA, BHARATHI;
ZHU, YIFEI;
LIAO, ZHIMING y
KOEPPEN, HARTMUT**

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 916 923 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

Anticuerpos anti-PD-L1 y usos diagnósticos de los mismos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos contra el ligando 1 de muerte programada (PD-L1) y a métodos de uso de los mismos.

10 Antecedentes

El ligando de muerte programada 1 (PD-L1) es una proteína que se ha relacionado con la supresión de las respuestas del sistema inmunitario durante infecciones crónicas, gestación, aloinjertos de tejido, enfermedades autoinmunitarias y cáncer. PD-L1 regula la respuesta inmunitaria al unirse a un receptor inhibidor, conocido como muerte programada 1 (PD-1), que se expresa en la superficie de los linfocitos T, linfocitos B y monocitos. PD-L1 regula negativamente la función de los linfocitos T también a través de la interacción con otro receptor, B7.1 (también conocido como B7-1 o CD80). La formación de los complejos PD-L1/PD-1 y PD-L1/B7.1 regula negativamente la señalización del receptor de linfocitos T, dando como resultado la posterior disminución de la activación de los linfocitos T y la supresión de la actividad inmunitaria antitumoral. PD-L1 se sobreexpresa en muchos cánceres, incluyendo una amplia variedad de tumores sólidos, tal como tumores de vejiga, mama, colon, pulmón, melanoma, ovario, glándulas salivares, estómago y tiroides. La sobreexpresión de PD-L1 en las células tumorales puede promover la invasión tumoral y, con frecuencia, se asocia con un mal pronóstico.

25 Los anticuerpos anti-PD-L1 se divultan en los documentos US2013/0309250 (28-8) y WO2014/100079 (22C3).

Dado el papel de PD-L1 en la aparición de cáncer y la regulación del sistema inmunitario, son deseables herramientas adicionales para detectar la presencia de PD-L1, por ejemplo para diagnóstico y/o selección de pacientes.

Sumario

30 La presente invención se refiere a anticuerpos contra el ligando 1 de muerte programada (PD-L1) y métodos de uso de los mismos como se establece en las reivindicaciones adjuntas.

35 En el presente documento se divulga un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-L1, en donde el anticuerpo se une a un epítopo que comprende los restos de aminoácidos 279-290 del polipéptido PD-L1 humano (SEQ ID NO: 1). El anticuerpo aislado establecido en las reivindicaciones comprende las siguientes regiones hipervariables (HVR, por sus siglas en inglés): (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SNGLT (SEQ ID NO: 2); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de TINKDASAYYASWAKG (SEQ ID NO: 3); y (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de IAFKTGTTSI (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende además las siguientes regiones marco (FR, por sus siglas en inglés) de dominio variable de cadena pesada: (a) FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QSLEESGGRLVKPDETLTITCTVSGIDLS (SEQ ID NO: 5); (b) FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGEGLEWIG (SEQ ID NO: 6); (c) FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RLTISKPSSTKVDLKITSPPTTEDTATYFCGR (SEQ ID NO: 7); y (d) FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGPGLTVTSS (SEQ ID NO: 8). El anticuerpo comprende además las siguientes HVR: (a) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QASESVYSNNYLS (SEQ ID NO: 9); (b) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de LASTLAS (SEQ ID NO: 10); y (c) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de IGGKSSSTDGNA (SEQ ID NO: 11). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende además las siguientes FR de dominio variable de cadena ligera: (a) FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de AIVMTQTPSPVSAAVGGTVTINC (SEQ ID NO: 12); (b) FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WFQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO: 13); (c) FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFKGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYC (SEQ ID NO: 14); y (d) FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGGGTEVVVR (SEQ ID NO: 15). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende (a) una secuencia VH que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 16; (b) una secuencia VL que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 17; o (c) una secuencia VH como en (a) y una secuencia VL como en (b). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia VH de SEQ ID NO: 16. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia VL de SEQ ID NO: 17.

60 El anticuerpo comprende las siguientes HVR: (a) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QASESVYSNNYLS (SEQ ID NO: 9); (b) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de LASTLAS (SEQ ID NO: 10); y (c) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de IGGKSSSTDGNA (SEQ ID NO: 11). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende además las siguientes FR de dominio variable de cadena ligera: (a) FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de AIVMTQTPSPVSAAVGGTVTINC (SEQ ID NO: 12); (b) FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WFQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO: 13); (c) FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFKGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYC (SEQ ID NO: 14); y (d)

FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGGGTEWVR (SEQ ID NO: 15).

La invención presenta un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-L1, en donde el anticuerpo comprende las siguientes HVR: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SNGLT (SEQ ID NO: 2); (b) una

- 5 HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de TINKDASAYYASWAKG (SEQ ID NO: 3); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de IAFKTGTSI (SEQ ID NO: 4); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QASESVYSNNYLS (SEQ ID NO: 9); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de LASTLAS (SEQ ID NO: 10); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de IGGKSSSTDGNA (SEQ ID NO: 11). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende además las siguientes FR de 10 dominio variable de cadena pesada y dominio variable de cadena ligera: (a) FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QSLEESGGRLVKPDETLITCTVSGIDLS (SEQ ID NO: 5); (b) FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGEGLEWIG (SEQ ID NO: 6); (c) FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RLTISKPSSTKVDLKITSPPTTEDTATYFCGR (SEQ ID NO: 7); (d) FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de 15 WPGTTLTVSS (SEQ ID NO: 8); (e) FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de AIVMTQTTPSPVSAAVGGTVTINC (SEQ ID NO: 12); (f) FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WFQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO: 13); (g) FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFKGSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYC (SEQ ID NO: 14); y (h) FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGGGTEWVR (SEQ ID NO: 15). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia 20 VH de SEQ ID NO: 16 y una secuencia VL de SEQ ID NO: 17.

20 La presente divulgación también presenta un anticuerpo aislado que compite por la unión a PD-L1 con uno cualquiera de los anticuerpos anteriores y un anticuerpo aislado que se une al mismo epítopo que uno cualquiera de los anticuerpos anteriores.

- 25 En algunas realizaciones, uno cualquiera de los anticuerpos anteriores puede ser un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo monoclonal de conejo.

En algunas realizaciones, uno cualquiera de los anticuerpos anteriores puede ser un anticuerpo IgG (por ejemplo, un anticuerpo IgG1).

- 30 En algunas realizaciones, uno cualquiera de los anticuerpos anteriores puede ser un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a PD-L1. En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en Fab, fragmento variable monocatenario (scFv), Fv, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ y diacuerdo.

- 35 En otro aspecto, la invención presenta un inmunoconjunto que comprende uno cualquiera de los anticuerpos anteriores.

En otro aspecto, la invención presenta un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento. En otro aspecto, la invención presenta un vector (p. ej., un vector de expresión) que 40 comprende el ácido nucleico para expresar el anticuerpo. En otro aspecto, la invención presenta células hospedadoras que comprenden los ácidos nucleicos y/o vectores anteriores.

- 45 En algunos aspectos, uno cualquiera de los anticuerpos anteriores puede usarse para detectar la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra biológica. En algunas realizaciones, la detección es por inmunohistoquímica (IHC, por sus siglas en inglés), inmunofluorescencia (IF, por sus siglas en inglés), citometría de flujo, ELISA o inmunotransferencia. En algunas realizaciones, la detección es por IHC. En algunas realizaciones, la muestra comprende un tejido fijado. En algunas realizaciones, el tejido fijado es un tejido fijado en formalina e incluido en 50 parafina (FFPE, por sus siglas en inglés). En algunas realizaciones, la muestra es de un sujeto que tiene, o está en riesgo de tener, un cáncer o una disfunción inmunitaria. En algunas realizaciones, la disfunción inmunitaria es un trastorno disfuncional de linfocitos T. En algunas realizaciones, el trastorno disfuncional de linfocitos T es una infección aguda no resuelta, infección crónica o inmunidad tumoral.

- 55 Otro aspecto de la invención es un método para detectar la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra biológica que comprende poner en contacto la muestra biológica con uno cualquiera de los anticuerpos anteriores de la invención y detectar la presencia del anticuerpo unido. En algunas realizaciones, la detección es por IHC, IF, citometría de flujo, ELISA o inmunotransferencia. En algunas realizaciones, la detección es por IHC. En algunas realizaciones, la muestra comprende un tejido fijado. En algunas realizaciones, el tejido fijado es un tejido FFPE. En algunas realizaciones, la muestra es de un sujeto que tiene, o está en riesgo de tener, un cáncer o una disfunción inmunitaria. En algunas realizaciones, la disfunción inmunitaria es un trastorno disfuncional de linfocitos T. En algunas 60 realizaciones, el trastorno disfuncional de linfocitos T es una infección aguda no resuelta, infección crónica o inmunidad tumoral. En algunas realizaciones, la muestra es de un sujeto que tiene cáncer. En algunas realizaciones, la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra indica que es probable que el sujeto responda al tratamiento con una terapia contra el cáncer. En algunas realizaciones, la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra indica que es más probable que el sujeto responda al tratamiento con una terapia contra el cáncer. En algunas realizaciones, la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra indica la probabilidad de que el sujeto se beneficie del tratamiento con una terapia contra el cáncer. En algunas realizaciones, el método comprende además seleccionar una 65

terapia contra el cáncer para el sujeto en función de la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra. Se puede administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una terapia contra el cáncer (aunque no se reivindica la administración al paciente como tal). En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, leucemia y cáncer de cabeza y cuello. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC, por sus siglas en inglés). En algunas realizaciones, el NSCLC es adenocarcinoma de pulmón o carcinoma escamoso de pulmón. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra tumoral. En algunas realizaciones, la muestra tumoral comprende células inmunitarias infiltrantes de tumores, células tumorales, células del estroma o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la muestra tumoral tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumores que comprenden aproximadamente el 1 % o más de la muestra tumoral por área. En algunas realizaciones, la muestra tumoral tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumores que comprenden aproximadamente el 5 % o más de la muestra tumoral por área. En algunas realizaciones, la muestra tumoral tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumores que comprenden aproximadamente el 10 % o más de la muestra tumoral por área. En algunas realizaciones, la muestra tumoral tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en aproximadamente el 1 % o más de las células tumorales en la muestra tumoral. En algunas realizaciones, la muestra tumoral tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en aproximadamente el 5 % o más de las células tumorales en la muestra tumoral. En algunas realizaciones, la muestra tumoral tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en aproximadamente el 10 % o más de las células tumorales en la muestra tumoral. En algunas realizaciones, la terapia contra el cáncer comprende un antagonista de unión al eje de PD-1. En algunas realizaciones, el antagonista de unión al eje de PD-1 se selecciona entre el grupo que consiste en un antagonista de unión a PD-L1, un antagonista de unión a PD-1 y un antagonista de unión a PD-L2. En algunas realizaciones, el antagonista de unión al eje de PD-1 es un antagonista de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a uno o más de sus compañeros de unión a ligando. En algunas realizaciones, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1. En algunas realizaciones, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a B7-1. En algunas realizaciones, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 tanto a PD-1 como a B7-1. En algunas realizaciones, el antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en: YW243.55.S70, MPDL3280A (atezolizumab), MDX-1105, MEDI4736 (durvalumab) y MSB0010718C (avelumab). En algunas realizaciones, el antagonista de unión al eje de PD-1 es un antagonista de unión a PD-1. En algunas realizaciones, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a uno o más de sus compañeros de unión a ligando. En algunas realizaciones, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD L1. En algunas realizaciones, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD L2. En algunas realizaciones, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 tanto a PD-L1 como a PD-L2. En algunas realizaciones, el antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en: MDX 1106 (nivolumab), MK-3475 (pembrolizumab), MEDI-0680 (AMP-514), PDR001, REGN2810 y BGB-108. En algunas realizaciones, el antagonista de unión a PD-1 es una proteína de fusión de Fc. En algunas realizaciones, la proteína de fusión de Fc es AMP-224. También se puede administrar al sujeto una cantidad eficaz de un segundo agente terapéutico (aunque no se reivindica la administración al paciente como tal). En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un agente citotóxico, un agente inhibidor del crecimiento, un agente de radioterapia, un agente antiangiogénico y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama esquemático que muestra el proceso general de producción de anticuerpos para el anticuerpo anti-PD-L1 SP142. La figura 2A es una imagen que muestra los resultados de inmunohistoquímica (IHC) en células HEK-293 fijadas con formalina e incluidas en parafina (FFPE) transfectadas con un vector vacío (control negativo) utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142. La figura 2B es una imagen que muestra los resultados de IHC en células DOR-13 FFPE (expresión baja a media) utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142. La figura 2C es una imagen que muestra los resultados de IHC en células RKO de carcinoma de colon FFPE (expresión media) utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142. La figura 2D es una imagen que muestra los resultados de IHC en células HEK-293 FFPE transfectadas con PD-L1 humano de longitud completa (alta expresión) utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142. La figura 3A es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido placentario FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142. La figura 3B es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido de amígdala FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142. La figura 3C es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido de un paciente con linfoma de Hodgkin (HK) FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142. La figura 4 es una transferencia Western que muestra la expresión de PD-L1 en lisados celulares de una línea celular de adenocarcinoma de pulmón NIH H820 (alta expresión), una línea celular de linfocitos T Karpas

- 299 (expresión intermedia) y una línea celular de adenocarcinoma de pulmón Calu-3 FFPE (control negativo) utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142.
- 5 La figura 5A es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido placentario FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N a una concentración de 0,11 µg/ml.
- La figura 5B es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido placentario FFPE con el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N a una concentración de 0,44 µg/ml.
- 10 La figura 5C es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido placentario FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N a una concentración de 1,75 µg/ml.
- La figura 5D es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido placentario FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N a una concentración de 7,0 µg/ml.
- 15 La figura 5E es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido placentario FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N a una concentración de 28,0 µg/ml.
- La figura 5F es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido placentario FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142 a una concentración de 0,11 µg/ml.
- 20 La figura 5G es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido placentario FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142 a una concentración de 0,44 µg/ml.
- La figura 5H es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido placentario FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142 a una concentración de 1,75 µg/ml.
- 25 La figura 5I es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido placentario FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142 a una concentración de 7,0 µg/ml.
- La figura 5J es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido placentario FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142 a una concentración de 28,0 µg/ml.
- 30 La figura 6A es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido epitelial estomacal FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N a una concentración de 0,11 µg/ml.
- La figura 6B es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido epitelial estomacal FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N a una concentración de 0,44 µg/ml.
- 35 La figura 6C es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido epitelial estomacal FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N a una concentración de 1,75 µg/ml.
- La figura 6D es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido epitelial estomacal FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N a una concentración de 7,0 µg/ml.
- La figura 6E es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido epitelial estomacal FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N a una concentración de 28,0 µg/ml.
- 40 La figura 6F es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido nervioso FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N a una concentración de 0,11 µg/ml.
- La figura 6G es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido nervioso FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N a una concentración de 0,44 µg/ml.
- 45 La figura 6H es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido nervioso FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N a una concentración de 1,75 µg/ml.
- La figura 6I es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido nervioso FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N a una concentración de 7,0 µg/ml.
- 50 La figura 6J es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido nervioso FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N a una concentración de 28,0 µg/ml.
- La figura 6K es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido epitelial estomacal FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142 a una concentración de 0,11 µg/ml.
- 55 La figura 6L es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido epitelial estomacal FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142 a una concentración de 0,44 µg/ml.
- La figura 6M es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido epitelial estomacal FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142 a una concentración de 1,75 µg/ml.
- 60 La figura 6N es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido epitelial estomacal FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142 a una concentración de 7,0 µg/ml.
- La figura 6O es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido epitelial estomacal FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142 a una concentración de 28,0 µg/ml.
- 65 La figura 6P es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido nervioso FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142 a una concentración de 0,11 µg/ml.
- La figura 6Q es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido nervioso FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142 a una concentración de 0,44 µg/ml.
- La figura 6R es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido nervioso FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142 a una concentración de 1,75 µg/ml.
- La figura 6S es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido nervioso FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142 a una concentración de 7,0 µg/ml.
- La figura 6T es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido nervioso FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142 a una concentración de 28,0 µg/ml.
- La figura 7A es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido epitelial estomacal FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N.
- 65 La figura 7B es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido renal FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N.

- La figura 7C es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido de carcinoma de células transicionales (TCC) de vejiga FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N.
- 5 La figura 7D es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido de carcinoma (Ca) ductal de mama FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N.
- La figura 7E es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido de carcinoma de células escamosas de pulmón FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N.
- 10 La figura 7F es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido epitelial estomacal FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142.
- La figura 7G es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido renal FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142.
- 15 La figura 7H es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido de carcinoma de células transicionales (TCC) de vejiga FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142.
- La figura 7I es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido de carcinoma (Ca) ductal de mama FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142.
- 15 La figura 7J es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido de carcinoma de células escamosas de pulmón FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142.
- 20 La figura 8A es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido de amígdala FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N.
- La figura 8B es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido de carcinoma de células escamosas (SCC, por sus siglas en inglés) de cuello uterino FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N.
- 25 La figura 8C es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido de linfoma de Hodgkin (linfoma HK) FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N.
- La figura 8D es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido de adenocarcinoma pancreático FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N.
- 30 La figura 8E es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido de adenocarcinoma de próstata FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N.
- La figura 8F es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido de SCC cutáneo FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N.
- 35 La figura 8G es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido de amígdala FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142.
- La figura 8H es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido de carcinoma de células escamosas (SCC) de cuello uterino FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142.
- 40 La figura 8I es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido de linfoma de Hodgkin (linfoma HK) FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142.
- La figura 8J es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido de adenocarcinoma pancreático FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142.
- 45 La figura 8K es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido de adenocarcinoma de próstata FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142.
- La figura 8L es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido de SCC cutáneo FFPE utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142.
- La figura 9A es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido FFPE de un paciente con NSCLC utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N.
- 50 La figura 9B es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido FFPE de un paciente con NSCLC utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N.
- La figura 9C es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido FFPE de un paciente con NSCLC utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N.
- 55 La figura 9D es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido FFPE de un paciente con NSCLC utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N.
- La figura 9E es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido FFPE de un paciente con NSCLC utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N.
- 60 La figura 9F es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido FFPE de un paciente con NSCLC utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142.
- La figura 9G es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido FFPE de un paciente con NSCLC utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142.
- 65 La figura 9H es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido FFPE de un paciente con NSCLC utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142.
- La figura 9I es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido FFPE de un paciente con NSCLC utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142.
- La figura 9J es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido FFPE de un paciente con NSCLC utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142.
- La figura 10 es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido FFPE de un paciente con NSCLC utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142. La imagen muestra células inmunitarias (IC, por sus siglas en inglés, tinción marrón oscuro) infiltrantes de tumores PD-L1 positivas presentes como agregados en el estroma tumoral. La sección de tejido se contratiñó con hematoxilina (azul).
- 65 La figura 11 es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido FFPE de un paciente con NSCLC utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142. La imagen muestra la tinción de células tumorales (TC, por sus

siglas en inglés) PD-L1 positivas. La señal de PD-L1 se muestra en color marrón oscuro. La sección de tejido se contratiñó con hematoxilina (azul).

5 La figura 12A es una imagen que muestra regiones de estroma y área tumoral en una muestra de resección de tumor NSCLC teñido con H&E. Las flechas indican estroma peritumoral, masa de células tumorales y estroma intratumoral. La línea negra delimita el borde del área tumoral. La imagen se tomó con una potencia de aumento mayor.

10 Las Figuras 12B-12C son imágenes que muestran el área tumoral de una muestra de resección de NSCLC. Se tiñeron secciones en serie de la muestra tumoral con H&E (figura 12B) o mediante IHC de PD-L1 utilizando el anticuerpo SP142 (figura 12C). La señal de PD-L1 en la figura 12C se muestra en color marrón oscuro. La línea azul delimita el área tumoral (véase el ejemplo 5). Estas imágenes corresponden a la misma muestra que se muestra en la figura 12A, pero se tomaron con una potencia de aumento menos.

15 La figura 13 es un esquema que muestra un flujo de trabajo ilustrativo para determinar el porcentaje de área tumoral cubierta por células inmunitarias infiltrantes de tumores PD-L1 positivas (IC%). En este ejemplo, el IC % se estimó visualmente en 10 %.

20 Las Figuras 14A-14B muestran un método de puntuación ilustrativo para IHC de PD-L1 con un patrón de tinción de agregado de IC PD-L1 positivas. La figura 14A muestra que los agregados de IC PD-L1 positivas (señal de color marrón oscuro) se rodearon visualmente lo más cerca posible, generando contornos de cada agregado de IC PD-L1 positivas (contornos azules). Estas regiones se combinaron y se estimó el área combinada como porcentaje del área tumoral (figura 14B). En la figura 14B, el área tumoral se dividió en 1/10° (recuadros), y se combinaron los contornos de los agregados de IC PD-L1 positivas de la figura 14A. Los contornos llenaron uno de los recuadros y, por lo tanto, en este ejemplo, se estimó que el porcentaje de área tumoral cubierta por IC PD-L1 positivas era del 10 %. Las imágenes muestran los resultados de IHC en secciones de tejido FFPE de pacientes con NSCLC utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142.

25 Las Figuras 15A-15B muestran imágenes con un patrón de tinción de IC PD-L1 positivas propagadas como células sueltas. En este ejemplo, las imágenes se valoraron en función de la densidad de la propagación de células sueltas en comparación con las imágenes de referencia (véase, por ejemplo, la figura 16). La figura 15A muestra una imagen en la que la densidad celular para IC PD-L1 propagadas como células sueltas era del 1 %. La figura 15B muestra una imagen en la que la densidad celular para IC PD-L1 propagadas como células sueltas era del 5 %. Las imágenes muestran los resultados de IHC en secciones de tejido FFPE de pacientes con NSCLC utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142.

30 Las Figuras 16A-16H muestran imágenes de referencia ilustrativas para el patrón de tinción de IC PD-L1 positivas propagadas como células sueltas en los puntos de corte de la expresión en IC de PD-L1 indicados. Las imágenes muestran los resultados de IHC en secciones de tejido FFPE de pacientes con NSCLC utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142. Las Figuras 16A-16B muestran imágenes en las que el % de IC PD-L1 positivas era inferior al 1 %. Las Figuras 16C-16D muestran imágenes en las que el % de IC PD-L1 positivas era de mayor o igual al 1 % a menor del 5 %. Las Figuras 16E-16F muestran imágenes en las que el % de IC PD-L1 positivas era de mayor o igual al 5 % a menor del 10 %. Las Figuras 16G-16H muestran imágenes en las que el % de IC PD-L1 positivas era mayor o igual al 10 %.

35 La figura 17A muestra imágenes de secciones en serie de tejido FFPE de pacientes con NSCLC que se tiñeron con H&E (arriba) o se procesaron por IHC utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142 (abajo). En este ejemplo, no se detectaron IC intratumorales en la sección teñida con H&E, y IHC detectó una fuerte tinción PD-L1 en TC. Las IC se valoraron en el estroma (flecha).

40 La figura 17B muestra imágenes de secciones en serie de tejido FFPE de pacientes con NSCLC que se tiñeron con H&E (arriba) o se procesaron por IHC utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142 (abajo). En este ejemplo, se detectaron IC intratumorales en la sección teñida con H&E, y IHC detectó tinción PD-L1 en TC de débil a moderada. Las CI se valoraron tanto en el estroma como en los grupos de células tumorales.

45 La figura 17C muestra imágenes de secciones en serie de tejido FFPE de pacientes con NSCLC que se tiñeron con H&E (arriba) o se procesaron para IHC utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142 (abajo). En este ejemplo, no se detectaron IC intratumorales en la sección teñida con H&E, y IHC detectó tinción granular PD-L1 en TC. La tinción granular se valoró como TC PD-L1 positivas siempre que la tinción se dispusiera de forma lineal (es decir, a lo largo del contorno de la membrana celular).

50 Las FIGURAS 18A-18F muestran imágenes ilustrativas para el patrón de tinción de TC PD-L1 positivas en los puntos de corte del % de TC con PD-L1 indicados. Las imágenes muestran los resultados de IHC en secciones de tejido FFPE de pacientes con NSCLC utilizando el anticuerpo anti-PD-L1 SP142. Las figuras 18A-18B muestran imágenes en las que el % de TC era inferior al 5 %. Las Figuras 18C-18D muestran imágenes en las que el % TC era mayor o igual al 5 % a menor del 50 %. Las figuras 18E-18F muestran imágenes en las que el % de TC era mayor o igual al 50 %.

60 Descripción detallada de las realizaciones de la invención

65 I. Definiciones

El término "aproximadamente", como se usa en el presente documento, se refiere al intervalo de error habitual para el valor correspondiente, fácilmente conocido por los expertos en este campo técnico. La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) realizaciones que se refieren a ese valor o parámetro en sí mismo. Por ejemplo, una descripción que hace referencia a "aproximadamente X" incluye la

descripción de "X".

"Afinidad " se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede estar representada en general por la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse mediante métodos habituales conocidos en la técnica, incluyendo aquellos descritos en el presente documento. A continuación se describen realizaciones específicas ilustrativas y de ejemplo para medir la afinidad de unión.

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

El término "anergia" se refiere al estado de falta de capacidad de respuesta a la estimulación antigénica resultante de señales incompletas o insuficientes suministradas a través del receptor de linfocitos T (por ejemplo, aumento de Ca⁺² intracelular en ausencia de activación de ras). La anergia de los linfocitos T también puede ser el resultado de la estimulación con antígeno en ausencia de coestimulación, dando como resultado que la célula se vuelva refractaria a la activación posterior del antígeno incluso en el contexto de la coestimulación. El estado de falta de respuesta con frecuencia puede anularse por la presencia de interleucina-2. Los linfocitos T anárgicos no experimentan expansión clonal y/o no adquieren funciones efectoras.

La expresión "terapia contra el cáncer" se refiere a una terapia útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes terapéuticos anticancerosos incluyen, pero sin limitación, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes utilizados en radioterapia, agentes antiangiogénesis, agentes apoptóticos, agentes antitubulina y otros agentes para tratar cáncer, por ejemplo, antagonistas de unión al eje de PD-1, anticuerpos anti-CD20, inhibidores de factores de crecimiento derivados de plaquetas (por ejemplo, GLEEVEC™ (imatinib mesilato)), un inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferones, citocinas, antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que se unen a una o más de las siguientes dianas PDGFR-β, BlyS, APRIL, uno o más receptores de BCMA, TRAIL/Apo2, otros agentes químicos bioactivos y orgánicos y similares. Las combinaciones de los mismos también se incluyen en la invención.

Las expresiones "anticuerpo anti-PD-L1", "anticuerpo anti-PD-L1" "anticuerpo que se une específicamente a PD-L1", y "anticuerpo que se une a PD-L1" se refieren a un anticuerpo que es capaz de unirse a PD-L1 con suficiente afinidad de manera que el anticuerpo es útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico para el direccionamiento a PD-L1. En una realización, el alcance de la unión de un anticuerpo anti-PD-L1 a una proteína no relacionada, distinta de PD-L1 es menor de aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo a PD-L1 medida, por ejemplo, mediante radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés). En determinadas realizaciones, un anticuerpo que se une a PD-L1 tiene una constante de disociación (Kd) de ≤1 μM, ≤100 nM, ≤10 nM, ≤1 nM, ≤0,1 nM, ≤0,01 nM o ≤0,001 nM (por ejemplo, 10⁻⁸ M o menos, por ejemplo, de 10⁻⁸ M a 10⁻¹³ M, por ejemplo, de 10⁻⁹ M a 10⁻¹³ M). En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-PD-L1 se une a un epítopo de PD-L1 que está conservado entre PD-L1 de diferentes especies.

Las expresiones "anticuerpo anti-PD-1" y "un anticuerpo que se une a PD-1" se refieren a un anticuerpo que es capaz de unirse a PD-1 con suficiente afinidad de manera que el anticuerpo es útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico para el direccionamiento a PD-1. En una realización, el alcance de la unión de un anticuerpo anti-PD-1 a una proteína no relacionada, distinta de PD-1 es menor de aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo a PD-1 medida, por ejemplo, mediante radioinmunoensayo (RIA). En determinadas realizaciones, un anticuerpo que se une a PD-1 tiene una constante de disociación (Kd) de ≤1 μM, ≤100 nM, ≤10 nM, ≤1 nM, ≤0,1 nM, ≤0,01 nM o ≤0,001 nM (por ejemplo, 10⁻⁸ M o menos, por ejemplo, de 10⁻⁸ M a 10⁻¹³ M, por ejemplo, de 10⁻⁹ M a 10⁻¹³ M). En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-PD-1 se une a un epítopo de PD-1 que está conservado entre PD-1 de diferentes especies. Los anticuerpos anti-PD-1 ilustrativos incluyen, pero sin limitación, MDX 1106 (nivolumab) y MK-3475 (pembrolizumab).

El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y abarca diversas estructuras de anticuerpo, que incluyen, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, siempre que muestren la actividad de unión a antígeno deseada. El anticuerpo de la invención es como se establece en las reivindicaciones.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo inalterado que comprende una porción de un anticuerpo inalterado que se une al antígeno al que se une el anticuerpo inalterado. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

La digestión con papaina de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión a antígeno y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar con facilidad. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación con antígeno y sigue siendo capaz de reticularse con el antígeno.

- 5 "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión a antígeno completo. En una realización, una especie Fv de dos cadenas consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en una asociación fuerte no covalente. En una especie de Fv monocatenario (scFv), un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera se pueden unir covalentemente mediante un enlazador peptídico flexible, de manera que las cadenas ligera y pesada se puedan asociar en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie de Fv bicatenario. Es en esta configuración que las tres HVR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. En conjunto, las seis HVR confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.
- 10 El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos restos en el extremo carboxi del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en el presente documento para Fab' en el que el uno o más restos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ originalmente se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.
- 15 25 Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenario" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido scFv además comprende un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv, véanse, por ejemplo, Pluckthun, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York, 1994), págs. 269-315.
- 20 30 El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado con un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Usando un enlazador que sea demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Se describen diacuerpos con más detalle en, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 1993/01161; Hudson *et al.*, Nat. Med. 9:129-134 (2003); y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson *et al.*, Nat. Med. 9:129-134 (2003).
- 35 40 45 Un "anticuerpo que se une al mismo epítopo" que un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competencia en un 50 % o más y, por el contrario, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un 50% o más en un ensayo de competencia. Se proporciona en el presente documento un ensayo de competencia ilustrativo.
- 50 Una "enfermedad autoinmunitaria" es una enfermedad o trastorno que surge y se dirige contra los propios tejidos u órganos de un individuo o una segregación simultánea o manifestación de la misma o afección resultante de la misma. Las enfermedades autoinmunitarias pueden ser una enfermedad específica de un órgano (es decir, la respuesta inmunitaria está dirigida específicamente contra un sistema de órganos tal como el sistema endocrino, el sistema hematopoyético, la piel, el sistema cardiopulmonar, los sistemas gastrointestinal y hepático, el sistema renal, el tiroides, las orejas, el sistema neuromuscular, el sistema nervioso central, etc.) o una enfermedad sistémica que puede afectar a múltiples sistemas de órganos (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico (SLE, por sus siglas en inglés), artritis reumatoide (RA, por sus siglas en inglés), polimiositis, etc.). Las enfermedades autoinmunitarias ilustrativas no limitantes incluyen trastornos reumatológicos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, RA, síndrome de Sjögren, esclerodermia, lupus, tales como LES y nefritis lúpica, polimiositis-dermatomiositis, crioglobulinemia, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos y artropatía psoriásica), trastornos autoinmunitarios gastrointestinales y del hígado (tales como, por ejemplo, enteropatías inflamatorias (por ejemplo, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), gastritis autoinmunitaria y anemia perniciosa, hepatitis autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria y celiaquía), vasculitis (tales como, por ejemplo, vasculitis ANCA negativa y vasculitis asociada a ANCA, incluyendo la vasculitis de Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener y poliangitis microscópica), trastornos neurológicos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, esclerosis múltiple, síndrome de opsoclonía-mioclonía, miastenia grave, neuromielitis óptica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y polineuropatías autoinmunitarias), trastornos renales (tales como, por ejemplo, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture y la enfermedad de Berger), trastornos dermatológicos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, psoriasis, urticaria, habones, pénfigo vulgar, pénfigo ampolloso y lupus eritematoso cutáneo), trastornos hematológicos (tales como, por ejemplo, púrpura trombocitopénica, púrpura trombocitopénica trombótica, púrpura postransfusional y anemia hemolítica autoinmunitaria), aterosclerosis, uveítis, enfermedades autoinmunitarias de la audición (tales como, por ejemplo,

enfermedad del oído interno y pérdida de audición), enfermedad de Behcet, síndrome de Raynaud, trasplante de órganos y trastornos endocrinos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, trastornos autoinmunitarios relacionados con la diabetes tales como diabetes sacarina insulinodependiente (IDDM, por sus siglas en inglés), enfermedad de Addison y enfermedad tiroidea autoinmunitaria (por ejemplo, enfermedad de Grave y tiroditis)). Las enfermedades de este tipo más preferidas incluyen, por ejemplo, RA, colitis ulcerosa, vasculitis asociada a ANCA, lupus, esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren, enfermedad de Graves, IDDM, anemia perniciosa, tiroditis y glomerulonefritis.

La expresión "basándose en", cuando se usa en el presente documento, significa que la información acerca de uno o más biomarcadores (por ejemplo, PD-L1) se usa para informar una decisión de diagnóstico, información proporcionada en un prospecto u orientación de comercialización/promocional, por ejemplo.

Por "muestra biológica" se entiende una colección de células similares obtenidas de un sujeto o paciente. Una muestra biológica puede ser una muestra de tejido o de células. La fuente de la muestra de células o tejido puede ser tejido sólido, tal como de un órgano en fresco, congelado y/o preservado o una muestra de tejido o biopsia o aspirado; sangre o cualquier constituyente de la sangre; fluidos corporales, tales como fluido cefalorraquídeo, líquido amniótico, fluido peritoneal o fluido intersticial; células de cualquier momento durante la gestación o el desarrollo del sujeto. La muestra biológica también se puede obtener de cultivo de tejidos o células *in vitro*. La muestra de tejido puede comprender compuestos que no están naturalmente mezclados con el tejido en la naturaleza, tal como conservantes, anticoagulantes, tampones, fijativos, nutrientes, antibióticos o similares. Ejemplos de muestras de tumores en el presente documento incluyen, pero sin limitación, biopsias de tumores, células tumorales circulantes, suero o plasma, proteínas plasmáticas circulantes, líquido ascítico, cultivos celulares primarios o líneas celulares procedentes de tumores o que muestran propiedades similares a los tumores, así como muestras tumorales conservadas, tal como muestras tumorales fijadas en formalina, incluidas en parafina o muestras tumorales congeladas.

El término "biomarcador", como se usa en el presente documento, se refiere a un indicador, por ejemplo, predictivo, de diagnóstico y/o pronóstico, que se puede detectar en una muestra, por ejemplo, PD-L1. El biomarcador puede servir como indicador de un subtipo particular de una enfermedad o trastorno (p. ej., cáncer) caracterizado por determinadas características moleculares, patológicas, histológicas y/o clínicas. En algunas realizaciones, un biomarcador es un gen. Los biomarcadores incluyen, pero sin limitación, polinucleótidos (por ejemplo, ADN y/o ARN), alteraciones del número de copias de polinucleótidos (por ejemplo, números de copias de ADN), polipéptidos, modificaciones de polipéptidos y polinucleótidos (por ejemplo, modificaciones postraduccionales), carbohidratos y/o marcadores moleculares basados en glucolípidos.

Un anticuerpo "de bloqueo" o un anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Los anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas preferidos inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por crecimiento/proliferación celular no regulados. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma (por ejemplo, linfoma de Hodgkin y no Hodgkiniano), blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) (incluido el adenocarcinoma de pulmón y el carcinoma escamoso de pulmón), cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, leucemia y otros trastornos linfoproliferativos y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello. En realizaciones particulares, el cáncer es NSCLC. En algunas realizaciones, el NSCLC es adenocarcinoma de pulmón o carcinoma escamoso de pulmón. El NSCLC puede ser NSCLC escamoso o NSCLC no escamoso.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y CYTOXAN® ciclofosfamida; alquilsulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carbocuona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilmelaminas, incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bullatacinina y bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético de topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopoleticina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos, adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptofincinas (en particular, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimnustina; antibióticos, tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma γ 1 y caliqueamicina ω 1 (véase, por ejemplo, Nicolaou *et al.*, Angew. Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una

esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de cromoproteína enediina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfólico-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, cinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostano, testolactona; antisuprarrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevúlico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diacicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epitolina; etoglúcidio; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidaina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; molidamol; niraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidracida; procarbacina; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espriegermanio; ácido tenuazónico; triacuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazine; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, taxanos, incluyendo TAXOL® paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ sin cremophor, formulación de nanopartículas de paclitaxel diseñadas por ingeniería con albúmina (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois) y TAXOTERE® docetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptoperina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovorina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina (XELODA®); sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina y prednisolona y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxiplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina. Los agentes quimioterapéuticos adicionales incluyen los agentes citotóxicos útiles como conjugados de anticuerpo-fármaco, tales como maitansinoides (DM1, por ejemplo) y las auristatinas MMAE y MMAF, por ejemplo.

35 Los "agentes quimioterapéuticos" también incluyen "agentes antihormonales" o "agentes terapéuticos endocrinos" que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de las hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer y, con frecuencia, se presentan en forma de tratamiento sistémico o de todo el cuerpo. Pueden ser, en sí, hormonas. Los ejemplos incluyen antiestrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM, por sus siglas en inglés), que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno EVISTA®, droloxifeno, 4-hidroxiamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON®; anti-progesteronas; reguladores negativos del receptor de estrógenos (ERD); agentes que funcionan suprimiendo o anulando los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), tales como LUPRON® y ELIGARD®, acetato de leuprolida, acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterelina; otros antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestan, fadrozol, RIVISOR® vorozol, FEMARA® letrozol y ARIMIDEX® anastrozol. Asimismo, dicha definición de agentes quimioterapéuticos incluye bisfosfonatos, tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), DIDROCAL® etidronato, NE-58095, ZOMETA® ácido zoledrónico/zoledronato, FOSAMAX® alendronato, AREDIA® pamidronato, SKELID® tiludronato o ACTONEL® risedronato; así como troxacitabina (un análogo de nucleósido 1,3-dioxolano de citosina); oligonucleótidos antisentido, particularmente, los que inhiben la expresión de genes en vías de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR); vacunas, tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®, ABARELIX® rmRH; ditosilato de lapatinib (un inhibidor de molécula pequeña de tirosina cinasa dual de ErbB-2 y EGFR, también conocido como GW572016); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

60 El término anticuerpo "químérico" se refiere a un anticuerpo en el que una parte de la cadena ligera y/o pesada procede de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera procede de una fuente o especie diferente.

65 La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que tiene su cadena pesada. Hay cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden subdividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α, δ, ε, γ y μ,

respectivamente.

Por "correlacionar" o "correlación" se entiende comparar, de cualquier modo, el rendimiento y/o los resultados de un primer análisis o protocolo con el rendimiento y/o los resultados de un segundo análisis o protocolo. Por ejemplo, se

- 5 pueden usar los resultados de un primer análisis o protocolo para realizar un segundo protocolo y/o se pueden usar los resultados de un primer análisis o protocolo para determinar si se debería realizar un segundo análisis o protocolo. Con respecto a la realización del análisis o protocolo de polipéptidos, se pueden usar los resultados del análisis o protocolo de expresión de polipéptidos para determinar si ha de llevarse a cabo un régimen terapéutico específico. Con respecto a la realización del análisis o protocolo de polinucleótidos, se pueden usar los resultados del análisis o
- 10 protocolo de expresión de polinucleótidos para determinar si ha de llevarse a cabo un régimen terapéutico específico.

La expresión "agente citotóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o previene una función celular y/o provoca la muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, pero sin

- 15 limitación, isótopos radiactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radiactivos de Lu); agentes o fármacos quimioterapéuticos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de las mismas, tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas, tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de
- 20 origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas; y los diversos agentes antitumorales o anticancerosos divulgados a continuación.

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

25 El término "diagnóstico" se utiliza en el presente documento para referirse a la identificación o clasificación de un estado molecular o patológico, enfermedad o condición (por ejemplo, cáncer). Por ejemplo, "diagnóstico" puede referirse a la identificación de un tipo particular de cáncer. "Diagnóstico" también puede referirse a la clasificación de un subtipo particular de cáncer, por ejemplo, por criterios histopatológicos, o por características moleculares (p. ej., un subtipo caracterizado por la expresión de uno o una combinación de biomarcadores (p. ej., genes particulares o proteínas codificadas por dichos genes)).

- 30 30 Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento, incluyendo, pero sin limitación, trastornos o enfermedades agudos y crónicos, incluyendo aquellas patologías que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

- 35 35 Las "funciones efectoras" se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC, por sus siglas en inglés); unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC, por sus siglas en inglés); fagocitosis; regulación negativa de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

- 40 40 La expresión "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región carboxiterminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. La expresión incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. En una realización, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226 o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina del extremo C (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se especifique lo contrario en el presente documento, la numeración de los restos de aminoácidos en la región Fc o en la región constante es según el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, como se describe en Kabat *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

- 50 50 "Marco" o "FR" se refiere a restos de dominio variable distintos de restos de la región hipervariable (HVR). La región FR de un dominio variable consiste generalmente en cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR aparecen generalmente en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

- 55 55 Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo inalterado", y "anticuerpo completo" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo natural o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento.

- 60 60 Las expresiones "nivel de expresión" o "nivel en la expresión" en general se usan indistintamente y generalmente se refieren a la cantidad de un polinucleótido, ARNm, o un producto de aminoácido o proteína en una muestra biológica. "Expresión" generalmente se refiere al proceso mediante el cual la información codificada por genes se convierte en las estructuras presentes y operativas en la célula. Por lo tanto, según la invención, la "expresión" de un gen (por ejemplo, el gen PD-L1) puede referirse a la transcripción en un polinucleótido, traducción a una proteína, o incluso modificación postraduccional de la proteína. Los fragmentos del polinucleótido transcripto, la proteína traducida o la proteína modificada postraduccionalmente también se considerarán expresadas, bien si se originan a partir de un

- transcrito generado por corte y empalme alternativo o un transcrito degradado, o a partir de un procesamiento postraduccional de la proteína, por ejemplo, por proteólisis. En algunas realizaciones, "nivel de expresión" se refiere a la cantidad de una proteína (p. ej., PD-L1) en una muestra biológica determinada utilizando métodos conocidos en la técnica o descritos en el presente documento, incluyendo, pero sin limitación, inmunohistoquímica (IHC), inmunotransferencia (por ejemplo, transferencia Western), inmunofluorescencia (IF), citometría de flujo, por ejemplo, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS™) o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).
- 5 "Expresión aumentada", "aumento del nivel de expresión", "niveles aumentados", "expresión elevada", "niveles de expresión elevados", o "niveles elevados" se refiere a una expresión aumentada o niveles aumentados de un biomarcador en un individuo con respecto a un control, tal como un individuo o individuos que no padecen la enfermedad o el trastorno (p. ej., cáncer) o un control interno (p. ej., un biomarcador constitutivo).
- 10 "Expresión disminuida", "nivel de expresión disminuido" "niveles disminuidos", "expresión reducida", "niveles de expresión reducidos", o "niveles reducidos" se refiere a una expresión reducida o niveles reducidos de un biomarcador en un individuo con respecto a un control, tal como un individuo o individuos que no padecen la enfermedad o el trastorno (p. ej., cáncer) o un control interno (p. ej., un biomarcador constitutivo). En algunas realizaciones, expresión reducida es poca o ninguna expresión.
- 15 Las expresiones "célula hospedadora", "línea celular hospedadora", y "cultivo de células hospedadoras", se usan indistintamente y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células hospedadoras incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen a la célula primaria transformada y a la descendencia procedente de esta, independientemente del número de pasos. La descendencia puede no ser completamente idéntica en el contenido de ácidos nucleicos a una célula progenitora, sino que puede contener mutaciones. En el presente documento se incluye la descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica detectada sistemáticamente o seleccionada en la célula transformada originalmente.
- 20
- 25
- 30 Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o que procede de una fuente no humana, que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias codificantes de anticuerpo humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígeno no humanos.
- 35 Un "marco consenso humano" es un marco que representa los restos de aminoácidos más comunes en una selección de secuencias marco de VL o VH de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana procede de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest. quinta edición, NIH Publicación 91-3242, Bethesda MD, volúmenes. 1-3, 1991. En una realización, para la VL, el subgrupo es un subgrupo kappa I según Kabat *et al.*, *supra*. En una realización, para la VH, el subgrupo es un subgrupo III según Kabat *et al.*, *supra*.
- 40 Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende restos de aminoácido procedentes de HVR no humanas y restos de aminoácidos procedentes de FR humanas. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que la totalidad o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, las CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano y la totalidad o sustancialmente todas las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo procedente de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización.
- 45
- 50 La expresión "región hipervariable" o "HVR", como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en cuanto a su secuencia ("regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR") y/o de bucles estructuralmente definidos ("bucle hipervariables") y/o que contienen los restos de contacto con el antígeno ("contactos de antígeno"). Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVR: tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). Las HVR ilustrativas en el presente documento incluyen:
- 55
- (a) bucles hipervariables que aparecen en los restos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), y 96-101 (H3) (Chothia *et al.* J. Mol. Biol. 196: 901-917, 1987);
 (b) CDR que aparecen en los restos de aminoácido 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991);
 (c) contactos con el antígeno que tienen lugar en los restos de aminoácido 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) y 93-101 (H3) (MacCallum *et al.* J. Mol. Biol. 262: 732-745, 1996); y
 (d) combinaciones de (a), (b) y/o (c), incluyendo los restos de aminoácido de HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) y 94-102 (H3). A menos que se indique lo contrario, en el presente documento, los restos de HVR y otros restos del dominio variable (por ejemplo, restos de FR) se numeran según Kabat *et al.*, *supra*.
- 60
- 65

Una "disfunción inmunitaria" es un trastorno o afección que afecta al sistema inmunitario e incluye, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias y trastornos disfuncionales de linfocitos T.

- 5 Como se usa en el presente documento, el término "inmunoadhesina" designa moléculas similares a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es diferente del sitio de unión y reconocimiento de antígenos de un anticuerpo (es decir, es "heterólogo"), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina.
- 10 La parte adhesina de una molécula de inmunoadhesina es generalmente una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina puede obtenerse de cualquier inmunoglobulina, tales como los subtipos IgG1, IgG2 (incluidas IgG2A e IgG2B), IgG3 o IgG4, IgA (incluidas IgA1 e IgA2), IgE, IgD o IgM. Las fusiones de Ig incluyen preferentemente la sustitución de un dominio de un polipéptido o anticuerpo descrito en el presente documento en el lugar de al menos una región variable dentro de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulinas incluye las regiones bisagra, CH2 y CH3, o bisagra, CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulinas véase también la patente de los Estados Unidos n.º 5.428.130. Por ejemplo, las inmunoadhesinas útiles como medicamentos útiles para la terapia en el presente documento, incluyen polipéptidos que comprenden el dominio extracelular (ECD, por sus siglas en inglés) o las porciones de unión a PD-1 de PD-L1 o PD-L2, o las porciones extracelulares o de unión a PD-L1 o PD-L2 de PD-1, fusionados a un dominio constante de una secuencia de inmunoglobulina, tal como un ECD-Fc de PD-L1, un ECD-Fc de PD-L2 y un ECD-Fc de PD-1, respectivamente. Las combinaciones de inmunoadhesina de Fc de Ig y el ECD de receptores de superficie celular a veces se denominan receptores solubles.
- 15
- 20
- 25 Una "proteína de fusión" y un "polipéptido de fusión" se refieren a un polipéptido que tiene dos porciones unidas covalentemente entre sí, donde cada una de las porciones es un polipéptido que tiene una propiedad diferente. La propiedad puede ser una propiedad biológica, tal como actividad *in vitro* o *in vivo*. La propiedad también puede ser una propiedad química o física simple, tal como la unión a una molécula diana, catálisis de una reacción, y similares. Las dos porciones se pueden unir directamente mediante un enlace peptídico único o mediante un enlazador peptídico, pero están en marco de lectura entre sí.
- 30

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

- 35 Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha separado de un componente de su entorno natural. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica hasta una pureza mayor del 95 % o 99 % tal como se determina mediante, por ejemplo, medios electroforéticos (por ejemplo, SDS-PAGE, isoelectrofoque (IEF), electroforesis capilar) o cromatográficos (por ejemplo, intercambio iónico o HPLC en fase inversa). Para una revisión de los métodos para evaluar la pureza de los anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman *et al.* J. Chromatogr. B. 848: 79-87, 2007.
- 40
- 45 Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico incluido en células que normalmente contienen la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente extracromosómicamente o en una ubicación cromosómica que es diferente a su ubicación cromosómica natural.
- 50
- 55 "Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-PD-L1" se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos (o fragmentos de las mismas), incluyendo dicha una o más moléculas de ácido nucleico en un solo vector o en vectores separados y dicha una o más moléculas de ácido nucleico presentes en una o más ubicaciones de una célula hospedadora.
- 60 La palabra "marcador" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición que se conjuga o fusiona directa o indirectamente con un reactivo tal como una sonda polinucleotídica o un anticuerpo y facilita la detección del reactivo al que se conjuga o fusiona. El marcador puede ser detectable en sí mismo (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable. El término pretende abarcar el marcaje directo de una sonda o anticuerpo acoplando (es decir, uniendo físicamente) una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como el marcaje indirecto de la sonda o anticuerpo mediante reactividad con otro reactivo que está marcado de forma directa. Los ejemplos de marcaje indirecto incluyen detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente y marcaje terminal de una sonda de ADN con biotina, de tal forma que puede detectarse con estreptavidina marcada fluorescentemente.

- 65 La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítopo, salvo por posibles variantes de anticuerpo, por ejemplo, que contienen mutaciones de origen natural o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes dichas variantes generalmente en escasas cantidades. A diferencia de

- las preparaciones de anticuerpos policlonales, que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un solo determinante de un antígeno. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se ha obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiera la producción del anticuerpo por ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso según la presente invención pueden prepararse mediante una variedad de técnicas, incluyendo pero, sin limitación, el método de hibridoma, métodos de ADN recombinante, métodos de presentación en fagos y métodos que utilizan animales transgénicos que contienen la totalidad o parte de los locus de inmunoglobulinas humanas, o una combinación de los mismos.
- El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto de la secuencia de un polipéptido de referencia se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia del polipéptido de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. La alineación para fines de determinación del porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de diversas maneras que se encuentran dentro de las capacidades de la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos públicamente disponibles, tales como los programas BLAST, BLAST-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se estén comparando. A efectos del presente documento, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue programado por Genentech, Inc. y el código fuente, junto con la documentación para usuarios, se han depositado en la Oficina de Derechos de Autor de los Estados Unidos (U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559, donde está registrada con el n.º de registro de derechos de autor de los Estados Unidos TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California o puede compilarse a partir de su código fuente. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencia se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían.
- En las situaciones donde se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada para, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada (que puede citarse, como alternativa, como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos para, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula de la siguiente manera:
- $$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$
- donde X es el número de restos de aminoácidos valorados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación del programa de A y B y donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de A respecto de B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B respecto de A. A menos que se indique específicamente lo contrario, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2.
- La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que se encuentra en una forma tal que permite que sea eficaz la actividad biológica de un principio activo contenido en la misma y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación.
- Un "transportador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente incluido en una formulación farmacéutica, distinto del principio activo, que no es tóxico para un sujeto. Un transportador farmacéuticamente aceptable incluye, pero sin limitación, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.
- Las expresiones "ligando 1 de muerte celular programada 1", "PD-L1", "ligando 1 de muerte programada", "grupo de diferenciación 274", "CD274", o "homólogo 1 de B7", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier PD-L1 natural de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La expresión abarca PD-L1 sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de PD-L1 que sea el resultado de su procesamiento en la célula. PD-L1 puede existir como proteína transmembrana o como proteína soluble. La expresión también abarca variantes de origen natural de PD-L1, por ejemplo, variantes de corte y empalme o variantes aleáticas. La estructura básica de PD-L1 comprende 4 dominios: dominios extracelulares de tipo V similar a Ig y de tipo C2 similar a Ig, un dominio transmembrana y un dominio citoplásico. Se puede encontrar información adicional sobre el gen PD-L1 humano, incluyendo la secuencia de ADN genómico, con el número de ID del gen de NCBI 29126. Se puede encontrar información adicional sobre el gen PD-L1 de ratón, incluyendo la secuencia de ADN genómico, con el número de ID del gen de NCBI 60533. La secuencia de aminoácidos de una proteína PD-L1 humana de longitud completa ilustrativa se muestra en el SEQ ID NO: 18. La secuencia de aminoácidos de una proteína PD-L1 humana de longitud completa

ilustrativa se puede encontrar, por ejemplo, con el número de registro de NCBI NP_001254653 o el número de registro de UniProt Q9NZQ7, mientras que la secuencia de proteína PD-L1 de ratón ilustrativa de longitud completa se puede encontrar, por ejemplo, con el número de registro de NCBI NP_068693 o el número de registro de UniProt Q9EP73.

- 5 La expresión "antagonista de unión al eje de PD-1" se refiere a una molécula que inhibe la interacción de un compañero de unión del eje de PD-1 con uno o más de sus compañeros de unión, a fin de eliminar la disfunción de linfocitos T resultante de la señalización en el eje de señalización de PD-1, siendo un resultado la restauración o potenciación de la función de linfocitos T (por ejemplo, proliferación, producción de citocinas y/o destrucción de células diana). Como se usa en el presente documento, un antagonista de unión al eje de PD-1 incluye un antagonista de unión a PD-1, un antagonista de unión a PD-L1 y un antagonista de unión a PD-L2.

Como se usa en el presente documento, un "antagonista de unión a PD-L1" es una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, suprime o interfiere con la transducción de señales resultantes de la interacción de PD-L1 con uno o más de sus compañeros de unión, tal como PD-1 y/o B7-1. Un antagonista de unión a PD-L1 es una molécula que inhibe la unión de PD-L1 a sus compañeros de unión. En un caso específico, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1 y/o B7-1. Los antagonistas de unión a PD-L1 pueden incluir anticuerpos anti-PD-L1 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopeptidos, antagonistas de molécula pequeña, antagonistas de polinucleótidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, suprime o interfiere con la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L1 con uno o más de sus compañeros de unión, tal como PD-1 y/o B7-1. Un antagonista de la unión a PD-L1 puede reducir la señal negativa mediada por o a través de las proteínas de la superficie celular expresadas en los linfocitos T y otras células, mediada por la señalización a través de PD-L1 o PD-1 para hacer que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional. Un antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1. En un caso específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es YW243.55.S70. En otro caso específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MDX-1105. En otro caso específico más, un anticuerpo anti-PD-L1 es MPDL3280A (atezolizumab). En otro caso específico más, un anticuerpo anti-PD-L1 es MSB0010718C (avelumab). MDX-1105, también conocido como BMS-936559, es un anticuerpo anti-PD-L1 descrito en el documento WO2007/005874. El anticuerpo YW243.55.S70 es un anticuerpo anti-PD-L1 descrito en los documentos WO 2010/077634 y US 8.217.149.

30 Como se usa en el presente documento, un "antagonista de unión a PD-1" es una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, suprime o interfiere con la transducción de señales resultante de la interacción de PD-1 con uno o más de sus compañeros de unión, tal como PD-L1 y/o PD-L2. El antagonista de unión a PD-1 puede ser una molécula que inhibe la unión de PD-1 a sus compañeros de unión. En un caso específico, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L1 y/o PD-L2. Por ejemplo, los antagonistas de unión a PD-1 incluyen anticuerpos anti-PD-1 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopeptidos, antagonistas de molécula pequeña, antagonistas de polinucleótidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, suprime o interfiere con la transducción de señales resultante de la interacción de PD-1 con PD-L1 y/o PD-L2. Un antagonista de la unión a PD-1 puede reducir la señal negativa mediada por o a través de las proteínas de la superficie celular expresadas en los linfocitos T y otras células, mediada por la señalización a través de PD-1 o PD-L1 para hacer que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional. El antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1. En un caso específico, un antagonista de unión a PD-1 es MDX-1106 (nivolumab). En otro caso específico, un antagonista de unión a PD-1 es MK-3475 (pembrolizumab). En otro caso específico, un antagonista de unión a PD-1 es MEDI-0680 (AMP-514). En otro caso específico, un antagonista de unión a PD-1 es PDR001. En otro caso específico, un antagonista de unión a PD-1 es REGN2810. En otro caso específico, un antagonista de unión a PD-1 es BGB-108. En otro caso específico, un antagonista de unión a PD-1 es AMP-224. MDX-1106, también conocido como MDX-1106-04, ONO-4538, BMS-936558, o nivolumab, es un anticuerpo anti-PD-1 descrito en el documento WO2006/121168. AMP-224, también conocido como B7-DC Ig, es un receptor soluble de fusión PD-L2-Fc descrito en los documentos WO2010/027827 y WO2011/066342.

50 Una "muestra de referencia", "célula de referencia", "tejido de referencia", "muestra de control", "célula de control", o "tejido de control", como se usa en el presente documento, se refiere a una muestra, célula, tejido, patrón o nivel que se usa con una finalidad comparativa. En una realización, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control se obtiene de una parte sana y/o no enferma del organismo (por ejemplo, tejido o células) del mismo sujeto o individuo. Por ejemplo, la muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control puede ser células o tejido sano y/o no enfermo adyacente a las células o el tejido enfermos (por ejemplo, células o tejido adyacentes a un tumor). En otra realización, una muestra de referencia se obtiene de un tejido y/o célula no tratada del organismo del mismo sujeto o individuo. En otra realización más, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control se obtiene de una parte sana y/o no enferma del organismo (por ejemplo, tejidos o células) de un individuo que no es el sujeto o individuo. En otra realización adicional más, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control se obtiene de un tejido y/o célula no tratados del cuerpo de un individuo que no es el sujeto o individuo.

65 La "respuesta individual" o "respuesta" puede evaluarse utilizando cualquier criterio de valoración que indique un beneficio para el individuo, que incluye, sin limitación, (1) inhibición, hasta cierto punto, de la progresión de la enfermedad (por ejemplo, progresión del cáncer), incluyendo su ralentización y detención completa; (2) una reducción

- en el tamaño tumoral; (3) inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención completa) de la infiltración de células cancerosas en órganos y/o tejidos periféricos adyacentes; (4) inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención completa) de la metástasis; (5) alivio, hasta cierto punto, de uno o más síntomas asociados con la enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer); (6) aumento o extensión de la duración de la supervivencia, incluyendo la supervivencia general y la supervivencia sin progresión; y/o (9) mortalidad reducida en cualquier punto de tiempo dado después del tratamiento.
- Una "respuesta eficaz" de un paciente o la "capacidad de respuesta" de un paciente al tratamiento con un medicamento y una redacción similar se refiere al beneficio clínico o terapéutico impartido a un paciente en riesgo o que padece, una enfermedad o trastorno, tal como cáncer. En una realización, dicho beneficio incluye uno o más de: ampliar la supervivencia (incluyendo la supervivencia general y la supervivencia sin progresión); que da como resultado una respuesta objetiva (incluyendo una respuesta completa o una respuesta parcial); o mejorar los signos o síntomas del cáncer. En una realización, el biomarcador (p. ej., expresión de PD-L1, por ejemplo, como se determina utilizando IHC) se usa para identificar al paciente que se prevé que tendrá una mayor probabilidad de responder al tratamiento con un medicamento (por ejemplo, tratamiento que comprende una terapia contra el cáncer), con respecto a un paciente que no expresa el biomarcador. En una realización, el biomarcador (p. ej., expresión de PD-L1, por ejemplo, como se determina utilizando IHC) se utiliza para identificar al paciente que se prevé que tendrá una mayor probabilidad de responder al tratamiento con un medicamento (por ejemplo, una terapia contra el cáncer), con respecto a un paciente que no expresa el biomarcador al mismo nivel. En una realización, la presencia del biomarcador se utiliza para identificar a un paciente que tiene más probabilidades de responder al tratamiento con un medicamento, con respecto a un paciente que no tiene la presencia del biomarcador. En otra realización, la presencia del biomarcador se usa para determinar que un paciente tendrá una mayor probabilidad de beneficiarse del tratamiento con un medicamento, con respecto a un paciente que no tiene la presencia del biomarcador.
- Una "respuesta objetiva" se refiere a una respuesta medible, incluyendo la respuesta completa (CR, por sus siglas en inglés) o la respuesta parcial (PR, por sus siglas en inglés). En algunas realizaciones, la "tasa de respuesta objetiva (ORR, por sus siglas en inglés)" se refiere a la suma de la tasa de respuesta completa (CR) y la tasa de respuesta parcial (PR).
- Por "respuesta completa" o "CR" se hace referencia a la desaparición de todos los signos de cáncer (por ejemplo, desaparición de todas las lesiones diana) en respuesta al tratamiento. Esto no siempre significa que el cáncer se haya curado.
- "Respuesta sostenida" se refiere al efecto sostenido en la reducción del crecimiento tumoral tras interrumpir un tratamiento. Por ejemplo, el tamaño del tumor puede permanecer igual o menor en comparación con el tamaño al comienzo de la fase de administración. En algunas realizaciones, la respuesta sostenida tiene una duración al menos igual a la duración del tratamiento, al menos 1,5X, 2,0X, 2,5x o 3,0x la longitud de la duración del tratamiento o mayor.
- Como se usa en el presente documento, "reducir o inhibir la recidiva del cáncer" significa reducir o inhibir la recidiva tumoral o del cáncer o la progresión tumoral o del cáncer. Como se divulga en el presente documento, la recidiva del cáncer y/o la progresión del cáncer incluyen, sin limitación, metástasis del cáncer.
- Como se usa en el presente documento, "respuesta parcial" o "PR" se refiere a una reducción en el tamaño de uno o más tumores o lesiones o en el alcance del cáncer en el organismo, en respuesta al tratamiento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la PR se refiere a una reducción de al menos el 30 % en la suma de los diámetros mayores (SLD, por sus siglas en inglés) de las lesiones diana, tomando como referencia la SLD iniciales.
- Como se usa en el presente documento, "enfermedad estable" o "SD, por sus siglas en inglés" se refiere a una reducción no suficiente de las lesiones diana para calificarla de PR, aumento no suficiente para calificarlo de PD, tomando como referencia la SLD más pequeña desde el inicio del tratamiento.
- Como se usa en el presente documento, "enfermedad progresiva" o "PD" se refiere a al menos un aumento del 20 % en la SLD de las lesiones diana, tomando como referencia la SLD más pequeña registrada desde el inicio del tratamiento o la presencia de una o más lesiones nuevas.
- El término "supervivencia" se refiere a que el paciente siga vivo e incluye la supervivencia general, así como la supervivencia sin progresión.
- Como se usa en el presente documento, "supervivencia sin progresión" (PFS, por sus siglas en inglés) se refiere al espacio de tiempo durante y después del tratamiento durante el cual no empeora la enfermedad que se está tratando (por ejemplo, el cáncer). La supervivencia sin progresión puede incluir la cantidad de tiempo en la que los pacientes hayan experimentado una respuesta completa o una respuesta parcial, así como la cantidad de tiempo en la que los pacientes han experimentado enfermedad estable.
- Como se usa en el presente documento, "supervivencia general" (OS, por sus siglas en inglés) se refiere al porcentaje de individuos en un grupo que es probable que sigan vivos después de un espacio de tiempo particular.

Por "extender la supervivencia" se entiende aumentar la supervivencia general o sin progresión en un paciente tratado con respecto a un paciente no tratado (es decir, con respecto a un paciente no tratado con el medicamento) o con respecto a un paciente que no expresa un biomarcador al nivel indicado y/o con respecto a un paciente tratado con un agente antitumoral.

5 A efectos del presente documento, una "sección" de una muestra de tejido significa una sola parte o trozo de una muestra de tejido, por ejemplo, una fina sección de tejido o células cortada de una muestra de tejido (por ejemplo, una muestra tumoral). Ha de entenderse que pueden tomarse y someterse a análisis múltiples secciones de muestras de tejido, entendiéndose que puede analizarse la misma sección de tejido a nivel tanto morfológico como molecular o analizarse con respecto a polipéptidos (por ejemplo, mediante inmunohistoquímica) y/o polinucleótidos (por ejemplo, mediante hibridación *in situ*).

10 Como se usa en el presente documento, la expresión "se une específicamente a" o es "específico para" se refiere a interacciones medibles y reproducibles, tales como la unión entre un diana y un anticuerpo, que es determinante de la presencia de la diana en presencia de una población heterogénea de moléculas que incluyen moléculas biológicas. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a una diana (que puede ser un epítopo, por ejemplo, restos de aminoácidos 279-290 de PD-L1 humano (SEQ ID NO: 1)) es un anticuerpo que se une a esta diana con mayor afinidad, avidez, más fácilmente, y/o con mayor duración que con la que se une a otras dianas. En una realización, el grado de unión de un anticuerpo a una diana no relacionada es menor de aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo a la diana según se mide, por ejemplo, mediante radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés). En determinadas realizaciones, un anticuerpo que se une específicamente a una diana tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{nM}$, $\leq 10 \text{nM}$, $\leq 1 \text{nM}$ o $\leq 0,1 \text{nM}$. En determinadas realizaciones, un anticuerpo se une específicamente a un epítopo en una proteína que se conserva entre la proteína de diferentes especies. En otra realización, se puede incluir la unión específica, pero no requiere unión exclusiva.

15 Un "sujeto" o un "individuo" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En determinadas realizaciones, el individuo o sujeto es un ser humano.

20 La expresión "sustancialmente el mismo", como se usa en el presente documento, indica un grado suficientemente alto de similitud entre dos valores numéricos, de tal manera que un experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores tiene poca o ninguna significación biológica y/o estadística en el contexto de la característica biológica medida por dichos valores (p. ej., valores o niveles de expresión de K_d). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, menos de aproximadamente un 50 %, menos de aproximadamente un 40 %, menos de aproximadamente un 30 %, menos de aproximadamente un 20 % y/o menos de aproximadamente un 10 %, en función del valor de referencia/comparación.

25 30 35 40 45 La expresión "sustancialmente diferente", como se usa en el presente documento, indica un grado de similitud suficientemente elevado entre dos valores numéricos, de manera que un experto en la materia podría considerar que la diferencia entre los dos valores tiene una significación estadística en el contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores o niveles de expresión de K_d). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, mayor que aproximadamente un 10 %, mayor que aproximadamente un 20 %, mayor que aproximadamente un 30 %, mayor que aproximadamente un 40 % y/o mayor que aproximadamente un 50 %, en función del valor de la molécula de referencia/comparación.

50 55 60 Un "trastorno disfuncional de linfocitos T" es un trastorno o afección de los linfocitos T caracterizado por una mayor o menor capacidad de respuesta a la estimulación antigénica. En una realización particular, un trastorno disfuncional de linfocitos T es un trastorno que se asocia específicamente con un aumento inadecuado de la señalización a través de PD-1/PD-L1 y/o PD-L1/B7.1. En otra realización, un trastorno disfuncional de linfocitos T es aquel en el que los linfocitos T son anérgicos o tienen una capacidad reducida para secretar citocinas, proliferar o ejecutar actividad citolítica. En otra realización, una disfunción de los linfocitos T es aquella en la que el agotamiento de los linfocitos T surge de la señalización de TCR sostenida que se produce durante muchas infecciones crónicas y cáncer. Se distingue de la anergia en que no surge de una señalización incompleta o deficiente, sino de una señalización sostenida. Se define por una función efectora deficiente, expresión sostenida de receptores inhibidores y un estado transcripcional distinto del de los linfocitos T efectores o de memoria funcionales. El agotamiento impide un control óptimo de las infecciones y los tumores. El agotamiento puede deberse tanto a vías reguladoras negativas extrínsecas (por ejemplo, citocinas inmunorreguladoras) como a vías reguladoras negativas intrínsecas (coestimuladoras) (PD-1, B7-H3, B7-H4, etc.). En un aspecto específico, la disminución de la capacidad de respuesta puede dar como resultado un control ineficaz de un patógeno o tumor que expresa un inmunógeno. Ejemplos de trastornos disfuncionales de linfocitos T caracterizados por disfunción de linfocitos T incluyen infección aguda no resuelta, infección crónica e inmunidad tumoral.

65 Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y sus variaciones gramaticales, tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo que se esté tratando y

- 5 puede realizarse tanto para la profilaxis como durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero sin limitación, prevenir la aparición o recidiva de la enfermedad, aliviar los síntomas, disminuir cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevenir la metástasis, disminuir la velocidad de progresión de la enfermedad, mejorar o paliar la patología y remisión o pronóstico mejorado. Los anticuerpos (p. ej., anticuerpos anti-PD-1 y/o anticuerpos anti-PD-L1) pueden usarse para retrasar la aparición de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad. Dicho uso no se reclama como tal.
- 10 El término "tumor", como se usa en el presente documento, se refiere a todo el crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sean malignas o benignas, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos "cáncer", "canceroso", y "tumor" no son mutuamente excluyentes como se hace referencia en el presente documento.
- 15 Una "célula inmunitaria infiltrante de tumores", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier célula inmunitaria presente en un tumor o una muestra del mismo. Las células inmunitarias infiltrantes de tumores incluyen, pero sin limitación, células inmunitarias intratumorales, células inmunitarias peritumorales, otras células del estroma tumorales (por ejemplo, fibroblastos), o cualquier combinación de las mismas. Tales células inmunitarias infiltrantes de tumores pueden ser, por ejemplo, linfocitos T (tal como linfocitos T CD8+ y/o linfocitos T CD4+), linfocitos B u otras células del linaje de la médula ósea, incluyendo granulocitos (por ejemplo, neutrófilos, eosinófilos y basófilos), monocitos, macrófagos, células dendríticas (p. ej., células dendríticas interdigitantes, histiocitos y linfocitos citolíticos naturales.
- 20 Una "célula tumoral" como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier célula tumoral presente en un tumor o una muestra del mismo. Las células tumorales se pueden distinguir de otras células que pueden estar presentes en una muestra tumoral, por ejemplo, células del estroma y células inmunitarias infiltrantes de tumores, utilizando métodos conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento.
- 25 "Inmunidad tumoral" se refiere al proceso en el que los tumores evaden el reconocimiento y la eliminación inmunitarios. Por tanto, como concepto terapéutico, la inmunidad tumoral se "trata" cuando dicha evasión se atenúa y los tumores son reconocidos y atacados por el sistema inmunitario. Los ejemplos de reconocimiento de tumores incluyen unión tumoral, reducción tumoral y eliminación tumoral.
- 30 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un agente terapéutico para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso de los cánceres, la cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor primario; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. En la medida en que el fármaco puede evitar el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia del cáncer, la eficacia *in vivo* puede, por ejemplo, medirse evaluando la duración de la supervivencia, el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP, por sus siglas en inglés), las tasas de respuesta (por ejemplo, CR y PR), la duración de la respuesta y/o la calidad de vida.
- 35 La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicada en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de cadena pesada y cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural tienen generalmente estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones marco (FR) y tres regiones hipervariables (HVR). Véase, por ejemplo, Kindt *et al.* Kuby Immunology. 6^a ed., página 91, W.H. Freeman y Co., 2007. Un solo dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Asimismo, los anticuerpos que se unen a un antígeno en particular se pueden aislar utilizando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para explorar una biblioteca de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano *et al.* J. Immunol. 150: 880-887, 1993 y Clarkson *et al.* Nature. 352: 624-628, 1991.
- 40 La expresión "numeración de restos de dominio variable como en Kabat" o "numeración de posición de aminoácidos como en Kabat", y variaciones de la misma, se refiere al sistema de numeración usado para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, *supra*.
- 45 Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento o inserción en, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una única inserción de aminoácido (resto 52a según Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo, restos 82a, 82b y 82c, etc. según Kabat) después del resto 82 de la FR de cadena pesada. La numeración de Kabat de los restos puede determinarse para un anticuerpo dado por alineación en las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "patrón".
- 50 El sistema de numeración de Kabat se usa generalmente cuando se hace referencia a un resto en el dominio variable (aproximadamente los restos 1-107 de la cadena ligera y los restos 1-113 de la cadena pesada (por ejemplo, Kabat *et al.*, Sequences of Immunological Interest. 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). El "sistema de numeración EU" o "índice EU" se usa generalmente cuando se hace referencia a un resto en

una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU indicado en Kabat *et al., supra*). El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de restos del anticuerpo EU de IgG1 humana.

- 5 El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al que está unido. El término incluye el vector en forma de una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula hospedadora en la que se ha introducido. Determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los que están operativamente unidos. Dichos vectores se citan en el presente documento como "vectores de expresión".
- 10 Un "agente inhibidor del crecimiento", cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento y/o la proliferación de una célula (por ejemplo, una célula cuyo crecimiento depende de expresión de PD-L1) ya sea *in vitro* o *in vivo*. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduzca significativamente el porcentaje de células en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un punto distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la detención en G1 y la detención en la fase M. Los bloqueadores de la fase M clásicos incluyen los agentes de la vinca (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de topoisomerasa II, tales como el antibiótico de antraciclina, doxorubicina ((8S-cis)-10-[[(3-amino-2,3,6-tridesoxi- α -L-lico-hexapiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetyl)-1-metoxi-5,12-naftacenodiona), epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Aquellos agentes que detienen la fase G1 también se pasan a la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazine, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse información adicional en "The Molecular Basis of Cancer", Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami *et al.* (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente la página 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticancerosos ambos derivados del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), procedente 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 los microtúbulos impidiendo su despolimerización, lo que da como resultado la inhibición de la mitosis en las células.
- 15 30 Por "radioterapia" se entiende el uso de rayos gamma o rayos beta dirigidos para inducir un daño suficiente a una célula a fin de limitar su capacidad para funcionar normalmente o para destruir por completo la célula. Se apreciará que habrá muchas formas conocidas en la técnica para determinar la dosis y la duración del tratamiento. Los tratamientos típicos se administran como una administración única y las dosis típicas varían de 10 a 200 unidades (gray) al día.
- 35 40 Como se usa en el presente documento, los términos "paciente" o "sujeto" se usan indistintamente y se refieren a un solo animal, más preferentemente un mamífero (incluyendo animales no humanos, tales como, por ejemplo, perros, gatos, caballos, conejos, animales de zoo, vacas, cerdos, ovejas y primates no humanos) para los que se desea el tratamiento. En realizaciones particulares, el paciente en el presente documento es un ser humano.
- 45 50 Como se usa en el presente documento, "administrar" se refiere a un método para proporcionar una dosis de un compuesto (por ejemplo, un agente terapéutico contra el cáncer) o una composición farmacéutica (por ejemplo, una composición farmacéutica que incluye un agente terapéutico contra el cáncer) a un sujeto (por ejemplo, un paciente). La administración puede ser por cualquier medio adecuado, incluyendo parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para un tratamiento local, administración intralesional. Las infusions parenterales incluyen, por ejemplo, administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. Se contemplan en el presente documento varias pautas posológicas que incluyen, pero sin limitación administraciones individuales o múltiples a lo largo de varios puntos de tiempo, administración embolada e infusión pulsada.
- 55 55 El término "concurrentemente" se utiliza en el presente documento para hacer referencia a la administración de dos o más agentes terapéuticos, donde al menos parte de la administración se solapa en el tiempo. En consecuencia, la administración concurrente incluye una pauta posológica en la que la administración de uno o más agentes continúa después de interrumpir la administración de uno o más agentes distintos.

II. Composiciones y procedimientos

- La invención proporciona nuevos anticuerpos que se unen a PD-L1 como se establece en las reivindicaciones. Los anticuerpos de la invención son útiles, por ejemplo, para detectar la presencia de PD-L1 o el nivel de expresión de PD-L1 (por ejemplo, en muestras biológicas, incluyendo muestras tumorales). Los métodos y usos del anticuerpo reivindicado se establecen en las reivindicaciones.

A. Anticuerpos anti-PD-L1 ilustrativos

- 65 La invención proporciona anticuerpos anti-PD-L1 útiles para, por ejemplo, aplicaciones de diagnóstico (por ejemplo, inmunohistoquímica (IHC), inmunofluorescencia (IF) e inmunotransferencia (por ejemplo, transferencia Western)). En

- un ejemplo, la invención proporciona anticuerpos anti-PD-L1 que se unen a un epítopo que incluye los restos de aminoácidos 279-290 de PD-L1 (por ejemplo, los restos de aminoácidos 279-290 de PD-L1 humana SKKQSDTHLEET (SEQ ID NO: 1)), que es parte de la región citoplasmática aminoterinal de PD-L1 humana. El epítopo en PD-L1 puede reconocerse de una manera que sea dependiente de la conformación o independiente de la conformación.
- 5 Los anticuerpos anti-PD-L1 establecidos en las reivindicaciones que se unen a los restos de aminoácidos 279-290 de PD-L1 incluyen (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 3; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 4; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 10; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 11.
- 10 En algunos casos, los anticuerpos anti-PD-L1 incluyen además las siguientes regiones marco (FR) de dominio variable de cadena pesada: (a) FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QSLEESGGRLVKPDETLTITCTVSGIDLS (SEQ ID NO: 5); (b) FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGEGLEWIG (SEQ ID NO: 6); (c) FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RLTISKPSSTKVDLKITSPTTEDTATYFCGR (SEQ ID NO: 7); o (d) FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGPGTLTVTSS (SEQ ID NO: 8). En algunos casos, los anticuerpos anti-PD-L1 incluyen además las siguientes regiones marco (FR) de dominio variable de cadena pesada: (a) FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QSLEESGGRLVKPDETLTITCTVSGIDLS (SEQ ID NO: 5); (b) FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGEGLEWIG (SEQ ID NO: 6); (c) FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RLTISKPSSTKVDLKITSPTTEDTATYFCGR (SEQ ID NO: 7); y (d) FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGPGTLTVTSS (SEQ ID NO: 8).
- 15 20 En algunos casos, estos anticuerpos anti-PD-L1 incluyen las siguientes FR: (a) FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QSLEESGGRLVKPDETLTITCTVSGIDLS (SEQ ID NO: 5); (b) FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGEGLEWIG (SEQ ID NO: 6); (c) FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RLTISKPSSTKVDLKITSPTTEDTATYFCGR (SEQ ID NO: 7); y (d) FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGPGTLTVTSS (SEQ ID NO: 8) y adicionalmente o como alternativa, puede incluir (e) FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de AIVMTQTPSPVSAAVGGTVTINC (SEQ ID NO: 12); (f) FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WFQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO: 13); (g) FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFKGSQGTQFTLTISGVQCDDAATYYC (SEQ ID NO: 14); y (h) FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGGGTEWVR (SEQ ID NO: 15).
- 25 30 En algunos casos, los anticuerpos anti-PD-L1 que se unen a los restos de aminoácidos 279-290 de PD-L1 también pueden incluir una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos un 95 % (por ejemplo, al menos un 96 %, 97 %, 98 %, o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 16. En determinadas realizaciones, una secuencia VH que tiene al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad, contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservativas), inserciones o eliminaciones 35 40 con respecto a la secuencia de referencia (SEQ ID NO: 16), pero un anticuerpo anti-PD-L1 que incluye esa secuencia conserva la capacidad de unirse a PD-L1. En determinadas realizaciones, se ha sustituido, insertado o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos) del SEQ ID NO: 16. En determinadas realizaciones, las sustituciones, inserciones o eliminaciones se producen fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, los anticuerpos anti-PD-L1 incluyen la secuencia VH en el SEQ ID NO: 16, incluyendo modificaciones 45 posteriores a la traducción de esta secuencia. En una realización particular, el VH comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 3.y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 4.
- 50 En algunos casos, los anticuerpos anti-PD-L1 que se unen a los restos de aminoácidos 279-290 de PD-L1 también pueden incluir un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos un 95 % (por ejemplo, al menos un 96 %, 97 %, 98 %, o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 17. En determinadas realizaciones, una secuencia VL que tiene al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad, contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservativas), inserciones o eliminaciones con respecto 55 60 a la secuencia de referencia (SEQ ID NO: 17), pero un anticuerpo anti-PD-L1 que incluye esa secuencia conserva la capacidad de unirse a PD-L1. En determinadas realizaciones, se ha sustituido, insertado o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos) del SEQ ID NO: 17. En determinadas realizaciones, las sustituciones, inserciones o eliminaciones se producen fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-PD-L1 comprende la secuencia VL del SEQ ID NO: 17, incluyendo modificaciones posteriores a la traducción de esta secuencia. En una realización particular, el VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de (a) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 9; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 10; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 11.
- 65 En algunos casos, los anticuerpos anti-PD-L1 que se unen a los restos de aminoácidos 279-290 de PD-L1 incluyen tanto secuencias VH como VL que tienen al menos un 95 % (por ejemplo, al menos un 96 %, 97 %, 98 %, o 99 %) de

identidad de secuencia con, o las secuencias de, las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 16 y 17, respectivamente, y pueden o no incluir modificaciones posteriores a la traducción de esas secuencias.

- La invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente PD-L1, en donde los anticuerpos comprenden (i) (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 3; (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 4; (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QASESVYSNNYLS (SEQ ID NO: 9); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de LASTLAS (SEQ ID NO: 10); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de IGGKSSSTDGNA (SEQ ID NO: 11). En algunos casos, estos anticuerpos anti-PD-L1 incluyen las siguientes FR: (a) FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QSLEESGGRLVKPDETLTITCTVSGIDLS (SEQ ID NO: 5); (b) FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGEGLEWIG (SEQ ID NO: 6); (c) FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RLTISKPSSTKVDLKITSPTTEDTATYFCGR (SEQ ID NO: 7); y (d) FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGPGTLTVSS (SEQ ID NO: 8) y adicionalmente o como alternativa, puede incluir (e) FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de AIVMTQTTPSPVSAAVGGTVTINC (SEQ ID NO: 12); (f) FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WFQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO: 13); (g) FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFKGSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYC (SEQ ID NO: 14); y (h) FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGGGTEVWR (SEQ ID NO: 15). En algunas realizaciones, por ejemplo, los anticuerpos anti-PD-L1 incluyen tanto una secuencia VH como una VL que incluyen las secuencias de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 16 y 17, respectivamente, y pueden o no incluir modificaciones posteriores a la traducción.

Por ejemplo, la invención proporciona anticuerpos anti-PD-L1, tal como el anticuerpo anti-PD-L1 SP142, con las siguientes secuencias de región variable de cadena pesada y ligera.

- La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de SP142 es la siguiente:

QSLEESGGRLVKPDETLTITCTVSGIDLS <u>NGLT</u> WVRQAPGEGLEWIG <u>TINK</u> DASAYYASWAKGRLTISKP	HVR-H1	HVR-H2
SSTKVDLKITSPTTEDTATYFCGRI <u>AFKTGTSI</u> WGPGTLTVSS (SEQ ID NO: 16).		
HVR-H3		

- La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de SP142 es la siguiente:

AIVMTQTTPSPVSAAVGGTVTINC <u>QASESVYSNNYLS</u> WFQQKPGQPPKLLIY <u>LASTLAS</u> GVPSRFKGSGSG	HVR-L1	HVR-L2
TQFTLTISGVQCDDAATYYC <u>IGGKSSSTDGNA</u> FGGGTEVVVR (SEQ ID NO: 17).		
HVR-L3		

- También se proporcionan anticuerpos anti-PD-L1 que compiten por la unión a PD-L1 con uno cualquiera o más de los anticuerpos anti-PD-L1 descritos anteriormente y anticuerpos anti-PD-L1 que se unen al mismo epítopo o sustancialmente al mismo epítopo que uno cualquiera o más de los anticuerpos anti-PD-L1 descritos anteriormente.

- En algunos casos, un anticuerpo anti-PD-L1 según cualquiera de las realizaciones anteriores es un anticuerpo monoclonal, que comprende un anticuerpo químico, humanizado o humano. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o F(ab')₂. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo IgG inalterado (p. ej., un anticuerpo IgG1 inalterado) u otra clase o isotipo de anticuerpo como se define en el presente documento.

- Debe entenderse que los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención, aunque son útiles para la detección de la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra biológica como se exemplifica en los ejemplos a continuación, también pueden usarse o adaptarse para uso terapéutico.

- En aspectos adicionales, los anticuerpos anti-PD-L1 según cualquiera de las realizaciones anteriores puede incorporar cualquiera de las características, por separado o en combinación, como se describe en las secciones 1-5 a continuación.

1. Afinidad del anticuerpo

Un anticuerpo proporcionado en el presente documento tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{nM}$, $\leq 10 \text{nM}$, $\leq 1 \text{nM}$, $\leq 0,1 \text{nM}$, $\leq 0,01 \text{nM}$ o $\leq 0,001 \text{nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menor, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

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

Según otro ejemplo, la K_d se mide utilizando ensayos de resonancia de plasmón superficial utilizando un BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 de antígeno inmovilizados en ~ 10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, los chips biosensores de dextrano carboximetilados (CM5, BIACORE, Inc.) se activan con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del proveedor. Se diluye el antígeno con acetato de sodio 10 mM , pH 4,8, hasta $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ (-0,2 μM) antes de la inyección a un caudal de $5 \mu\text{l}/\text{minuto}$ para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para las mediciones de cinética, se inyectan diluciones seriadas de factor dos de Fab ($0,78 \text{ nM}$ a 500 nM) en PBS con tensioactivo de polisorbato 20 al 0,05 % (TWEEN-20™) (PBST) a 25°C a un caudal de aproximadamente $25 \mu\text{l}/\text{min}$. Las velocidades de asociación (k_{on}) y las velocidades de disociación (k_{off}) se calculan usando un modelo de unión de Langmuir de uno a uno (BIACORE® Evaluation Software, versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calcula como la relación k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, Chen *et al.* J. Mol. Biol. 293: 865-881, 1999. Si la velocidad de asociación supera $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, la velocidad de asociación puede determinarse usando una técnica de inactivación fluorescente que mide el aumento o la reducción de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm ; emisión = 340 nm , paso de banda de 16 nm) a 25°C de un anticuerpo (forma Fab) contra antígeno 20 nM en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno determinadas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con retención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

2. Fragmentos de anticuerpo

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv y scFv y otros fragmentos descritos a continuación. Para una revisión de algunos fragmentos de anticuerpo, véase Hudson *et al.* Nat. Med. 9: 129-134, 2003. Para una revisión de fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Pluckthun. The Pharmacology of Monoclonal Antibodies. vol. 113, págs. 269-315, Rosenburg and Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, 1994; véase también el documento WO 93/16185; y las patentes de los Estados Unidos números 5.571.894 y 5.587.458. Para un análisis de los fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden restos de epítopo de unión a receptor de rescate y que tienen semivida *in vivo* aumentada, véase la patente de los Estados Unidos n.º 5.869.046.

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

Los anticuerpos de un solo dominio son fragmentos de anticuerpo que comprenden la totalidad o una porción del dominio variable de cadena pesada o la totalidad o una porción del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En determinadas realizaciones, un anticuerpo de un solo dominio es un anticuerpo de un solo dominio humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 6.248.516).

Los fragmentos de anticuerpo se pueden preparar mediante diversas técnicas, incluyendo, pero sin limitación, digestión proteolítica de un anticuerpo inalterado así como la producción por células hospedadoras recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en el presente documento.

- 5 3. *Anticuerpos químéricos y humanizados*
- Un anticuerpo proporcionado en el presente documento puede ser un anticuerpo químérico. Se describen determinados anticuerpos químéricos, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567; y Morrison *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 6851-6855, 1984. En un ejemplo, un anticuerpo químérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En un ejemplo adicional, un anticuerpo químérico es un anticuerpo "con la clase cambiada" en el que se ha cambiado la clase o subclase con respecto a la del anticuerpo precursor. Los anticuerpos químéricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.
- 10 En determinados ejemplos, un anticuerpo químérico es un anticuerpo humanizado. Normalmente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad para seres humanos, a la vez que se conserva la especificidad y la afinidad del anticuerpo no humano precursor. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR, (o porciones de las mismas) proceden de un anticuerpo no humano y las FR (o porciones de las mismas) proceden de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante humana. En algunas realizaciones, se sustituyen algunos restos de FR en un anticuerpo humanizado por restos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que proceden los restos de la HVR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.
- 15 En determinados ejemplos, un anticuerpo químérico es un anticuerpo humanizado. Normalmente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad para seres humanos, a la vez que se conserva la especificidad y la afinidad del anticuerpo no humano precursor. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR, (o porciones de las mismas) proceden de un anticuerpo no humano y las FR (o porciones de las mismas) proceden de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante humana. En algunas realizaciones, se sustituyen algunos restos de FR en un anticuerpo humanizado por restos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que proceden los restos de la HVR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.
- 20 En determinados ejemplos, un anticuerpo químérico es un anticuerpo humanizado. Normalmente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad para seres humanos, a la vez que se conserva la especificidad y la afinidad del anticuerpo no humano precursor. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR, (o porciones de las mismas) proceden de un anticuerpo no humano y las FR (o porciones de las mismas) proceden de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante humana. En algunas realizaciones, se sustituyen algunos restos de FR en un anticuerpo humanizado por restos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que proceden los restos de la HVR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.
- 25 En determinados ejemplos, un anticuerpo químérico es un anticuerpo humanizado. Normalmente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad para seres humanos, a la vez que se conserva la especificidad y la afinidad del anticuerpo no humano precursor. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR, (o porciones de las mismas) proceden de un anticuerpo no humano y las FR (o porciones de las mismas) proceden de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante humana. En algunas realizaciones, se sustituyen algunos restos de FR en un anticuerpo humanizado por restos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que proceden los restos de la HVR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.
- 30 En determinados ejemplos, un anticuerpo químérico es un anticuerpo humanizado. Normalmente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad para seres humanos, a la vez que se conserva la especificidad y la afinidad del anticuerpo no humano precursor. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR, (o porciones de las mismas) proceden de un anticuerpo no humano y las FR (o porciones de las mismas) proceden de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante humana. En algunas realizaciones, se sustituyen algunos restos de FR en un anticuerpo humanizado por restos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que proceden los restos de la HVR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.
- 35 En determinados ejemplos, un anticuerpo químérico es un anticuerpo humanizado. Normalmente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad para seres humanos, a la vez que se conserva la especificidad y la afinidad del anticuerpo no humano precursor. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR, (o porciones de las mismas) proceden de un anticuerpo no humano y las FR (o porciones de las mismas) proceden de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante humana. En algunas realizaciones, se sustituyen algunos restos de FR en un anticuerpo humanizado por restos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que proceden los restos de la HVR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.
- 40 En determinados ejemplos, un anticuerpo químérico es un anticuerpo humanizado. Normalmente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad para seres humanos, a la vez que se conserva la especificidad y la afinidad del anticuerpo no humano precursor. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR, (o porciones de las mismas) proceden de un anticuerpo no humano y las FR (o porciones de las mismas) proceden de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante humana. En algunas realizaciones, se sustituyen algunos restos de FR en un anticuerpo humanizado por restos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que proceden los restos de la HVR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.
- 45 4. *Anticuerpos multiespecíficos*
- Un anticuerpo proporcionado en presente documento puede ser un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. En determinados ejemplos, una de las especificidades de unión es por PD-L1 y la otra es por cualquier otro antígeno. En determinados ejemplos, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítopos diferentes de PD-L1. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan PD-L1. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o como fragmentos de anticuerpo.
- 55 Las técnicas para producir anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero sin limitación, coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (véase Milstein *et al.* Nature. 305: 537, 1983, el documento WO 93/08829 y Traunecker *et al.* EMBO J. 10: 3655, 1991), y la modificación por ingeniería de "botón en ojal" (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 5.731.168). También pueden producirse anticuerpos multiespecíficos modificando por ingeniería efectos de direccionamiento electrostático para producir moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpo (documento WO 2009/089004A1); reticulando dos o más anticuerpos o fragmentos (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 4.676.980 y Brennan *et al.* Science. 229: 81, 1985); utilizando cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelnik *et al.* J. Immunol. 148(5): 1547-1553, 1992); utilizando la tecnología de "diacuerpo" para producir fragmentos de anticuerpo biespecíficos (véase, por ejemplo, Hollinger *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 90: 6444-6448, 1993); y utilizando dímeros Fv monocatenarios (sFv) (véase, por ejemplo, Gruber *et al.* J. Immunol. 152: 5368, 1994); y preparando anticuerpos triespecíficos, como se describe, por ejemplo, en Tutt *et al.* J. Immunol. 147: 60, 1991.

Los anticuerpos modificados por ingeniería con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, que incluyen los "anticuerpos Octopus", también se incluyen en el presente documento (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576A1).

- 5 El anticuerpo o fragmento del presente documento también incluye un "Fab de acción dual" o "DAF" que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a PD-L1 así como a otro antígeno diferente (véase, por ejemplo, el documento US 2008/0069820).

5. *Variantes de anticuerpo*

- 10 Se contemplan variantes de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos proporcionadas en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Pueden prepararse variantes de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo mediante la introducción de modificaciones adecuadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de restos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Puede efectuarse cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno y se encuentre dentro de las reivindicaciones.

20 a) *Variantes de sustitución, inserción y eliminación*

25 Se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las HVR y las FR. En la tabla 1 se muestran sustituciones conservativas bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Se proporcionan cambios más sustanciales en la tabla 1 bajo el encabezado "sustituciones ilustrativas", y como se describen más adelante en referencia a las clases de las cadenas laterales de aminoácidos. En un anticuerpo de interés pueden introducirse sustituciones de aminoácidos y los productos pueden explorarse para determinar una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno conservada/mejorada, inmunogenicidad reducida o ADCC o CDC mejoradas.

30 **TABLA 1. Sustituciones de aminoácidos ilustrativas y preferidas**

Resto original	Sustituciones ilustrativas	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Los aminoácidos pueden agruparse según las propiedades comunes de la cadena lateral:

- 35 (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
 (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
 (3) ácidos: Asp, Glu;
 (4) básicos: His, Lys, Arg;
 (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
 (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

40 Las sustituciones no conservativas implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo precursor (por ejemplo, un anticuerpo humano o humanizado). Generalmente, las variantes resultantes seleccionadas

- para su estudio posterior tendrán modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad mejorada, inmunogenicidad reducida) con respecto al anticuerpo precursor y/o tendrán determinadas propiedades biológicas conservadas del anticuerpo precursor. Una variante de sustitución ilustrativa es un anticuerpo madurado por afinidad, que puede generarse de manera conveniente, por ejemplo, usando técnicas de maduración por afinidad basadas en presentación en fagos, tales como aquellas descritas en el presente documento. Brevemente, se mutan uno o más restos de HVR y los anticuerpos variantes se presentan en fagos y se exploran para determinar una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión).
- 5 Pueden efectuarse alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en las HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Dichas alteraciones pueden efectuarse en "puntos calientes" de la HVR, es decir, restos codificados por codones que experimentan mutación con elevada frecuencia durante el proceso de maduración somática (véase, por ejemplo, Chowdhury. Methods Mol. Biol. 207: 179-196, 2008), y/o en las SDR (a-CDR), probándose la afinidad de unión de la VH o VL variantes resultantes. La maduración por afinidad mediante la construcción y reselección de bibliotecas secundarias se ha descrito, por ejemplo, en Hoogenboom *et al.* Methods in Molecular Biology. 178: 1-37,
- 10 O'Brien *et al.* eds., Human Press, Totowa, NJ, 2001. En algunas realizaciones de maduración por afinidad, se introduce diversidad en los genes variables seleccionados para su maduración mediante cualquiera de diversos métodos (por ejemplo, PCR propensa a errores, reordenamiento de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). Después, se crea una biblioteca secundaria. A continuación, la biblioteca se explora para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro método para introducir diversidad implica estrategias dirigidas a las HVR, en
- 15 20 las que se aleatorizan varios restos de HVR (por ejemplo, 4-6 restos a la vez). Los restos de HVR implicados en la unión al antígeno se pueden identificar de manera específica, por ejemplo, utilizando mutagénesis por barrido de alanina o modelización. Con frecuencia, se usan como diana, en particular, HVR-H3 y HVR-L3.
- 25 Pueden producirse sustituciones, inserciones o eliminaciones en una o más HVR siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno. Por ejemplo, pueden efectuarse alteraciones conservativas (por ejemplo, sustituciones conservativas, tal como se proporcionan en el presente documento) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión en las HVR. Dichas alteraciones pueden realizarse fuera de los "puntos calientes" de las HVR o SDR. En determinados ejemplos de las secuencias VH y VL variantes proporcionadas anteriormente, cada HVR bien está inalterada o bien no contiene más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.
- 30 Un método útil para identificar restos o regiones de un anticuerpo que pueden seleccionarse como diana para la mutagénesis se denomina "mutagénesis por barrido de alanina" como describe Cunningham *et al.* Science. 244: 1081-1085, 1989. En este método, se identifica un resto o un grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados, tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) y se reemplaza por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si se ve afectada la interacción del anticuerpo con el antígeno. Pueden introducirse sustituciones adicionales en las ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Como alternativa, o adicionalmente, puede usarse una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos próximos pueden seleccionarse como diana o eliminarse como candidatos para la sustitución. Las variantes se pueden explorar para determinar si contienen las propiedades deseadas.
- 35 40 45
- Las inserciones en secuencias de aminoácidos incluyen fusiones en el extremo amino y/o carboxilo con un intervalo de longitudes de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos individuales o múltiples. Ejemplos de inserciones en los extremos incluyen un anticuerpo con un resto metionilo en el extremo N. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.
- 50 b) Variantes de glucosilación
- Un anticuerpo proporcionado en el presente documento se altera para aumentar o reducir el grado de glucosilación del anticuerpo. La adición o eliminación de sitios de glucosilación a un anticuerpo puede lograrse convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos, de tal forma que se crea o elimina más de un sitio de glucosilación.
- 55 60
- Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, puede alterarse el carbohidrato unido a la misma. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero comprenden normalmente un oligosacárido ramificado biantenario que está unido generalmente mediante un enlace N al Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright *et al.* TIBTECH. 15: 26-32, 1997. El oligosacárido puede incluir varios carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como fucosa unida a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura del oligosacárido biantenario. En algunas realizaciones, pueden realizarse modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención para crear variantes de anticuerpos con determinadas propiedades mejoradas.
- 65 En un ejemplo, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una estructura de carbohidratos que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser del 1 % al 80 %, del 1 % al 65 %, del 5 % al 65 % o del 20 % al 40 %. La cantidad de fucosa se determina

- calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, con respecto a la suma de todas las glicoestructuras unidas a Asn297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y con alto contenido de manosa) medidas por espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe en el documento WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al resto de asparagina ubicado aproximadamente en la posición 297 en la región Fc (numeración 5 EU de los restos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también puede estar ubicado a aproximadamente \pm 3 aminoácidos cadena arriba o cadena abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a escasas variaciones de secuencia en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener mejorada la función ADCC. Véase, por ejemplo, las publicaciones de patente de los Estados Unidos US 2003/0157108 y US 10 2004/0093621. Ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpo "desfucosiladas" o "deficientes en fucosa" incluyen los documentos: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 15 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki *et al.* J. Mol. Biol. 336: 1239-1249, 2004; y Yamane-Ohnuki *et al.* Biotech. Bioeng. 87: 614, 2004. Ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos desfucosilados incluyen células Lecl3 CHO deficientes en la fucosilación 20 de proteínas (Ripka *et al.* Arch. Biochem. Biophys. 249: 533-545, 1986; los documentos US 2003/0157108 y WO 2004/056312, especialmente en el ejemplo 11) y líneas celulares con supresión génica, tal como el gen de la alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, células CHO con supresión génica (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki *et al.* Biotech. Bioeng. 87: 614, 2004; Kanda *et al.* Biotechnol. Bioeng. 94(4): 680-688, 2006; y el documento WO 2003/085107).
- 25 20 Las variantes de anticuerpo se proporcionan adicionalmente con oligosacáridos bisectados, por ejemplo, en las que se bisecciona un oligosacárido biantenario unido a la región Fc del anticuerpo mediante GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener una fucosilación reducida y/o una función de ADCC mejorada. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpo, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878; la patente de los Estados Unidos n.º 6.602.684; y el documento US 2005/0123546. También se proporcionan variantes de anticuerpo con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener función CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en los documentos WO 1997/30087; WO 1998/58964; y WO 1999/22764.

30 c) *Variantes de la región Fc*

- 35 Pueden introducirse una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención (por ejemplo SP142) proporcionado en el presente documento, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (p. ej., una región Fc de IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄ humana) que comprende una modificación de un aminoácido (p. ej., una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

Una variante de anticuerpo puede poseer algunas pero no todas las funciones efectoras, lo que la convierte en un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante pero determinadas funciones efectoras (tales como el complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. Pueden llevarse a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/disminución de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo ensayos de unión a receptor de Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carece de actividad de unión a FcYR (careciendo, por tanto, probablemente de actividad ADCC), pero conserva la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en la ADCC, células NK, expresan FcYRIII solamente, mientras que los monocitos expresan, FcYRI, FcYRII y FcYRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 de la página 464 de Ravetch *et al.* Annu. Rev. Immunol. 9: 457-492, 1991. Se describen ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés en las patentes de los Estados Unidos N.º 5.500.362 y 5.821.337; Hellstrom *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 7059-7063, 1986; Hellstrom *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 1499-1502, 1985; y Bruggemann *et al.* J. Exp. Med. 166: 1351-1361, 1987. Como alternativa, pueden emplearse métodos de ensayo no radiactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede determinarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal como el descrito en Clynes *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:652-656, 1998. Pueden llevarse a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a C1q y, por tanto, carece de actividad CDC. Véase, por ejemplo, el ensayo ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al.* J. Immunol. Methods. 202: 163, 1996; Cragg *et al.* Blood. 101: 1045-1052, 2003; y Cragg *et al.* Blood 103: 2738-2743, 2004. También pueden realizarse determinaciones de unión a FcRn y de eliminación/semivida *in vivo* utilizando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova *et al.* Intl. Immunol. 18(12): 1759-1769, 2006).

65 Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen aquellos con la sustitución de uno o más de los restos 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de la región Fc (patente de los Estados Unidos n.º 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el mutante de Fc llamado "DANA" con sustitución de los restos 265 y 297 por alanina (patente de los

Estados Unidos n.º 7.332.581).

Se describen determinadas variantes de anticuerpo con unión mejorada o reducida a FcR. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos. n.º 6.737.056; el documento WO 2004/056312; y Shields *et al.* J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604, 2001.

En determinadas realizaciones, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de los restos).

Se pueden realizar alteraciones en la región Fc que dan lugar a una unión alterada (es decir, tanto aumentada como disminuida) a C1q y/o a una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, tal como se describe en la patente de los Estados Unidos n.º 6.194.551, el documento WO 99/51642, y en Idusogie *et al.* J. Immunol. 164: 4178-4184, 2000.

Los anticuerpos con semivididas aumentadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer *et al.* J. Immunol. 117: 587, 1976) y Kim *et al.*, J. Immunol. 24: 249, 1994), se describen en la solicitud de patente de los Estados Unidos N.º 2005/0014934. Dichos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn.

Dichas variantes de Fc incluyen aquellas que tienen sustituciones en uno o más de los restos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, o 434, por ejemplo, la sustitución del resto 434 de la región Fc (patente de los Estados Unidos n.º 7.371.826). Véanse también Duncan *et al.* Nature. 322:738-740, 1988; las patentes de los Estados Unidos n.º 5.648.260 y 5.624.821; y el documento WO 94/29351 en referencia a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

d) Variantes de anticuerpo modificadas por ingeniería con cisteína

Puede ser deseable crear anticuerpos modificados por ingeniería con cisteína, por ejemplo, "tioMAb", en los que uno o más restos de un anticuerpo se sustituyen por restos de cisteína. En ejemplos particulares, los restos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Al sustituir esos restos por cisteína, se colocan de este modo grupos tiol reactivos en sitios accesibles del anticuerpo y pueden usarse para conjugar el anticuerpo a otros restos, tales como restos de fármacos o restos de enlazador-fármaco, para crear un inmunoconjungado, como se describe adicionalmente en el presente documento. En determinados ejemplos, puede sustituirse uno cualquiera o más de los siguientes restos por cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Pueden generarse anticuerpos modificados por ingeniería con cisteína como se describe, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos N.º 7.521.541.

e) Derivados de anticuerpos

Un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención (p. ej., SP142) proporcionado en el presente documento puede modificarse adicionalmente para que contenga restos no proteicos adicionales que se conocen en la técnica y están fácilmente disponibles. Los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo incluyen, pero sin limitación, polímeros hidrosolubles. Ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polímero 1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(*n*-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de prolipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede estar o no ramificado. La cantidad de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y si se une más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización se puede determinar basándose en consideraciones que incluyen, pero sin limitación, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a mejorar, si el derivado de anticuerpo se usará en una terapia en condiciones definidas, etc.

En otro ejemplo, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y un resto no proteico que pueden calentarse selectivamente por exposición a radiación. En una realización, el resto no proteico es un nanotubo de carbono (Kam *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102: 11600-11605, 2005). La radiación puede tener cualquier longitud de onda e incluye, pero sin limitación, longitudes de onda que no dañan las células normales, pero que calientan el resto no proteico a una temperatura a la que las mueren células proximales al anticuerpo-resto no proteico.

B. Métodos y composiciones recombinantes

Los anticuerpos se pueden producir utilizando métodos y composiciones recombinantes, por ejemplo, como se describe en la patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567. En una realización, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-PD-L1 descrito en el presente documento (por ejemplo, SP142). Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende la VL y/o una secuencia de aminoácidos que

- comprende la VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas ligera y/o pesada del anticuerpo). En una realización adicional, se proporcionan uno o más vectores (p. ej., vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En una realización adicional, se proporciona una célula hospedadora que comprende dicho ácido nucleico. Una célula hospedadora puede comprender (p. ej., se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo. La célula hospedadora puede ser eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfoide (por ejemplo, células Y0, NS0, Sp20). También se proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-PD-L1, en donde el método comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se proporciona anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y opcionalmente, recuperar el anticuerpo de la célula hospedadora (o del medio de cultivo de la célula hospedadora).
- Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-PD-L1 (p. ej., SP142), el ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, como se describe anteriormente, se aísla e inserta en uno o más vectores para la clonación y/o expresión adicional en una célula hospedadora. Dicho ácido nucleico puede aislarse y secuenciarse fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo).
- Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o expresión de los vectores que codifican anticuerpos incluyen células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, los anticuerpos pueden producirse en bacterias, en particular cuando las funciones de glucosilación y efectora de Fc no son necesarias. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos n.º 5.648.237, 5.789.199, y 5.840.523. (Véase también Charlton. *Methods in Molecular Biology*. vol. 248, págs. 245-254, B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*. Despues de la expresión, el anticuerpo puede aislarse de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y puede purificarse adicionalmente.
- Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras, son hospedadores de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos, incluyendo cepas de hongos y levaduras cuyas vías de glucosilación se han "humanizado", lo que da como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véanse Gerngross. *Nat. Biotech.* 22: 1409-1414, 2004 y Li *et al.* *Nat. Biotech.* 24: 210-215, 2006.
- Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de anticuerpo glucosilado también proceden de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas baculovíricas que pueden usarse junto con células de insecto, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.
- También pueden utilizarse cultivos de células vegetales como hospedadores. Véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos n.º 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).
- También pueden usarse como hospedadores células de vertebrado. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas celulares de mamífero que están adaptadas para crecer en suspensión. Otros ejemplos de células de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono trasformada mediante SV40 (COS-7); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 como se describen, p. ej., en Graham *et al.* *J. Gen Virol.* 36:59, 1977); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describen, por ejemplo, en Mather. *Biol. Reprod.* 23:243-251, 1980); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma de cuello de útero humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3 A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumor de mama de ratón (MMT 060562); células TRI, como se describe, por ejemplo, en Mather *et al.* *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68, 1982; células MRC 5; y células FS4. Otras líneas celulares de mamífero hospedadoras útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR" (Urlaub *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 4216, 1980); y líneas celulares de mieloma, tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas celulares de mamífero hospedadoras adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki *et al.* *Methods in Molecular Biology*. vol. 248, págs. 255-268, B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003.

60 C. Ensayos

Los anticuerpos anti-PD-L1 proporcionados en el presente documento se pueden identificar, explorar o caracterizar para determinar sus propiedades fisicoquímicas y/o sus actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica.

65

1. Ensayos de unión y otros ensayos

Se puede someter a ensayo un anticuerpo de la invención para determinar su actividad de unión a antígeno, por ejemplo, por métodos conocidos tal como el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunotransferencia (por ejemplo, transferencia Western), citometría de flujo (p. ej., FACS™), inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, etc.

Los ensayos de competencia se pueden usar para identificar un anticuerpo que compite con uno cualquiera de los anticuerpos de la invención para unirse a PD-L1 (por ejemplo, el anticuerpo anti-PD-L1 SP142). En determinadas realizaciones, dicho anticuerpo competidor se une al mismo epítopo (p. ej., un epítopo lineal o conformacional) al que se une uno cualquiera de los anticuerpos de la invención (p. ej., el anticuerpo anti-PD-L1 SP142). Se proporcionan métodos detallados ilustrativos para mapear un epítopo al que se une un anticuerpo en Morris "Epitope Mapping Protocols," en Methods in Molecular Biology Vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ, 1996).

En un ensayo de competencia ilustrativo, se incuba PD-L1 inmovilizado en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une a PD-L1 (p. ej., el anticuerpo anti-PD-L1 SP142) y un segundo anticuerpo no marcado que se está sometiendo a ensayo respecto para determinar su capacidad para competir con el primer anticuerpo por la unión a PD-L1. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incuba PD-L1 inmovilizado en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado, pero no el segundo anticuerpo no marcado. Despues de la incubación en condiciones que permiten la unión del primer anticuerpo a PD-L1, se retira el exceso de anticuerpo no unido y se mide la cantidad de marcador asociado con PD-L1 inmovilizado. Si la cantidad de marcador asociado a PD-L1 inmovilizado se encuentra sustancialmente reducida en la muestra de ensayo con respecto a la muestra de control, entonces, esto indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo por la unión a PD-L1. Véase, por ejemplo, Harlow *et al.* Antibodies: A Laboratory Manual. capítulo 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988).

2. *Ensayos de detección*

Se proporcionan ensayos para identificar anticuerpos anti-PD-L1 útiles para detectar la presencia de PD-L1, por ejemplo, en inmunohistoquímica (IHC), inmunofluorescencia (IF, por sus siglas en inglés), inmunotransferencia (por ejemplo, transferencia Western), citometría de flujo (p. ej., FACS™) o ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA). Un anticuerpo de la invención puede someterse a ensayo para determinar dicha actividad.

D. Inmunoconjungados

La invención también proporciona inmunoconjungados que comprenden un anticuerpo anti-PD-L1 proporcionado en el presente documento conjugado a uno o más marcadores y/o agentes, tales como isótopos radiactivos.

En una realización, un inmunoconjungado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado con un átomo radiactivo para formar un radioconjungado. Se encuentra disponible una variedad de isótopos radiactivos para la producción de radioconjungados. Los ejemplos incluyen At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radioactivos de Lu. Cuando el radioconjungado se usa para la detección, este puede comprender un átomo radiactivo para realizar estudios escintigráficos, por ejemplo, tc99m o I¹²³ o un marcador de espín para obtención de imágenes por resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés) (también conocida como obtención de imágenes por resonancia magnética, MRI, por sus siglas en inglés), tales como nuevamente, yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Pueden prepararse conjungados de un anticuerpo anti-PD-L1 y un marcador o agente utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tal como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tal como bis(p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de bis-fluorina activa (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal como se describe en Vitetta *et al.*, Science 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante ilustrativo para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilite la liberación del marcador o agente. Por ejemplo, puede usarse un enlazador lábil por ácido, enlazador sensible a peptidasa, enlazador fotolábil, enlazador de dimetilo o enlazador que contiene disulfuro (Chari *et al.*, Cancer Res. 52:127-131 (1992); patente de los Estados Unidos n.º 5.208.020).

Los inmunoconjungados en el presente documento contemplan expresamente, pero sin limitación, dichos conjungados preparados con reactivos reticulantes que incluyen, pero sin limitación, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que se encuentran disponibles comercialmente (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE. UU.).

E. Métodos y composiciones para diagnósticos y detección

- En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención (por ejemplo, SP142 o cualquier otro anticuerpo anti-PD-L1 descrito, por ejemplo, anteriormente en la sección A, "Anticuerpos anti-PD-L1 ilustrativos" que están dentro del alcance de las reivindicaciones) son útiles para detectar la presencia de PD-L1 en una muestra biológica. El término "detectar", como se usa en el presente documento abarca la detección cuantitativa o cualitativa.
- 5 En un caso, se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, SP142) para su uso en un método de diagnóstico o detección. En otro caso, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-PD-L1 (p. ej., SP142) en la fabricación de un reactivo para su uso en un método de diagnóstico o detección. En un caso, por ejemplo, se proporciona un método para detectar la presencia de PD-L1 en una muestra biológica, descrito a continuación. En determinadas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-PD-L1 como se describe en el presente documento en condiciones que permitan la unión del anticuerpo anti-PD-L1 a PD-L1 y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-PD-L1 y PD-L1. Dicho método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*.
- 10 15 Pueden usarse anticuerpos anti-PD-L1 de la invención (p. ej., SP142), por ejemplo, en inmunoensayos, que incluyen, por ejemplo, inmunohistoquímica (IHC), inmunofluorescencia (IF), inmunotransferencia (por ejemplo, transferencia Western), citometría de flujo (p. ej., FACS™) y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). En una realización, se usa un anticuerpo anti-PD-L1 para seleccionar sujetos elegibles para terapia con un anticuerpo anti-PD-L1, por ejemplo, donde PD-L1 es un biomarcador para la selección de pacientes. La invención proporciona además el uso de un anticuerpo anti-PD-L1 en un método de diagnóstico de un sujeto que padece un trastorno (p. ej., un cáncer o una disfunción inmunitaria), comprendiendo el método: determinar la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra obtenida del sujeto poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención (p. ej., SP142) y detectando la presencia del anticuerpo unido.
- 20 25 30 Por ejemplo, el método prevé el uso de un anticuerpo anti-PD-L1 en un método de diagnóstico de un sujeto que padece un cáncer, comprendiendo el método: determinar la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra obtenida del sujeto poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención (p. ej., SP142) y detectando la presencia del anticuerpo unido. En algunos casos, la muestra se selecciona del grupo que consiste en una muestra de tejido, una muestra de sangre completa, una muestra de suero, o una muestra de plasma. En algunos casos, la muestra de tejido es una muestra tumoral. En algunos casos, la muestra tumoral comprende células inmunitarias infiltrantes de tumores, células tumorales, células del estroma, y cualquier combinación de las mismas.
- 35 También se proporciona el uso de un anticuerpo anti-PD-L1 en la fabricación de un reactivo para su uso en un método de diagnóstico de un sujeto que padece un trastorno (por ejemplo, un cáncer o una disfunción inmunitaria), comprendiendo el método: determinar la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra obtenida del sujeto poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención (p. ej., SP142) y detectando la presencia del anticuerpo unido.
- 40 45 Por ejemplo, el método prevé el uso de un anticuerpo anti-PD-L1 en la fabricación de un reactivo para su uso en un método de diagnóstico de un sujeto que padece cáncer, comprendiendo el método: determinar la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra obtenida del sujeto poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención (p. ej., SP142) y detectando la presencia del anticuerpo unido. En algunos casos, la muestra se selecciona del grupo que consiste en una muestra de tejido, una muestra de sangre completa, una muestra de suero, o una muestra de plasma. En algunos casos, la muestra de tejido es una muestra tumoral. En algunos casos, la muestra tumoral comprende células inmunitarias infiltrantes de tumores, células tumorales, células del estroma, y cualquier combinación de las mismas.
- 50 55 En otro caso, la invención proporciona un método para identificar a un sujeto que padece un trastorno (p. ej., cáncer o una disfunción inmunitaria) que es probable que responda a un tratamiento, incluyendo el método: determinar la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra obtenida del sujeto poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención (p. ej., SP142) y detectando la presencia del anticuerpo unido, en donde la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra indica que es probable que el sujeto responda al tratamiento.
- 60 65 Por ejemplo, la invención proporciona un método para identificar a un sujeto que padece un cáncer que es probable que responda al tratamiento con una terapia contra el cáncer, comprendiendo el método: determinar la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra obtenida del sujeto poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención (p. ej., SP142) y detectando la presencia del anticuerpo unido, en donde la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra indica que es probable que el sujeto responda al tratamiento con la terapia contra el cáncer. En algunos casos, la muestra se selecciona del grupo que consiste en una muestra de tejido, una muestra de sangre completa, una muestra de suero, o una muestra de plasma. En algunos casos, la muestra de tejido es una muestra tumoral. En algunos casos, la muestra tumoral comprende células inmunitarias infiltrantes de tumores, células tumorales, células del estroma, y cualquier combinación de las mismas.
- En otro caso más, la invención proporciona un método para predecir la capacidad de respuesta de un individuo que padece un trastorno (p. ej., cáncer o una disfunción inmunitaria) a un tratamiento, incluyendo el método: determinar la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra obtenida del sujeto poniendo en contacto la muestra con

un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención (p. ej., SP142) y detectando la presencia del anticuerpo unido, en donde la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra indica que es más probable que el sujeto responda al tratamiento.

- 5 Por ejemplo, la invención proporciona un método para predecir la capacidad de respuesta de un individuo que padece cáncer al tratamiento con una terapia contra el cáncer, comprendiendo el método: determinar la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra obtenida del sujeto poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención (p. ej., SP142) y detectando la presencia del anticuerpo unido, en donde la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra indica que es más probable que el sujeto responda al tratamiento con la terapia contra el cáncer. En algunos casos, la muestra se selecciona del grupo que consiste en una muestra de tejido, una muestra de sangre completa, una muestra de suero, o una muestra de plasma. En algunos casos, la muestra de tejido es una muestra tumoral. En algunos casos, la muestra tumoral comprende células inmunitarias infiltrantes de tumores, células tumorales, células del estroma, y cualquier combinación de las mismas.
- 10
- 15 En otro caso adicional más, la invención proporciona un método para determinar la probabilidad de que un sujeto que padece un trastorno (p. ej., cáncer o una disfunción inmunitaria) se beneficie de un tratamiento, incluyendo el método: determinar la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra obtenida del sujeto poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención (p. ej., SP142) y detectando la presencia del anticuerpo unido, en donde la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra indica la probabilidad de que el sujeto se beneficie del tratamiento con el tratamiento.
- 20

Por ejemplo, la invención proporciona un método para determinar la probabilidad de que un sujeto que padece un cáncer se beneficie del tratamiento con una terapia contra el cáncer, incluyendo el método: determinar la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra obtenida del sujeto poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención (p. ej., SP142) y detectando la presencia del anticuerpo unido, en donde la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra indica la probabilidad de que el sujeto se beneficie del tratamiento con la terapia contra el cáncer. En algunos casos, la muestra se selecciona del grupo que consiste en una muestra de tejido, una muestra de sangre completa, una muestra de suero, o una muestra de plasma. En algunos casos, la muestra de tejido es una muestra tumoral. En algunos casos, la muestra tumoral comprende células inmunitarias infiltrantes de tumores, células tumorales, células del estroma, y cualquier combinación de las mismas.

En otro caso, la invención proporciona un método para seleccionar una terapia para un sujeto que padece un trastorno (p. ej., cáncer o una disfunción inmunitaria), incluyendo el método: determinar la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra obtenida del sujeto poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención (p. ej., SP142) y detectando la presencia del anticuerpo unido; y seleccionar una terapia contra el cáncer para el sujeto basándose en la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra.

Por ejemplo, la invención proporciona un método para seleccionar una terapia para un sujeto que padece un cáncer, comprendiendo el método: determinar la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra obtenida del sujeto poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención (p. ej., SP142) y detectando la presencia del anticuerpo unido; y seleccionar una terapia contra el cáncer para el sujeto basándose en la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra. En algunos casos, la muestra se selecciona del grupo que consiste en una muestra de tejido, una muestra de sangre completa, una muestra de suero, o una muestra de plasma. En algunos casos, la muestra de tejido es una muestra tumoral. En algunos casos, la muestra tumoral comprende células inmunitarias infiltrantes de tumores, células tumorales, células del estroma, y cualquier combinación de las mismas.

En cualquiera de los métodos anteriores, la muestra tumoral puede tener un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumores que comprende aproximadamente un 1 % o más (p. ej., aproximadamente un 1 % o más, aproximadamente un 2 % o más, aproximadamente un 3 % o más, aproximadamente un 4 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 50 % o más, aproximadamente un 55 % o más, aproximadamente un 60 % o más, aproximadamente un 65 % o más, aproximadamente un 70 % o más, aproximadamente un 80 % o más, aproximadamente un 85 % o más, aproximadamente un 90 % o más, aproximadamente un 95 % o más, o aproximadamente un 99 % o más) de la muestra tumoral, por ejemplo, por área. Por ejemplo, en algunos casos, la muestra tumoral puede tener un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumores que comprenden aproximadamente de un 1 % a menos de aproximadamente un 99 % (por ejemplo, de aproximadamente un 1 % a menos de aproximadamente un 95 %, de aproximadamente un 1 % a menos de aproximadamente un 90 %, de aproximadamente un 1 % a menos de aproximadamente un 85 %, de aproximadamente un 1 % a menos de aproximadamente un 80 %, de aproximadamente un 1 % a menos de aproximadamente un 75 %, de aproximadamente un 1 % a menos de aproximadamente un 70 %, de aproximadamente un 1 % a menos de aproximadamente un 65 %, de aproximadamente un 1 % a menos de aproximadamente un 60 %, de aproximadamente un 1 % a menos de aproximadamente un 55 %, de aproximadamente un 1 % a menos de aproximadamente un 50 %, de aproximadamente un 1 % a menos de aproximadamente un 40 %, de aproximadamente un 1 % a menos de aproximadamente un 35 %, de aproximadamente un 1 % a menos de aproximadamente un 30 %, de aproximadamente un 1 % a menos de aproximadamente un 25 %, de aproximadamente un 1 % a menos de aproximadamente un 20 %, de aproximadamente un 1 % a menos de aproximadamente un 15 %, de aproximadamente un 1 % a menos de aproximadamente un 10 %, de aproximadamente un 1 % a menos de aproximadamente un 5 %, de aproximadamente un 1 % a menos de aproximadamente un 2 %, de aproximadamente un 1 % a menos de aproximadamente un 1 %).

aproximadamente un 5 % a menos de aproximadamente un 15 %, de aproximadamente un 5 % a menos de aproximadamente un 10 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 95 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 90 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 85 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 80 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 75 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 70 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 65 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 60 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 55 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 50 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 40 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 35 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 30 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 25 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 20 %, de aproximadamente un 10 % a menos del aproximadamente un 15 %) de las células tumorales en la muestra tumoral. Por ejemplo, en algunos casos, la muestra tumoral puede tener un nivel de expresión detectable de PD-L1 en aproximadamente un 1 % o más a menos de un 5 % de las células tumorales en la muestra tumoral.

En otros casos, el tumor puede tener un nivel de expresión detectable de PD-L1 en aproximadamente un 10 % o más de las células tumorales en la muestra tumoral. En otros casos, el tumor puede tener un nivel de expresión detectable de PD-L1 en aproximadamente un 10 % o más de las células tumorales en la muestra tumoral.

En cualquiera de los métodos anteriores, el cáncer puede ser cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer de células escamosas (incluyendo adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón), cáncer de pulmón microcítico, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, leucemia y cáncer de cabeza y cuello. En algunos casos, el cáncer es NSCLC. En algunas realizaciones, el NSCLC es adenocarcinoma de pulmón o carcinoma escamoso de pulmón. En algunas realizaciones, el NSCLC es NSCLC escamoso o NSCLC no escamoso.

El beneficio y/o respuesta de cualquiera de los métodos anteriores puede ser cualquiera conocido en la técnica y/o descrito en el presente documento, por ejemplo, (1) inhibición, hasta cierto punto, de la progresión de la enfermedad (por ejemplo, progresión del cáncer), incluyendo su ralentización y detención completa; (2) una reducción en el tamaño tumoral; (3) inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención completa) de la infiltración de células cancerosas en órganos y/o tejidos periféricos adyacentes; (4) inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención completa) de la metástasis; (5) alivio, hasta cierto punto, de uno o más síntomas asociados con la enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer); (6) aumento o extensión de la duración de la supervivencia, incluyendo la supervivencia general y la supervivencia sin progresión; y/o (9) mortalidad reducida en cualquier punto de tiempo dado después del tratamiento. En algunos casos, dicho beneficio incluye uno o más de: ampliar la supervivencia (incluyendo la supervivencia general y la supervivencia sin progresión); que da como resultado una respuesta objetiva (incluyendo una respuesta completa o una respuesta parcial); o mejorar los signos o síntomas del cáncer.

Además de cualquiera de los métodos anteriores, se puede administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una terapia contra el cáncer en función del nivel de expresión de PD-L1 en la muestra (aunque la administración al paciente no se reivindica como tal). En algunos casos, la terapia contra el cáncer comprende un antagonista de unión al eje de PD-1. El antagonista de unión al eje de PD-1 puede ser cualquier antagonista de unión al eje de PD-1 conocido en la técnica o descrito en el presente documento.

Por ejemplo, en algunos casos, el antagonista de unión al eje de PD-1 se selecciona entre el grupo que consiste en un antagonista de unión a PD-L1, un antagonista de unión a PD-1 y un antagonista de unión a PD-L2. En algunos casos, el antagonista de unión al eje de PD-1 es un antagonista de unión a PD-L1. En algunos casos, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a uno o más de sus compañeros de unión a ligando. En otros casos, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1. En otros casos más, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a B7-1. En algunos casos, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 tanto a PD-1 como a B7-1. En algunos casos, el antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en: YW243.55.S70, MPDL3280A (atezolizumab), MDX-1105, MEDI4736 (durvalumab) y MSB0010718C (avelumab).

En algunos casos, el antagonista de unión al eje de PD-1 es un antagonista de unión a PD-1. Por ejemplo, en algunos casos, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a uno o más de sus compañeros de unión a ligando. En algunos casos, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L1. En otros casos, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L2. En otros casos más, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 tanto a PD-L1 como a PD-L2. En algunos casos, el antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo. En algunos casos, el anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en: MDX 1106 (nivolumab), MK-3475 (pembrolizumab), MEDI-0680 (AMP-514), PDR001, REGN2810 y BGB-108. En algunos casos, el antagonista de unión a PD-1 es una proteína de fusión de Fc. Por ejemplo, en algunos casos, la proteína de fusión de Fc es AMP-224.

En algunos casos, el método incluye además la administración al paciente de una cantidad eficaz de un segundo

agente terapéutico (aunque, de nuevo, la administración al paciente no se reivindica como tal. En algunos casos, el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un agente citotóxico, un agente inhibidor del crecimiento, un agente de radioterapia, un agente antiangiogénico y combinaciones de los mismos.

- 5 La muestra utilizada en cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser como se describe a continuación en la
sección F, "Muestras biológicas". En algunas realizaciones, la muestra tumoral comprende células tumorales, células
inmunitarias infiltrantes de tumores, células del estroma, o una combinación de las mismas. En cualquiera de las
realizaciones anteriores, la muestra tumoral puede ser una muestra tumoral fijada en formalina e incluida en parafina
(FFPE), una muestra tumoral de archivo, una muestra tumoral en fresco o una muestra tumoral congelada.
10
- 15 En determinadas realizaciones, la presencia y/o el nivel/cantidad de expresión de PD-L1 en una muestra puede
determinarse mediante IHC y protocolos de tinción. Se ha demostrado que la tinción IHC de secciones de tejido es un
método fiable para determinar o detectar la presencia de proteínas en una muestra. En una realización, el nivel de
expresión de PD-L1 se determina utilizando un método que comprende: (a) realizar un análisis IHC de una muestra
20 (tal como una muestra tumoral obtenida de un sujeto) con un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención, por ejemplo,
SP142; y (b) determinar la presencia y/o el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra. En algunas realizaciones, la
intensidad de la tinción IHC se determina con respecto a una referencia. En algunas realizaciones, la referencia es un
valor de referencia. En algunas realizaciones, la referencia es una muestra de referencia (por ejemplo, una muestra
de tinción de línea celular de control, una muestra de tejido de un paciente sin cancer, una muestra de referencia que
se sabe que tiene un nivel predeterminado de expresión de PD-L1 (p. ej., una muestra de referencia con un % de IC
o % de TC definido), o una muestra tumoral PD-L1 negativa).

La IHC se puede realizar en combinación con técnicas adicionales como tinción morfológica y/o hibridación *in situ* (p. ej., FISH). Hay dos métodos generales de IHC disponibles; ensayos directos e indirectos. Según el primer ensayo, la
25 unión del anticuerpo al antígeno diana se determina directamente. Este ensayo directo utiliza un reactivo marcado, tal
como una etiqueta fluorescente o un anticuerpo primario marcado con una enzima, que se puede visualizar sin
interacción adicional con los anticuerpos. En un ensayo indirecto habitual, el anticuerpo primario no conjugado se une
30 al antígeno y después un anticuerpo secundario marcado se une al anticuerpo primario. Cuando el anticuerpo
secundario se conjuga con un marcador enzimático, se añade un sustrato cromogénico o fluorogénico para permitir la
visualización del antígeno. La amplificación de la señal se produce porque varios anticuerpos secundarios pueden
reaccionar con diferentes epítopos en el anticuerpo primario. El anticuerpo primario y/o secundario utilizados para IHC
normalmente se marcarán con un resto detectable. Hay numerosos marcadores disponibles que generalmente se
35 pueden agrupar en las siguientes categorías: a) radioisótopos, tales como ³⁵S, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H y ¹³¹I; (b) partículas de oro
coloidal; (c) marcadores fluorescentes que incluyen, pero sin limitación, quelatos de tierras raras (quelatos de europio),
rojo Texas, rodamina, fluoresceína, dansilo, lisamina, umbelifera, ficocriterina, ficocianina, o fluoróforos
40 comercialmente disponibles tales como SPECTRUM ORANGE7 y SPECTRUM GREEN7 y/o derivados de uno
cualesquier o más de los anteriores; (d) se encuentran disponibles varios marcadores enzima-sustrato y la patente de
los Estados Unidos n.º 4.275.149 proporciona una revisión de algunos de ellos. Los ejemplos de marcadores
enzimáticos incluyen luciferasas (p. ej., luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; véase, por ejemplo, la patente
45 de los Estados Unidos n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidrofotalacina, malato deshidrogenasa, ureasa,
peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO, por sus siglas en inglés), fosfatasa alcalina, β-galactosidasa,
glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasa (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato
60 deshidrogenasa), oxidasa heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares.
45 Los ejemplos de combinaciones enzima-sustrato incluyen, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (HRPO) con
peroxidasa de hidrógeno como sustrato; fosfatasa alcalina (AP, por sus siglas en inglés) con fosfato de para-nitrofenilo
50 como sustrato cromogénico; y β-D-galactosidasa (β-D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil-β-D-galactosidasa)
o sustrato fluorogénico (por ejemplo, 4-metilumbeliferol-β-D-galactosidasa). Para una revisión general
de estos, véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos n.º 4.275.149 y 4.318.980.

Las muestras pueden prepararse, por ejemplo, manualmente o utilizando un instrumento de tinción automatizado (p. ej., un instrumento Ventana BenchMark XT o Benchmark ULTRA). Las muestras así preparadas pueden montarse y
55 cubrirse con cubreobjetos. Después se determina la evaluación del portaobjetos, por ejemplo, utilizando un
microscopio y pueden emplearse criterios de intensidad de tinción, habitualmente utilizados en la técnica. En una
realización, debe entenderse que cuando las células y/o el tejido de un tumor se examinan utilizando IHC, la tinción
generalmente se determina o evalúa en la una o más células tumorales y/o tejido (a diferencia del estroma o tejido
circundante que puede estar presente en la muestra). En algunas realizaciones, se entiende que cuando las células
y/o el tejido de un tumor se examinan utilizando IHC, la tinción incluye la determinación o evaluación en células
60 inmunitarias infiltrantes de tumores, incluyendo células inmunes intratumorales o peritumorales. En algunas
realizaciones, IHC detecta la presencia de PD-L1 en > 0 % de la muestra, en al menos un 1 % de la muestra, en al
menos un 5 % de la muestra, en al menos un 10 % de la muestra, en al menos un 15 % de la muestra, en al menos un
15 % de la muestra, en al menos un 20 % de la muestra, en al menos un 25 % de la muestra, en al menos un 30 %
65 de la muestra, en al menos un 35 % de la muestra, en al menos un 40 % de la muestra, en al menos un 45 % de la
muestra, en al menos un 50 % de la muestra, en al menos un 55 % de la muestra, en al menos un 60 % de la muestra,
en al menos un 65 % de la muestra, en al menos un 70 % de la muestra, en al menos un 75 % de la muestra, en al

menos un 80 % de la muestra, en al menos un 85 % de la muestra, en al menos un 90 % de la muestra, en al menos un 95 % de la muestra o más. Las muestras se pueden valorar utilizando cualquiera de los criterios descritos en el presente documento, por ejemplo, por un patólogo o utilizando análisis de imágenes automatizado.

- 5 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos anteriores, el nivel de expresión de PD-L1 se detecta en células tumorales, células inmunitarias infiltrantes de tumores, o combinaciones de las mismas, por ejemplo, utilizando IHC. Las células inmunitarias infiltrantes de tumores incluyen, pero sin limitación, células inmunitarias intratumorales, células inmunitarias peritumorales o cualquier combinación de las mismas, y otras células tumorales del estroma (p. ej., fibroblastos). Dichas células inmunitarias infiltrantes de tumores pueden ser linfocitos T (tales como linfocitos T CD8+ y/o linfocitos T CD4+), linfocitos B u otras células del linaje de la médula ósea, incluidos los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos), monocitos, macrófagos, células dendríticas (p. ej., células dendríticas interdigitantes, histiocitos y linfocitos citolíticos naturales. En algunas realizaciones, la tinción para PD-L1 se detecta como tinción de membrana, tinción citoplasmática y combinaciones de las mismas. En otras realizaciones, la ausencia de PD-L1 se detecta como ausencia o falta de tinción en la muestra. En algunas realizaciones, el método comprende determinar el porcentaje del área tumoral cubierta por células inmunitarias infiltrantes de tumores que expresan una cantidad detectable de PD-L1, por ejemplo, como se describe en presente documento(véase, por ejemplo, el % de IC como se describe en el ejemplo 5). En algunas realizaciones, el método comprende determinar el porcentaje de células tumorales en la muestra tumoral que expresa una cantidad detectable de PD-L1, por ejemplo, como se describe en presente documento(véase, por ejemplo, el ejemplo 5).
 - 10
 - 15
 - 20
 - 25
 - 30
 - 35
 - 40
 - 45
 - 50
 - 55
 - 60
 - 65
- En determinados casos, se proporcionan anticuerpos anti-PD-L1 marcados. Los marcadores incluyen, pero sin limitación, marcadores o restos que se detectan directamente (tal como marcadores fluorescentes, cromóforos, densos a electrones, quimioluminiscentes y radiactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, mediante una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores ilustrativos incluyen, pero sin limitación, los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^{3}H y ^{131}I , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbelifera, luciferinas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente de los Estados Unidos n.º 4.737.456), 2,3-dihidroftalacina dionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasa, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidases heterocíclicas tal como uricasa y xantina oxidasa, acopladas a una enzima que utiliza peróxido de hidrógeno para oxidar un colorante precursor tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables, y similares.
- También se entiende que cualquiera de los métodos anteriores para el diagnóstico y/o detección puede realizarse utilizando un inmunoconjungado de la invención, como se describe anteriormente, en lugar de o además de un anticuerpo anti-PD-L1 no conjugado.

F. Muestras biológicas

- 40 En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención (por ejemplo, SP142 o cualquier otro anticuerpo anti-PD-L1 descrito, por ejemplo, anteriormente en la sección A, "Anticuerpos anti-PD-L1 ilustrativos") se pueden usar para detectar la presencia de PD-L1 en muestras biológicas utilizando métodos conocidos en la técnica o descritos en el presente documento.
 - 45 En algunos casos, una muestra biológica incluye una muestra de tejido o de células. Por ejemplo, una muestra biológica puede incluir una célula o tejido de pacientes normales o con cáncer, tales como, por ejemplo, tejido normal y canceroso de mama, colon, pulmón, riñón, hueso, cerebro, músculo, estómago, páncreas, vejiga, ovario, útero, así como tejido cardiaco, embrionario y placentario.
 - 50 En determinados casos, la fuente de la muestra de tejido o de células puede ser tejido sólido procedente de tejido en fresco, congelado y/o conservado, o una biopsia o un aspirado; sangre o cualquier constituyente de la sangre; fluidos corporales, tales como fluido cefalorraquídeo, líquido amniótico, fluido peritoneal o fluido intersticial; células de cualquier momento durante la gestación o el desarrollo del sujeto. En algunas realizaciones, la muestra biológica se obtiene de cultivo *in vitro* de tejidos o células. Ejemplos de muestras de tumores en el presente documento incluyen, pero sin limitación, biopsias de tumores, células tumorales circulantes, suero o plasma, proteínas plasmáticas circulantes, líquido ascítico, cultivos celulares primarios o líneas celulares procedentes de tumores o que muestran propiedades similares a los tumores, así como muestras tumorales conservadas, tal como muestras tumorales fijadas en formalina, incluidas en parafina (FFPE) o muestras tumorales congeladas.
 - 55
 - 60
 - 65
- En algunas realizaciones, la muestra biológica contiene compuestos que no se mezclan de manera natural con el tejido en la naturaleza, tal como conservantes, anticoagulantes, tampones, nutrientes, antibióticos o similares. En determinadas realizaciones, la muestra biológica se ha expuesto y/o contiene uno o más fijadores. Los fijadores que se pueden usar con los métodos y las composiciones de la invención incluyen formalina, glutaraldehído, tetraóxido de osmio, ácido acético, etanol, acetona, ácido pírico, cloroformo, dicromato de potasio y cloruro de mercurio y/o estabilización por calentamiento o congelación de microondas.

En algunas realizaciones, la muestra biológica es de un sujeto que tiene, está predispuesto a, o se está sometiendo a ensayo para determinar una disfunción inmunitaria. En determinadas realizaciones, la disfunción inmunitaria es un trastorno disfuncional de linfocitos T. En algunas realizaciones, el trastorno disfuncional de linfocitos T es infección aguda no resuelta, infección crónica o inmunidad tumoral. En determinadas realizaciones, la disfunción inmunitaria es una enfermedad autoinmunitaria. En algunas realizaciones, la enfermedad autoinmunitaria es un trastorno reumatólgico autoinmunitario (que incluye artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, esclerodermia, lupus, tales como LES y nefritis lúpica, polimiositis-dermatomiositis, crioglobulinemia, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos y artropatía psoriásica), un trastorno gastrointestinal y hepático autoinmunitario (incluyendo enteropatías inflamatorias (por ejemplo, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), gastritis autoinmunitaria y anemia perniciosa, hepatitis autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria y celiaquía), vasculitis (incluyendo vasculitis ANCA negativa y vasculitis asociada a ANCA, incluyendo la vasculitis de Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener y poliangitis microscópica), un trastorno neurológico autoinmunitario (incluyendo esclerosis múltiple, síndrome de opsoclónia-mioclonía, miastenia grave, neuromielitis óptica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y polineuropatías autoinmunitarias), un trastorno renal (incluyendo glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture y enfermedad de Berger), un trastorno dermatológico autoinmunitario (incluyendo psoriasis, urticaria, habones, pénfigo vulgar, pénfigo ampolloso y lupus eritematoso cutáneo), un trastorno hematológico (incluyendo púrpura trombocitopénica, púrpura trombocitopénica trombótica, púrpura postransfusional y anemia hemolítica autoinmunitaria), aterosclerosis, uveítis, una enfermedad auditiva autoinmunitaria (incluida la enfermedad del oído interno y la pérdida auditiva), enfermedad de Behcet, síndrome de Raynaud, trasplante de órganos, o un trastorno endocrino autoinmunitario (incluidas las enfermedades autoinmunitarias relacionadas con la diabetes, como la diabetes sacarina insulinodependiente (IDDM), enfermedad de Addison y enfermedad tiroidea autoinmunitaria (incluyendo enfermedad de Grave y tiroiditis)).

En otras realizaciones, la muestra biológica es de un sujeto que tiene, está predispuesto a o se está sometiendo a ensayos para detectar cáncer. En determinadas realizaciones, el cáncer es cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) (incluyendo adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón), carcinoma, linfoma (incluyendo linfoma de Hodgkin y no Hodgkiniano), blastoma, sarcoma, leucemia, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, leucemia y otros trastornos linfoproliferativos o diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello. En realizaciones particulares, el cáncer es NSCLC. En algunas realizaciones, el NSCLC es adenocarcinoma de pulmón o carcinoma escamoso de pulmón. En algunas realizaciones, el NSCLC es NSCLC no escamoso o NSCLC escamoso.

G. Métodos terapéuticos basados en la presencia y/o nivel de expresión de PD-L1

También se divultan, pero no se reivindican como tal, métodos para tratar a un sujeto que padece un trastorno (p. ej., un cáncer o una disfunción inmunitaria) en función de la presencia y/o el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra obtenida del sujeto, como se determina utilizando un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención. En algunos casos, los métodos implican la administración de un tratamiento (por ejemplo, una terapia contra el cáncer) basado en la presencia y/o el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra obtenida del sujeto, como se determina utilizando un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención. En algunos casos, los métodos terapéuticos implican correlacionar la presencia y/o el nivel de expresión de PD-L1, como se determina utilizando un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención, con la probabilidad del sujeto de beneficiarse o responder a la terapia contra el cáncer, por ejemplo, como se describe en el presente documento.

Se divulga (pero no se reivindica como tal) un método para tratar a un sujeto que padece un trastorno (p. ej., un cáncer o una disfunción inmunitaria), comprendiendo el método: determinar la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra obtenida del sujeto poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención (p. ej., SP142) y detectando la presencia del anticuerpo unido; y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una terapia al sujeto.

También se divulga (pero no se reivindica como tal) un método para tratar a un sujeto que padece cáncer, comprendiendo el método: determinar la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra obtenida del sujeto poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención (p. ej., SP142) y detectando la presencia del anticuerpo unido; y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una terapia contra el cáncer. En algunos casos, la muestra se selecciona del grupo que consiste en una muestra de tejido, una muestra de sangre completa, una muestra de suero, o una muestra de plasma. En algunos casos, la muestra de tejido es una muestra tumoral. En algunos casos, la muestra tumoral comprende células inmunitarias infiltrantes de tumores, células tumorales, células del estroma, y cualquier combinación de las mismas. En cualquiera de los métodos anteriores, la muestra tumoral puede tener un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumores que comprende aproximadamente un 1 % o más (p. ej., aproximadamente un 1 % o más, aproximadamente un 2 % o más, aproximadamente un 3 % o más, aproximadamente un 4 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más,

aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 50 % o más, aproximadamente un 55 % o más, aproximadamente un 60 % o más, aproximadamente un 65 % o más, aproximadamente un 70 % o más, aproximadamente un 80 % o más, aproximadamente un 85 % o más, aproximadamente un 90 % o más, aproximadamente un 95 % o más, o aproximadamente un 99 % o más) de la muestra tumoral, por ejemplo, por área.

aproximadamente un 35 %, de aproximadamente un 1 % a menos de aproximadamente un 30 %, de aproximadamente un 1 % a menos de aproximadamente un 25 %, de aproximadamente un 1 % a menos de aproximadamente un 20 %, de aproximadamente un 1 % a menos de aproximadamente un 15 %, de aproximadamente un 1 % a menos de aproximadamente un 10 %, de aproximadamente un 1 % a menos de aproximadamente un 5 %, de aproximadamente un 5 % a menos de aproximadamente un 95 %, de aproximadamente un 5 % a menos de aproximadamente un 90 %, de aproximadamente un 5 % a menos de aproximadamente un 85 %, de aproximadamente un 5 % a menos de aproximadamente un 80 %, de aproximadamente un 5 % a menos de aproximadamente un 75 %, de aproximadamente un 5 % a menos de aproximadamente un 70 %, de aproximadamente un 5 % a menos de aproximadamente un 65 %, de aproximadamente un 5 % a menos de aproximadamente un 60 %, de aproximadamente un 5 % a menos de aproximadamente un 55 %, de aproximadamente un 5 % a menos de aproximadamente un 50 %, de aproximadamente un 5 % a menos de aproximadamente un 40 %, de aproximadamente un 5 % a menos de aproximadamente un 35 %, de aproximadamente un 5 % a menos de aproximadamente un 30 %, de aproximadamente un 5 % a menos de aproximadamente un 25 %, de aproximadamente un 5 % a menos de aproximadamente un 20 %, de aproximadamente un 5 % a menos de aproximadamente un 15 %, de aproximadamente un 5 % a menos de aproximadamente un 10 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 95 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 90 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 85 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 80 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 75 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 70 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 65 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 60 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 55 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 50 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 40 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 35 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 30 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 25 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 20 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 15 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 10 %, de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 5 % de las células tumorales en la muestra tumoral. Por ejemplo, en algunos casos, la muestra tumoral puede tener un nivel de expresión detectable de PD-L1 en aproximadamente un 1 % o más a menos de un 5 % de las células tumorales en la muestra tumoral. En otros casos, el tumor puede tener un nivel de expresión detectable de PD-L1 en aproximadamente un 5 % o más a menos de un 10 % de las células tumorales en la muestra tumoral. En otros casos, el tumor puede tener un nivel de expresión detectable de PD-L1 en aproximadamente un 10 % o más de las células tumorales en la muestra tumoral.

En cualquiera de los métodos anteriores, el cáncer puede ser el cáncer puede ser cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) (incluyendo adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón), cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, leucemia y cáncer de cabeza y cuello. En algunos casos, el cáncer es NSCLC. En algunos casos, el NSCLC es adenocarcinoma de pulmón o carcinoma escamoso de pulmón. En algunos casos, el NSCLC es NSCLC no escamoso o NSCLC escamoso.

En cualquiera de los métodos anteriores, la terapia contra el cáncer puede incluir un antagonista de unión al eje de PD-1. En algunos casos, el método puede incluir administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-1 basado en el nivel de expresión de PD-L1 en células tumorales y/o en células inmunitarias infiltrantes de tumores en una muestra tumoral. El antagonista de unión al eje de PD-1 puede ser cualquier antagonista de unión al eje de PD-1 conocido en la técnica o descrito en el presente documento.

Por ejemplo, en algunos casos, el antagonista de unión al eje de PD-1 incluye un antagonista de unión a PD-1, un antagonista de unión a PD-L1 y un antagonista de unión a PD-L2. PD-1 (muerte programada 1) también se denomina en la técnica "muerte celular programada 1", "PDCD1", "CD279", y "SLEB2". Un ejemplo de PD-1 humana se muestra en el número de registro de UniProtKB/Swiss-Prot Q15116. PD-L1 (ligando 1 de muerte programada) también se denomina en la técnica "ligando 1 de muerte celular programada 1", "PDCD1LG1", "CD274", "B7-H", y "PDL1". Un ejemplo de PD-L1 humano se muestra en el número de registro de UniProtKB/Swiss-Prot N.º Q9NZQ7.1. PD-L2 (ligando 2 de muerte programada) también se denomina en la técnica "ligando 2 de muerte celular programada 1", "PDCD1LG2", "CD273", "B7-DC", "Btdc", y "PDL2". Un ejemplo de PD-L2 humana se muestra en el número de registro de UniProtKB/Swiss-Prot Q9BQ51. En algunos casos, PD-1, PD-L1 y PD-L2 son PD-1, PD-L1 y PD-L2 humanos.

En algunos casos, un antagonista de unión a PD-1 es una molécula que inhibe la unión de PD-1 a sus compañeros de unión al ligando. En un aspecto específico, los compañeros de unión al ligando de PD-1 son PD-L1 y/o PD-L2. En otro caso, un antagonista de unión a PD-L1 es una molécula que inhibe la unión de PD-L1 a sus ligandos de unión. En un aspecto específico, los compañeros de unión de PD-L1 son PD-1 y/o B7-1. En otro caso, un antagonista de unión a PD-L2 es una molécula que inhibe la unión de PD-L2 a sus compañeros de unión al ligando. En un aspecto específico, el compañero unión al ligando PD-L2 es PD-1. El antagonista puede ser un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno del mismo, una inmunoadhesina, una proteína de fusión o un oligopéptido.

- En algunos casos, el antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 (por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo químérico), por ejemplo, como se describe a continuación. En algunos casos, el anticuerpo anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste en MDX-1106 (nivolumab), MK-3475 (pembrolizumab),
- 5 MEDI-0680 (AMP-514), PDR001, REGN2810 y BGB-108. MDX-1106, también conocido como MDX-1106-04, ONO-4538, BMS-936558, o nivolumab, es un anticuerpo anti-PD-1 descrito en el documento WO2006/121168. MK-3475, también conocido como pembrolizumab o lambrolizumab, es un anticuerpo anti-PD-1 descrito en el documento WO 2009/114335. En algunos casos, el antagonista de unión a PD-1 es una inmunoadhesina (por ejemplo, una inmunoadhesina que comprende una porción extracelular o de unión a PD-1 de PD-L1 o PD-L2 fusionada a una región
- 10 constante (por ejemplo, una región Fc de una secuencia de inmunoglobulina). En algunos casos, el antagonista de unión a PD-1 es AMP-224. AMP-224, también conocido como B7-DC Ig, es un receptor soluble de fusión PD-L2-Fc descrito en los documentos WO 2010/027827 y WO 2011/066342.
- En algunos casos, el anticuerpo anti-PD-1 es MDX-1106. Los nombres alternativos para "MDX-1106" incluyen MDX-1106-04, ONO-4538, BMS-936558 y nivolumab. En algunos casos, el anticuerpo anti-PD-1 es nivolumab (número de registro CAS: 946414-94-4).
- 15 En algunos casos, el antagonista de unión al eje de PD-1 es un antagonista de unión a PD-L2. En algunos casos, el antagonista de unión a PD-L2 es un anticuerpo anti-PD-L2 (por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo químérico). En algunos casos, el antagonista de unión a PD-L2 es una inmunoadhesina.
- En algunos casos, el antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1. En algunos casos, el anticuerpo anti-PD-L1 es capaz de inhibir la unión entre PD-L1 y PD-1 y/o entre PD-L1 y B7-1. En algunos casos, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal. En algunos casos, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en fragmentos Fab, Fab'-SH, Fv, scFv y (Fab')₂. En algunos casos, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo humanizado. En algunos casos, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo humano. En algunos casos, el anticuerpo anti-PD-L1 se selecciona del grupo que consiste en YW243.55.S70, MPDL3280A (atezolizumab), MDX-1105, MEDI4736 (durvalumab) y MSB0010718C (avelumab). El anticuerpo YW243.55.S70 es un anti-PD-L1 descrito en el documento WO 2010/077634 y en la patente de los Estados Unidos n.º 8.217.149. MDX-1105, también conocido como BMS-936559, es un anticuerpo anti-PD-L1 descrito en el documento WO 2007/005874. MEDI4736 es un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 descrito en los documentos WO 2011/066389 y US 2013/034559. Los ejemplos de anticuerpos anti-PD-L1 útiles para los métodos de esta invención y los métodos para producirlos se describen en la solicitud de patente de PCT WO 2010/077634, en los documentos WO 2007/005874 y WO 2011/066389, en la patente de los Estados Unidos n.º 8.217.149 y en el documento US 2013/034559.
- 35 En cualquiera de los casos anteriores, el anticuerpo anti-PD-L1 aislado puede unirse a un PD-L1 humano, por ejemplo, un PD-L1 humano como se muestra en el n.º de registro de UniProtKB/Swiss-Prot Q9NZQ7.1, o una variante del mismo.
- 40 En otra realización adicional, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de los anticuerpos de la invención, como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, el ácido nucleico comprende además un vector adecuado para la expresión del ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 descritos anteriormente. En un aspecto aún más específico, el vector está en una célula hospedadora adecuada para la expresión del ácido nucleico. En un aspecto aún más específico, la célula hospedadora es una célula eucariota o una célula procariota. En un aspecto aún más específico, la célula eucariota es una célula de mamífero, tal como célula de ovario de hámster chino (CHO).
- 45 El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede prepararse utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante un proceso que comprende cultivar una célula hospedadora que contiene ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1, o fragmento de unión a antígeno descritos anteriormente en una forma adecuada para la expresión, en condiciones adecuadas para producir dicho anticuerpo o fragmento, y recuperar el anticuerpo o fragmento. Se contempla expresamente que dichos anticuerpos antagonistas de unión al eje de PD-1 (por ejemplo, anticuerpos anti-PD-L1, anticuerpos anti-PD-1 y anticuerpos anti-PD-L2) u otros anticuerpos descritos en el presente documento (por ejemplo, anticuerpos anti-PD-L1 para la detección de niveles de expresión de PD-L1) para su uso en cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente pueden tener cualquiera de las características, por separado o en combinación, descritas en las subsecciones 1-5 de la sección A, "Anticuerpos anti-PD-L1 ilustrativos".
- 50 En algunos casos (no reclamados como tales), cualquiera de los métodos anteriores incluye además la administración al paciente de una cantidad eficaz de un segundo agente terapéutico. En algunos casos, el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un agente citotóxico, un agente inhibidor del crecimiento, un agente de radioterapia, un agente antiangiogénico y combinaciones de los mismos.
- 55 Las composiciones utilizadas en los métodos descritos en el presente documento (por ejemplo, agentes terapéuticos contra el cáncer) pueden administrarse mediante cualquier método adecuado, que incluye, por ejemplo, vía intravenosa, vía intramuscular, vía subcutánea, vía intradérmica, vía percutánea, vía intraarterial, vía intraperitoneal,

vía intralesional, vía intracraneal, vía intraarticular, vía intraprostática, vía intrapleural, vía intratraqueal, vía intratecal, vía intranasal, vía intravaginal, vía intrarrectal, vía tópica, vía intratumoral, vía peritoneal, vía subconjuntiva, vía intravesicular, vía mucosa, vía intrapericárdica, vía intraumbilical, vía intraocular, vía intraorbital, vía oral, vía tópica, vía transdérmica, por vía intravítreo (p. ej., mediante inyección intravítreo), por gotas en los ojos, por inhalación, mediante inyección, mediante implante, mediante infusión, mediante infusión continua, mediante perfusión localizada bañando directamente las células diana, mediante catéter, mediante lavado, en cremas o en composiciones lipídicas. Las composiciones utilizadas en los métodos descritos en presente documento también pueden administrarse sistémicamente o localmente. El método de administración puede variar dependiendo de varios factores (por ejemplo, el compuesto o composición que se administra y la gravedad de la afección, enfermedad o trastorno que se esté tratando). En algunos casos, la terapia contra el cáncer (por ejemplo, un antagonista de unión al eje de PD-1) se administra por vía intravenosa, vía intramuscular, vía subcutánea, vía tópica, vía oral, vía transdérmica, vía intraperitoneal, vía intraorbital, mediante implante, por inhalación, vía intratecal, vía intraventricular o vía intranasal. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. Se contemplan en el presente documento varias pautas posológicas que incluyen, pero sin limitación administraciones individuales o múltiples a lo largo de varios puntos de tiempo, administración embolada e infusión pulsada.

Agentes terapéuticos (p. ej., antagonistas de unión al eje de PD-1 (p. ej., un anticuerpo, polipéptido de unión y/o molécula pequeña)) descritos en el presente documento pueden formularse, dosificarse y administrarse de una forma acorde con la buena práctica médica. Los factores a tener en cuenta en este contexto incluyen el trastorno particular que se va a tratar, el mamífero particular que se va a tratar, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el lugar donde se va a suministrar el agente, el método de administración, la pauta de administración y otros factores conocidos por los profesionales sanitarios. El agente terapéutico (p. ej., un antagonista de unión al eje de PD-1) no necesita, pero opcionalmente se formula con y/o se administra concurrentemente con uno o más agentes usados en la actualidad para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de estos otros agentes depende de la cantidad del agente terapéutico (p. ej., un antagonista de unión al eje de PD-1) presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Estos se usan generalmente con las mismas dosis y por vías de administración como las descritas en el presente documento o de aproximadamente el 1 al 99 % de las dosis descritas en el presente documento o en cualquier dosis y por cualquier vía que se haya determinado empíricamente/clínicamente como adecuada.

Para la prevención o el tratamiento de un cáncer (p. ej., un cáncer de pulmón no microcítico), la dosis adecuada de un agente terapéutico (p. ej., un antagonista de unión al eje de PD-1) descrito en presente documento(cuando se usa solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad a tratar, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el agente terapéutico (p. ej., antagonista de unión al eje de PD-1) se administra con fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, historial clínico del paciente y la respuesta al agente terapéutico (p. ej., antagonista de unión al eje de PD-1) y el criterio del médico a cargo del tratamiento. El agente terapéutico (p. ej., antagonista de unión al eje de PD-1) se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Una dosificación diaria habitual estará en el intervalo de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, se continuará generalmente con el tratamiento hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Dichas dosis pueden administrarse de manera intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de tal forma que el paciente recibe, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente veinte o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del agente terapéutico (p. ej., antagonista de unión al eje de PD-1)). Puede administrarse una dosis inicial de carga más alta, seguida de una o más dosis más bajas. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Por ejemplo, como regla general, la cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo antagonista (p. ej., un anticuerpo antagonista de unión al eje de PD-1) administrado a seres humanos estará en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal del paciente, ya sea en una o varias administraciones. En algunos casos, el anticuerpo se usa a de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 45 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 35 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, o de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg administrados diariamente, semanalmente, cada dos semanas, cada tres semanas o mensualmente, por ejemplo. En algunos casos, el anticuerpo se administra a 15 mg/kg. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. En un caso, un anticuerpo antagonista (por ejemplo, un anticuerpo antagonista de unión al eje de PD-1) descrito en el presente documento se administra a un ser humano a una dosis de aproximadamente 100 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 600 mg, aproximadamente 700 mg, aproximadamente 800 mg, aproximadamente 900 mg, aproximadamente 1000 mg, aproximadamente 1100 mg, aproximadamente 1200 mg, aproximadamente 1300 mg, aproximadamente 1400 mg, aproximadamente 1500 mg, aproximadamente 1600 mg, aproximadamente 1700 mg o aproximadamente 1800 mg por día 1 de ciclos de 21 días (cada tres semanas, q3w). La

dosis se puede administrar como una dosis única o como dosis múltiples (por ejemplo, 2 o 3 dosis), como infusiones. La dosis del anticuerpo administrada en un tratamiento combinado puede reducirse en comparación con un solo tratamiento. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas convencionales.

- 5 En algunos casos (no reclamados como tales), los métodos implican además la administración al paciente de una cantidad eficaz de un segundo agente terapéutico. En algunos casos, el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, un agente de radioterapia, un agente antiangiogénico y combinaciones de los mismos. En algunos casos, un agente terapéutico (por ejemplo, antagonista de unión al eje de PD-1) puede administrarse junto con una quimioterapia o un agente quimioterapéutico. En algunos casos, se puede administrar un agente terapéutico (p. ej., antagonista de unión al eje de PD-1) junto con un agente de radioterapia. En algunos casos, un agente terapéutico (p. ej., antagonista de unión al eje de PD-1) puede administrarse junto con una terapia dirigida o un agente terapéutico dirigido. En algunos casos, un agente terapéutico (p. ej., antagonista de unión al eje de PD-1) puede administrarse junto con una inmunoterapia o un agente inmunoterapéutico, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal.
- 10 15 Dichas terapias combinadas indicadas anteriormente abarcan la administración combinada (donde se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o en formulaciones separadas) y la administración por separado, en cuyo caso, la administración de un agente terapéutico (p. ej., antagonista de unión al eje de PD-1) puede producirse antes de, de manera simultánea y/o después de, la administración del agente o los agentes terapéuticos adicionales.
- 20 25 En un caso, la administración de un agente terapéutico (p. ej., antagonista de unión al eje de PD-1) y la administración de un agente terapéutico adicional se producen en aproximadamente con una diferencia de un mes, o de aproximadamente un mes, dos o tres semanas o de aproximadamente uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis días, entre sí
- 30 35 Las formulaciones terapéuticas de los agentes terapéuticos (p. ej., antagonistas de unión al eje de PD-1) utilizados según la presente invención se preparan para el almacenamiento mezclando el antagonista que tiene el grado de pureza deseado con transportadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Para obtener información general en referencia a las formulaciones, véanse, por ejemplo, Gilman *et al.* (eds.) *The Pharmacological Bases of Therapeutics*, 8.^a edición, Pergamon Press, 1990; A. Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18.^a edición, Mack Publishing Co., Pennsylvania, 1990; Avis *et al.* (eds.) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications* Dekker, Nueva York, 1993; Lieberman *et al.* (eds.) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets* Dekker, Nueva York, 1990; Lieberman *et al.* (eds.), *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems* Dekker, Nueva York, 1990; y Walters (ed.) *Dermatological and Transdermal Formulations (Drugs and the Pharmaceutical Sciences)*, vol 119, Marcel Dekker, 2002.
- 40 45 Los transportadores, excipientes y/o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos, tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinal; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contralores formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).
- 50 55 La formulación en el presente documento también puede contener más de un compuesto activo, preferentemente los que tienen actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. El tipo y las cantidades eficaces de dichos medicamentos dependen, por ejemplo, de la cantidad y el tipo de antagonista presente en la formulación y los parámetros clínicos de los sujetos.
- 60 65 Los principios activos pueden inmovilizarse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divultan en Remington's *Pharmaceutical Sciences* 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980).
- 70 Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el antagonista, teniendo dichas matrices la forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), polilactidas (patente de los Estados Unidos n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, etilvinilacetato no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como la serie LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli-ácido D(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones que se van a utilizar para su administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se lleva a cabo fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

- 5 Se entiende que cualquiera de los artículos de fabricación anteriores puede incluir un inmunoconjungado descrito en el presente documento en lugar de o además de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 o un anticuerpo anti-PD-1.

III. Ejemplos

10 Lo siguiente son ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden ponerse en práctica varias realizaciones diferentes, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Ejemplo 1. Generación de anticuerpos anti-PD-L1

13 Se generaron anticuerpos monoclonales de conejo anti-PD-L1 como se muestra esquemáticamente en la figura 1. Brevemente, se sintetizó el fragmento peptídico de la región citoplásmica aminoterminal (restos de aminoácidos 279-290) de PD-L1 humano (SKKQSDTHLEET; SEQ ID NO: 1). El fragmento de 12 aminoácidos destinado a la inmunización se conjugó con hemocianina de lapa californiana (KLH, por sus siglas en inglés), una proteína transportadora ampliamente utilizada para estimular una respuesta inmune sustancial a través de la producción de anticuerpos. La adición de dos aminoácidos (Cys-Gly) al extremo aminoterminal natural de la secuencia permitió la conjugación con la proteína transportadora KLH. Se inmunizaron conejos blancos de Nueva Zelanda con antígeno PD-L1 conjugado con KLH emulsionado con adyuvante completo de Freund seguido de una serie de refuerzos con antígeno PD-L1 emulsionado con adyuvante incompleto de Freund. Las células que expresan anticuerpos se examinaron mediante ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) utilizando el antígeno PD-L1. Todos los clones positivos de ELISA se examinaron adicionalmente mediante inmunohistoquímica (IHC), y se seleccionó el clón que producía el anticuerpo con la especificidad más alta. Para la producción recombinante de anticuerpos anti-PD-L1, se clonó el ADNc que codifica las secuencias de cadena pesada y cadena ligera de los anticuerpos, se expresó por cotransfección, y se examinó para detectar la unión a PD-L1 (SEQ ID NO: 1) por IHC. El anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 (SP142) se produjo utilizando estos métodos y posteriormente se purificó mediante cromatografía de afinidad con proteína A. Las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera del anticuerpo SP142 son las siguientes.

Región variable de cadena pesada:

35
QSLEESGGRLVKPDET~~L~~TCTVSGIDLSSNGLTWVRQAPGEGLEWIGTINKDASAYYASWAKGRLTISKP
HVR-H1 HVR-H2
SSTKVDLKITSPTTEDTATYFCGRIAFKTGTSIWGPGLTVSS (SEQ ID NO: 16)
HVR-H3

Región variable de cadena ligera:

AI VMTQ TPSPVSA AVG GTVT INC QASES VY SNNYLS WF QQKPGQPPKLLI Y LAST LAS GVP SRFKGSGSG
HVR-L1 HVR-L2
TQFTLTISGVQCDDAATYYC|GGKSSSTDGNAFGGGTEVVVR (SEQ ID NO: 17)
HVR-L3

Ejemplo 2. Usos diagnósticos de anticuerpos anti-PD-L1

45 El anticuerpo anti-PD-L1 SP142 se usó en análisis adicionales IHC y de transferencia Western. Para los análisis IHC, las secciones de tejido se incubaron con SP142 durante 16 minutos, seguido de lavados convencionales y detección secundaria con anticuerpo de cabra biotinilado anticoncejo. La especificidad de SP142 se evaluó en células fijadas con formalina e incluidas en parafina (FFPE) con diferentes niveles de expresión de PD-L1 (células HEK-293 de riñón embrionario humano transfectadas con vector vacío como control (negativo), así como DOR-13 (expresión baja a media), células RKO de carcinoma de colon (expresión media), y células 293 transfectadas con PD-L1 (expresión alta); véanse las figuras 2A-2D) o de diferentes tipos de tejido (tejido placentario, tejido de amígdalas y linfoma de Hodgkin (HK); véanse las figuras 3A-3C). Para determinar adicionalmente la especificidad de SP142, el análisis de transferencia Western se realizó en lisados celulares de líneas celulares con diferentes niveles de expresión de PD-L1 (línea celular de adenocarcinoma de pulmón NIH H820 (expresión alta), línea celular de linfoma de linfocitos T Karpas 299 (expresión intermedia) y línea celular de adenocarcinoma de pulmón Calu-3 (control negativo); véase la

figura 4).

Ejemplo 3. Comparación del anticuerpo anti-PD-L1 SP142 con el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N

- 5 El anticuerpo anti-PD-L1 SP142 se comparó con el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N (tecnología de señalización celular) en análisis IHC de secciones de tejidos normales y tumorales, incluyendo tejidos de pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC). Brevemente, para los experimentos de IHC, los anticuerpos anti-PD-L1 tanto SP142 como E1L3N se diluyeron en serie (0,11 - 28 µg/ml). Los portaobjetos para las secciones de tejido se desparafinizaron utilizando una alternativa de xileno y alcohol graduado. La recuperación del antígeno se logró hirviendo secciones de 10 tejido en tampón EDTA (pH 8,0) durante 10 minutos seguido de enfriamiento a temperatura ambiente durante 20 minutos. Las secciones de tejido se incubaron con SP142 o E1L3N durante 10 minutos, seguido de lavados convencionales y detección secundaria con anticuerpo de cabra anticonejo durante 15 minutos. Se realizó una 15 incubación final con la molécula indicadora 3,3'-diaminobencidina (DAB) durante 10 minutos. Para evaluar la sensibilidad, se compararon diferentes concentraciones de E1L3N y SP142 en secciones de tejidos FFPE de tejido de placenta (véanse las figuras 5A-5J). La especificidad de E1L3N y SP142 se determinó utilizando tipos de tejido normal y tumoral (tejido epitelial de estómago, tejido nervioso, tejido renal, carcinoma de células transicionales de vejiga (TCC), carcinoma ductal de mama (Ca) y carcinoma de células escamosas de pulmón (SCCa de pulmón); véanse las 20 figuras 6A-6T y las figuras 7A-7J). También se realizó un análisis IHC en secciones de diferentes tipos de tejido FFPE teñidos con E1L3N o SP142 (tejido de amígdalas, carcinoma de células escamosas (SCC) de cuello uterino, linfoma de Hodgkin (linfoma HK), adenocarcinoma pancreático, adenocarcinoma de próstata y SCC cutáneo; véase la figura 25 8A-8L).

A continuación, se comparó la detección de la expresión de PD-L1 con E1L3N y SP142 en secciones de tejido FFPE de pacientes con NSCLC. E1L3N detectó 50 casos PD-L1 positivos de 119 muestras de NSCLC sin determinar previamente para el estado de PD-L1, y SP142 detectó 58 casos PD-L1 positivos, en donde el 5 % o más de las 30 células tumorales teñidas positivas se consideró indicativo de un caso PD-L1 positivo. Para evaluar adicionalmente la detección de PD-L1 con estos anticuerpos, las secciones de tejido FFPE de pacientes con NSCLC se tiñeron secuencialmente con E1L3N y SP142 (figuras 9A-9J). A continuación, se calculó el grado de inmunorreactividad de la membrana (es decir, la puntuación H) para las 119 secciones de tejido de pacientes con NSCLC teñidos con E1L3N o SP142. La puntuación H para PD-L1 se calculó con la siguiente fórmula: Puntuación H = 3(porcentaje de membrana que se tiñe intensamente) + 2(porcentaje de membrana que se tiñe moderadamente) + 1(porcentaje de membrana que se tiñe débilmente), facilitando así un intervalo de puntuación H de 0 a 300. La puntuación H media de estos 119 casos de NSCLC fue significativamente menor para E1L3N (56 ± 8) que para SP142 (100 ± 11). Estos datos colectivos demuestran que SP142 es más sensible y específico que E1L3N.

Ejemplo 4. El uso del anticuerpo anti-PD-L1 SP142 en análisis IHC demuestra la tinción de PD-L1 en células inmunitarias (IC) y células tumorales (TC)

- 40 El anticuerpo anti-PD-L1 SP142 detectó la expresión de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumores (CI) y células tumorales en casos representativos de todos los tipos de cáncer analizados (aproximadamente 28-30 tipos), incluyendo, pero sin limitación, el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), carcinoma de células escamosas del cuello uterino, linfoma HK, adenocarcinoma pancreático, adenocarcinoma de próstata y carcinoma de células escamosas de la piel (véase, por ejemplo, las figuras 8A-8L - 9A-9J, 10, 11, 15A-15B, 16A-16H y 18A-18F).

Células inmunitarias (CI)

50 Las células inmunitarias (CI) son células inmunitarias infiltrantes de tumores presentes en el estroma intratumoral y peritumoral contiguo que incluyen una población morfológicamente heterogénea de tipos celulares, incluyendo linfocitos, macrófagos, células dendríticas y células con morfología reticular. Se realizaron análisis IHC de secciones de tejido tumoral utilizando el anticuerpo SP142. En secciones de tejido tumoral, las IC PD-L1 positivas con frecuencia mostraban una tinción de membrana discontinua o punteada de color marrón oscuro en asociación con linfocitos (figura 10). Las CI PD-L1 positivas se observaron normalmente como agregados en el estroma intratumoral y peritumoral y/o como una células sueltas o diseminación difusa entre los grupos de células tumorales (agrupaciones de células tumorales basadas en la ubicación en la sección del tumor). También se observó tinción de IC PD-L1 positivas en la interfaz tumor-estroma, y como tinción reticular en estructuras linfoideas terciarias.

Células Tumorales (TC)

60 Además de las IC PD-L1 positivas descritas anteriormente, también se determinó que las células tumorales (TC) PD-L1 positivas estaban presentes en las muestras tumorales en los análisis IHC utilizando el anticuerpo SP142. Los TC PD-L1 positivas se caracterizaron normalmente por tinción de la membrana (figura 11), que ocasionalmente se asoció con tinción citoplasmática.

65 Los resultados demostraron que el anticuerpo SP-142 se puede usar para obtener una tinción de PD-L1 sensible y específica de secciones de tejido tumoral cuando se usa en análisis IHC de la expresión de PD-L1, y además reveló la presencia de IC PD-L1 positivas así como TC PD-L1 positivas en secciones de tejido tumoral.

Materiales y métodos

- 5 Las secciones de tejido FFPE se desparafinizaron y calentaron en tampón de recuperación de antígeno EDTA antes de añadir el anticuerpo monoclonal de conejo anti-PD-L1 humano (SP142) a las secciones de tejido. La IHC se procesó con un sistema de tinción automático (BenchMark ULTRA, Roche) o un sistema de tinción semiautomático (Autostainer, Thermo Scientific). La Tabla 2 muestra el protocolo utilizado para el sistema BenchMark ULTRA.

Tabla 2. Protocolo IHC para el sistema BenchMark ULTRA utilizando SP142

Selección de protocolo	BenchMark ULTRA
Herramientas de software	NexES v10.6
Procedimiento de tinción	U OptiView DAB IHC v4
Desparafinización	Seleccionada
Acondicionamiento celular	48 minutos CC1
Peroxidasa preprimaria	Seleccionada
Incubación primaria	16 minutos, 36 °C
Enlazador OptiView HQ	8 minutos
Multímetro OptiView HRP	8 minutos
Amplificación OptiView	Seleccionada
Amplificador y Amplificador H2O2	8 minutos
Multímetro de amplificación	8 minutos
Hematoxilina II	4 minutos
Reactivos Bluing	4 minutos

- 10 **Ejemplo 5. Determinación de la positividad de PD-L1 en IC, TC y combinaciones de las mismas**
- 15 Los tejidos teñidos con anticuerpos anti-PD-L1 (p. ej., cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención, p. ej., SP142) se pueden valorar para determinar la presencia de CI, TC, o combinaciones de IC y TC PD-L1 positivas utilizando diferentes puntos de corte (p. ej., 1 %, 5 %, 10 %, etc.). Estos diferentes puntos de corte se pueden utilizar para la estratificación de pacientes, por ejemplo, para la selección de pacientes que es probable que respondan a terapias contra el cáncer particulares (p. ej., terapia contra el cáncer que comprende un antagonista de unión al eje de PD-1).

20 Método de valoración de células inmunitarias

- 25 Las CI se pueden valorar para determinar la expresión de PD-L1 en función del porcentaje de área tumoral que está cubierta con IC PD-L1 positivas de cualquier intensidad (denominado en el presente documento "IC%"). El área tumoral como se usa en el presente documento, se refiere al área (p. ej., el área de una sección tumoral) ocupada por células tumorales así como su estroma peritumoral contiguo e intratumoral asociado (figuras 12A-12C). El área tumoral se eligió como denominador en este enfoque de valoración porque las IC estaban presentes no solo dentro del estroma sino que también estaban presentes, en algunos casos, como células sueltas o con una diseminación difusa dentro de las células tumorales. Como se describe a continuación, en algunos casos, se observaron IC como agregados dentro de la sección del tumor, mientras que en otros casos se observaron IC como focos de una o unas pocas células que se propagaron por la sección del tumor.

- 30 En la figura 13 se muestra un flujo de trabajo ilustrativo para determinar el IC% de una muestra tumoral. En algunos casos, se tiñeron secciones en serie de una muestra tumoral con H&E o con un anticuerpo anti-PD-L1 (p. ej., SP142), como se describe anteriormente. El primer paso en el flujo de trabajo fue revisar el portaobjetos teñido con H&E para determinar la presencia de un tumor, necrosis y/o IC. A continuación, el portaobjetos teñido con PD-L1 correspondiente se examinó con una potencia de aumento baja (p. ej., objetivo 2x o 4x; aumento total de 20x-40x), por ejemplo, utilizando un microscopio, y se evalúa el patrón de tinción general de PD-L1. Por ejemplo, se puede determinar si la sección de tejido tumoral presenta tinción de PD-L1 en IC, TC, tanto IC como TC, o si la sección de tejido tumoral no presenta una tinción sustancial de PD-L1. A continuación, el portaobjetos teñido con PD-L1 se examinó con una potencia de aumento mayor (p. ej., objetivo de 10x o 20x, aumento de 100x-200x) para examinar el estroma y los grupos de células tumorales para la tinción de IC. El uso de una potencia de aumento mayor permitió la confirmación de IC con tinción débil, así como distinguir IC en medio de una fuerte tinción de TC. Por último, el portaobjetos teñido con PD-L1 se examinó con un poder de aumento menor (p. ej., objetivo 2x o 4; aumento total 20-40x) para determinar o estimar el porcentaje de IC PD-L1 positivas (porcentaje del área tumoral que está cubierta con IC PD-L1 positivas de cualquier intensidad).

- 45 El porcentaje del área tumoral que está cubierta con CI PD-L1 positivas con cualquier intensidad de tinción de PD-L1 se puede determinar con un poder de aumento menor (p. ej., objetivo de 2x o 4x; aumento total de 20-40x) después de revisar y confirmar la tinción con un aumento mayor, por ejemplo, como se muestra en la figura 14. En los casos en que el patrón de tinción de IC se caracteriza por una propagación de células sueltas, las imágenes de referencia para intervalos particulares de tinción de IC (por ejemplo, 1 %, 5 %, 10 %) se puede usar a efectos de comparación

para estimar o determinar el porcentaje de área tumoral que está cubierta con IC PD-L1 positivas que tienen cualquier intensidad de tinción de PD-L1 (véanse las figuras 15A y 15B y 16A-16H, por ejemplo).

Método de valoración de células tumorales

5 Las células tumorales (TC) se pueden valorar para determinar la expresión de PD-L1 en función del porcentaje del número total de células tumorales que muestran cualquier tinción perceptible de PD-L1 de membrana de cualquier intensidad (también denominado en el presente documento "TC%"). Las TC se distinguen fácilmente de las IC según la morfología celular en portaobjetos teñidos con H&E e IHC. Véanse, por ejemplo, las figuras 17A-17C. La tinción de
10 la membrana debe ser visible como una tinción lineal (es decir, alineándose a lo largo del contorno de la membrana celular) incluso si se asocia con una calidad granular. Las Figuras 18A-18F muestran ejemplos de secciones de tejido tumoral de NSCLC teñidas con PD-L1 que presentaron intervalos particulares de tinción en TC de PD-L1 (es decir, TC% de < 5 %, ≥ 5 a < 50 %, o ≥ 50 %).

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Genentech, Inc. et al.

<120> ANTICUERPOS ANTI-PD-L1 Y USOS DIAGNÓSTICOS DE LOS MISMOS

20 <130> CMD/FP7305576

<150> EP 15728355.7

<151> 29/05/2015

25 <150> PCT/US2015/033395
<151> 29/05/2015

30 <150> US 62/023,741
<151> 11/07/2014

<160> 18

<170> PatentIn versión 3.5

35 <210> 1
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Construcción sintética

45 <400> 1

Ser	Lys	Lys	Gln	Ser	Asp	Thr	His	Leu	Glu	Glu	Thr
1				5					10		

<210> 2

<211> 5

50 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

55 <400> 2

Ser	Asn	Gly	Leu	Thr
1			5	

60 <210> 3

<211> 16

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 5 <400> 3

Thr	Ile	Asn	Lys	Asp	Ala	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Trp	Ala	Lys	Gly
1				5						10				15	

10 <210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 4

Ile	Ala	Phe	Lys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ile
1					5			

20 <210> 5
 <211> 29
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética

30 <400> 5

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

Leu	Thr	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Ile	Asp	Leu	Ser
					20				25			

35 <210> 6
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 6

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

45 <210> 7
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Construcción sintética

ES 2 916 923 T3

<400> 7

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Pro Ser Ser Thr Lys Val Asp Leu Lys Ile
1 5 10 15

Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Gly Arg
20 25 30

5 <210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 8

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

15

15 <210> 9
<211> 13
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

25 <400> 9

Gln Ala Ser Glu Ser Val Tyr Ser Asn Asn Tyr Leu Ser
1 5 10

30 <210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 10

Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

40 <210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 11

Ile Gly Gly Lys Ser Ser Ser Thr Asp Gly Asn Ala
1 5 10

ES 2 916 923 T3

5 <210> 12
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

15 <400> 12
 Ala Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly
 1 5 10 15

 Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys
 20

20 <210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Construcción sintética
20 <400> 13

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

30 <210> 14
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Construcción sintética

40 <400> 14

 Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr
 1 5 10 15

 Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

45 <210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
40 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Construcción sintética

45 <400> 15

 Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Arg
 1 5 10

50 <210> 16
 <211> 115

ES 2 916 923 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Construcción sintética

<400> 16

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

Leu Thr Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Asn Gly
20 25 30

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

Thr Ile Asn Lys Asp Ala Ser Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Pro Ser Ser Thr Lys Val Asp Leu Lys Ile
65 70 75 80

Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Gly Arg Ile
85 90 95

Ala Phe Lys Thr Gly Thr Ser Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

10

<210> 17

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 17

20

ES 2 916 923 T3

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

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Ser Val Tyr Ser Asn
20 25 30

Asn Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
35 40 45

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

Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val
65 70 75 80

Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ile Gly Gly Lys Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Asp Gly Asn Ala Phe Gly Gly Thr Glu Val Val Val Arg
100 105 110

5 <210> 18
<211> 290
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 18

ES 2 916 923 T3

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
1 5 10 15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
35 40 45

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
50 55 60

Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
65 70 75 80

Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
100 105 110

Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
130 135 140

Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
145 150 155 160

Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
165 170 175

ES 2 916 923 T3

Gly Lys Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
180 185 190

Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
195 200 205

Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
210 215 220

Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
225 230 235 240

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
245 250 255

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
260 265 270

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
275 280 285

Glu Thr
290

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-L1, en donde el anticuerpo comprende las siguientes HVR:
 - 5 (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SNGLT (SEQ ID NO: 2);
 (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de TINKDASAYYASWAKG (SEQ ID NO: 3);
 (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de IAFKTGTSI (SEQ ID NO: 4);
 (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QASESVYSNNYLS (SEQ ID NO: 9);
 (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de LASTLAS (SEQ ID NO: 10); y
 (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de IGGKSSSTDGNA (SEQ ID NO: 11).
 - 10 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende además las siguientes FR de dominio variable de cadena pesada (VH):
 - 15 (a) FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QSLEESGGRLVKPDETLTITCTVSGIDLS (SEQ ID NO: 5);
 (b) FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGEGLEWIG (SEQ ID NO: 6);
 (c) FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RLTISKPSSTKVDLKITSPTTEDTATYFCGR (SEQ ID NO: 7); y
 - 20 (d) FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGPGTLTVSS (SEQ ID NO: 8); y/o las siguientes FR de dominio variable de cadena ligera (VL):
 - (e) FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de AIVMTQTSPSPVSAAVGGTVTINC (SEQ ID NO: 12);
 (f) FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WFQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO: 13);
 - 25 (g) FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFKGSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYC (SEQ ID NO: 14); y
 (h) FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGGGTEVVVR (SEQ ID NO: 15).
 - 30 3. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende (a) una secuencia VH que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 16; (b) una secuencia VL que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 17; o (c) una secuencia VH como en (a) y una secuencia VL como en (b).
 - 35 4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el anticuerpo comprende una secuencia VH del SEQ ID NO: 16 y una secuencia VL del SEQ ID NO: 17.
 - 5 5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde:
 - 40 (a) el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, opcionalmente en donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal de conejo;
 (b) el anticuerpo es un anticuerpo IgG; o
 (c) el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a PD-L1, opcionalmente en donde el fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un Fab, fragmento variable monocatenario (scFv), Fv, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ y diacuerdo.
 - 45 6. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
 7. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 6.
 8. Una célula hospedadora que comprende el vector de la reivindicación 7.
 - 50 9. Un inmunoconjulado que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
 10. El uso del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para detectar la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra biológica, opcionalmente en donde:
 - 55 (a) la detección es por inmunohistoquímica (IHC), inmunofluorescencia (IF), citometría de flujo, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o inmunotransferencia;
 (b) la muestra comprende un tejido fijado, opcionalmente, en donde el tejido fijado es un tejido fijado en formalina e incluido en parafina (FFPE); y/o
 - 60 (c) la muestra procede de un sujeto que tiene, o está en riesgo de tener, un cáncer o una disfunción inmunitaria, opcionalmente en donde la disfunción inmunitaria es un trastorno disfuncional de linfocitos T; opcionalmente en donde adicionalmente el trastorno disfuncional de linfocitos T es una infección aguda no resuelta, infección crónica o inmunidad tumoral.
 - 65 11. Un método para detectar la presencia o el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra biológica que comprende poner en contacto la muestra biológica con el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y detectar la

presencia del anticuerpo unido.

5 12. El método de la reivindicación 11, en donde la muestra es una muestra tumoral, opcionalmente en donde la muestra tumoral comprende células inmunitarias infiltrantes de tumores, células tumorales, células del estroma o una combinación de las mismas; opcionalmente en donde adicionalmente:

10 (a) la muestra tumoral tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumores que comprende aproximadamente un 1 % o más, aproximadamente un 5 % o más, o aproximadamente un 10 % o más de la muestra tumoral por área;

y/o

15 (b) la muestra tumoral tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en aproximadamente un 1 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 10 % o más, o aproximadamente un 50 % o más de las células tumorales en la muestra tumoral.

15 13. El método de la reivindicación 11, en donde:

(a) la detección es por IHC, IF, citometría de flujo, ELISA, o inmunotransferencia;

(b) la muestra comprende un tejido fijado, opcionalmente en donde el tejido fijado es un tejido FFPE;

20 (c) la muestra procede de un sujeto que tiene, o está en riesgo de tener, un cáncer o una disfunción inmunitaria, opcionalmente en donde la disfunción inmunitaria es un trastorno disfuncional de linfocitos T; opcionalmente en donde adicionalmente el trastorno disfuncional de linfocitos T es una infección aguda no resuelta, infección crónica o inmunidad tumoral; y/o

(d) la muestra es de un sujeto que tiene cáncer, opcionalmente en donde

25 el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, leucemia y cáncer de cabeza y cuello, opcionalmente en donde el NSCLC es adenocarcinoma de pulmón o carcinoma escamoso de pulmón.

30 14. El método de las reivindicaciones 12 o 13, en donde el sujeto es un ser humano.

35 15. El método de la reivindicación 11, en donde:

(a) el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal de conejo que comprende una secuencia VH del SEQ ID NO: 16 y una secuencia VL del SEQ ID NO: 17;

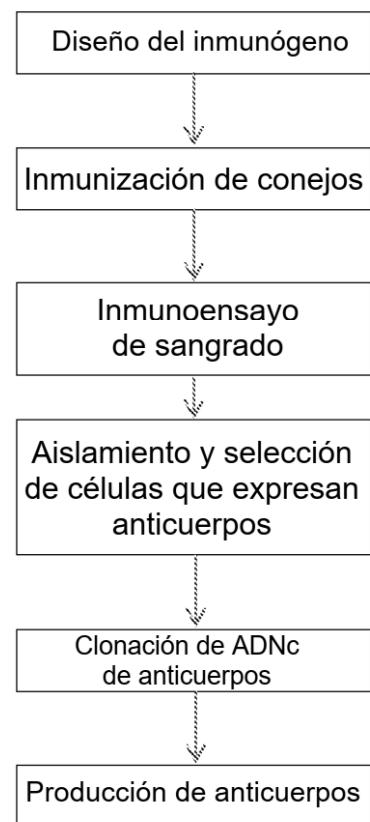
40 (b) el nivel de expresión de PD-L1 se detecta en células tumorales, células inmunitarias infiltrantes de tumores, o combinaciones de las mismas;

(c) la detección es por IHC;

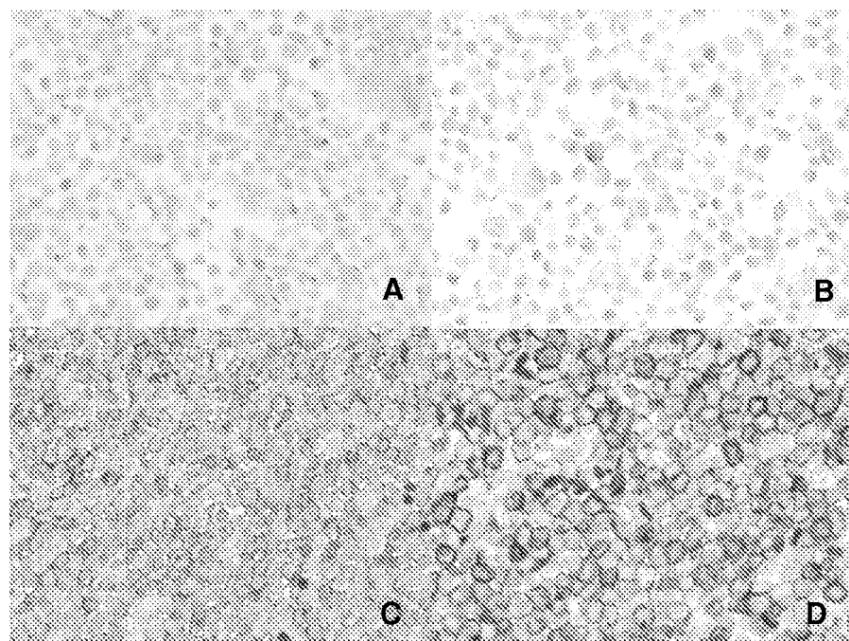
(d) la muestra comprende tejido FFPE; y

(e) el sujeto es un ser humano.

Figura 1



Figuras 2A-2D



Figuras 3A-3C

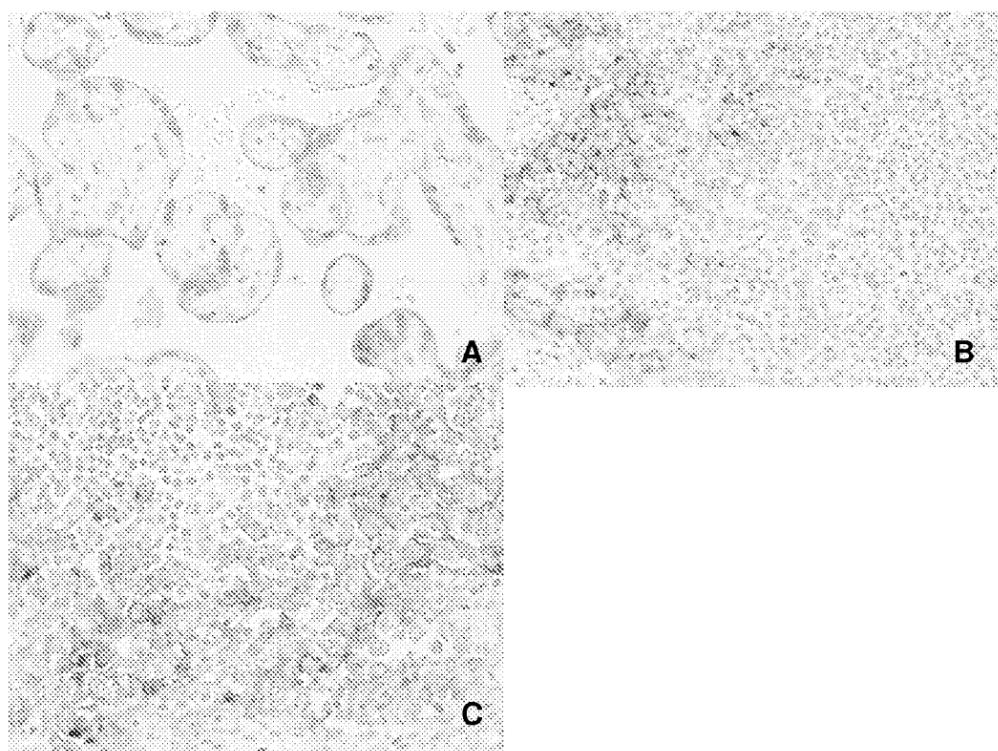
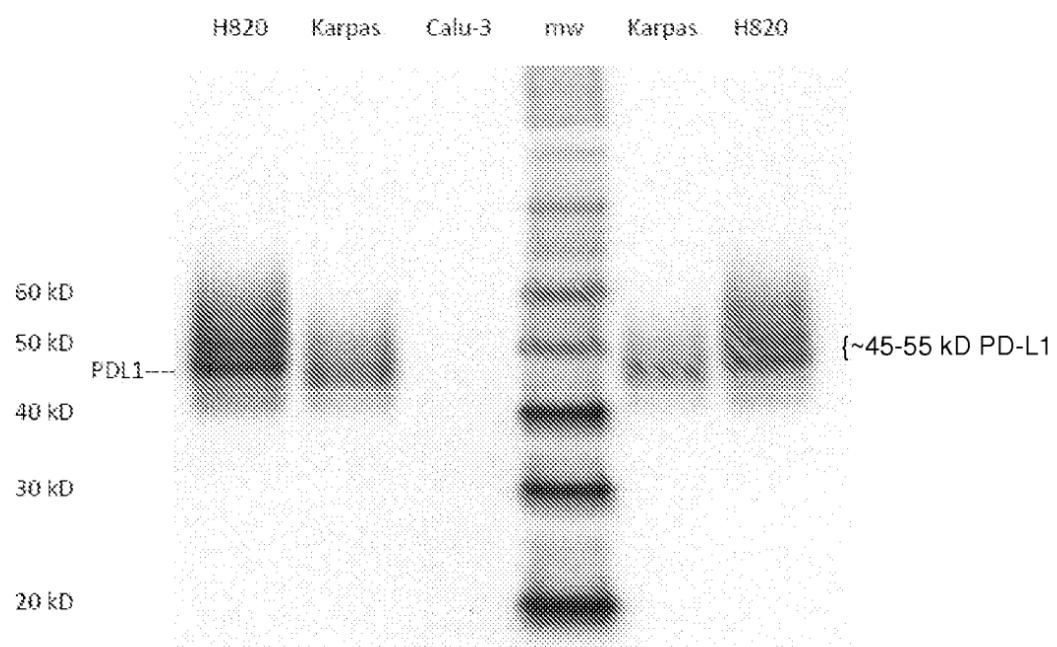
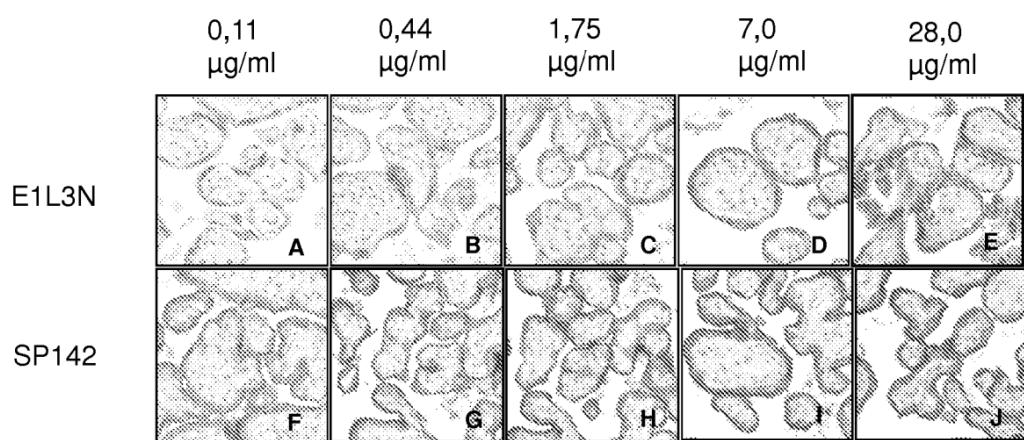


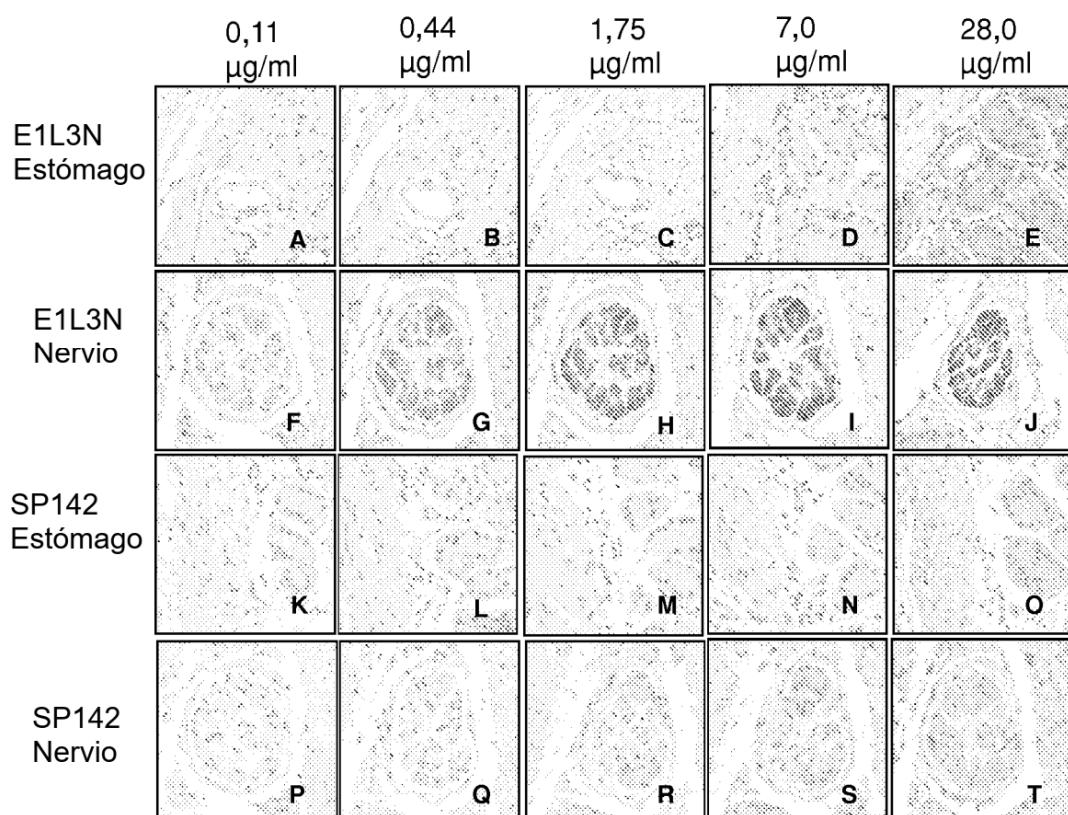
Figura 4



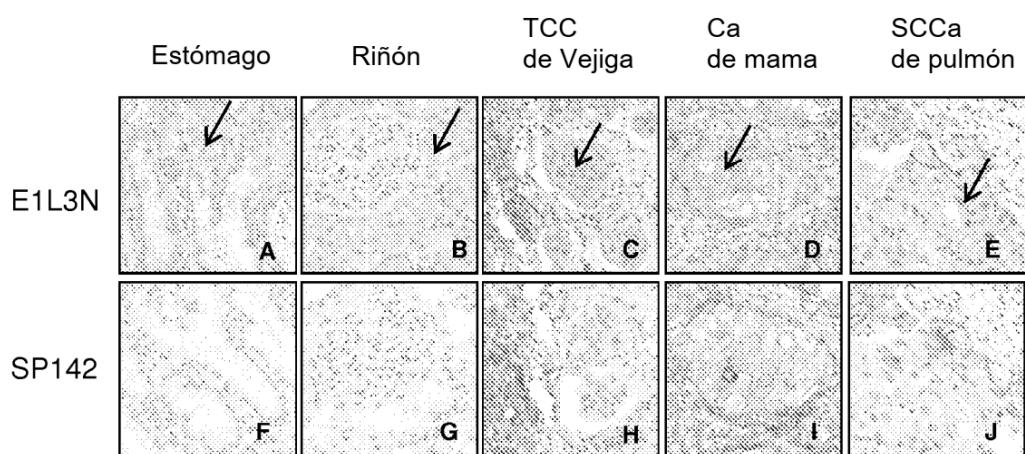
Figuras 5A-5J



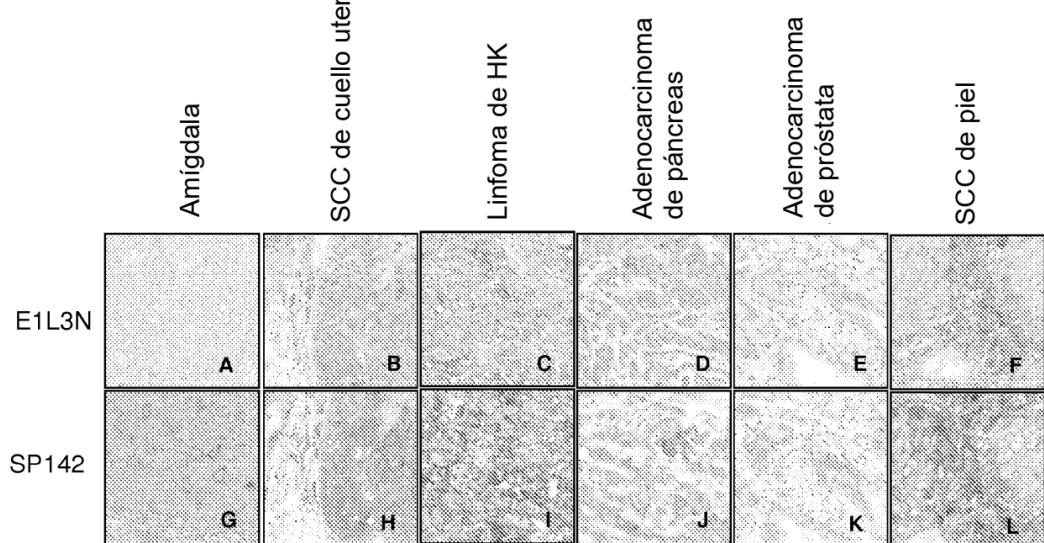
Figuras 6A-6T



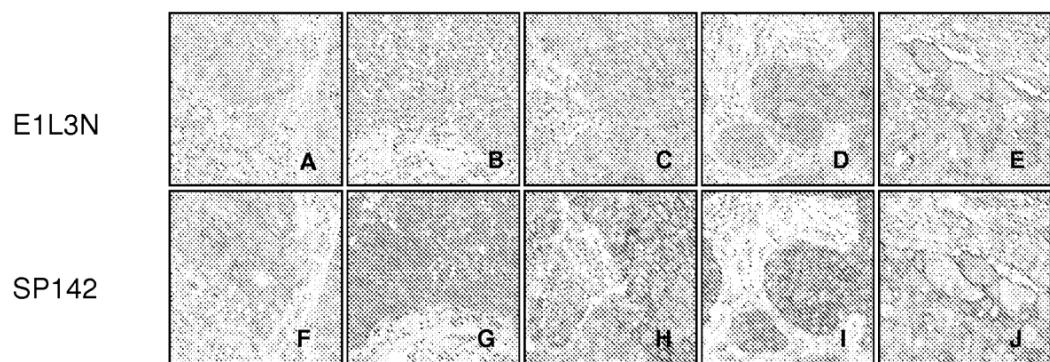
Figuras 7A-7J



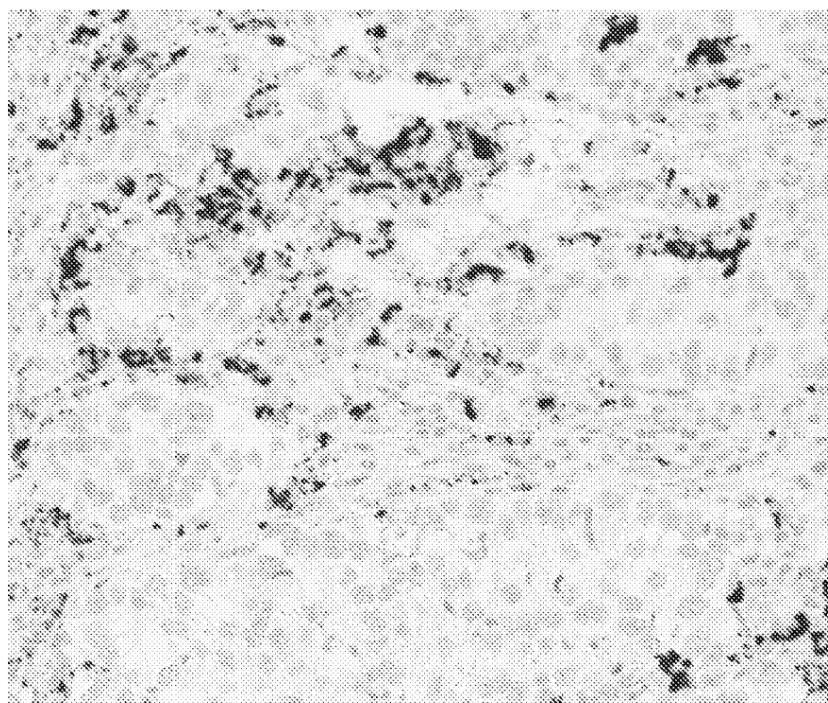
Figuras 8A-8L



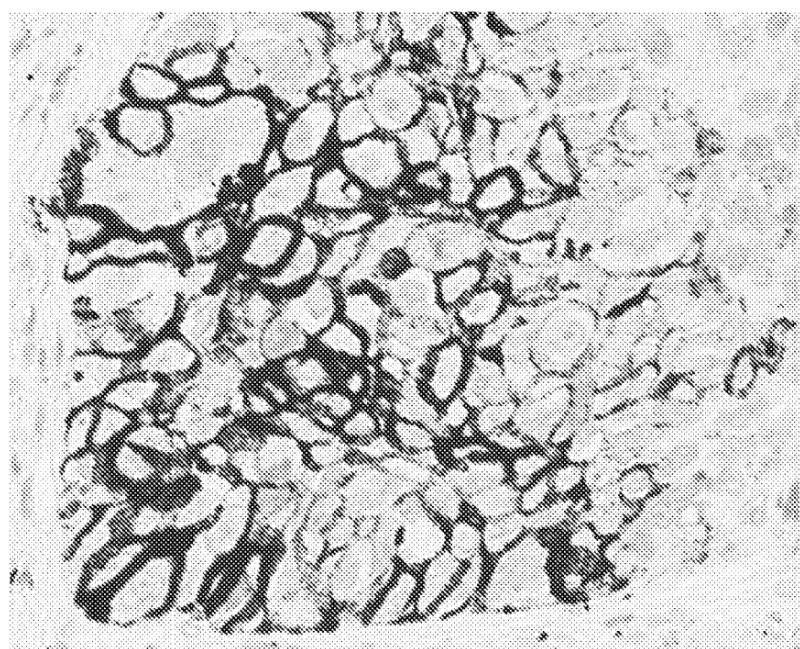
Figuras 9A-9J



Figuras 10



Figuras 11



Figuras 12A-12C

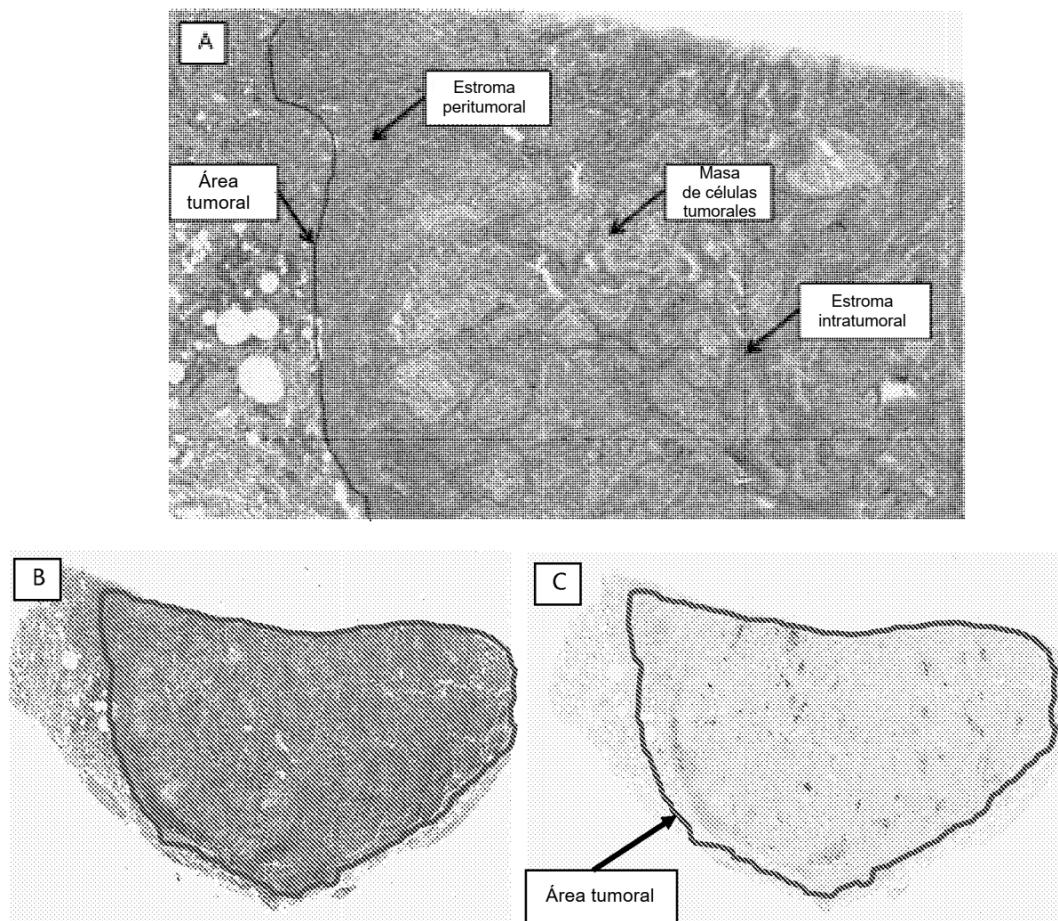
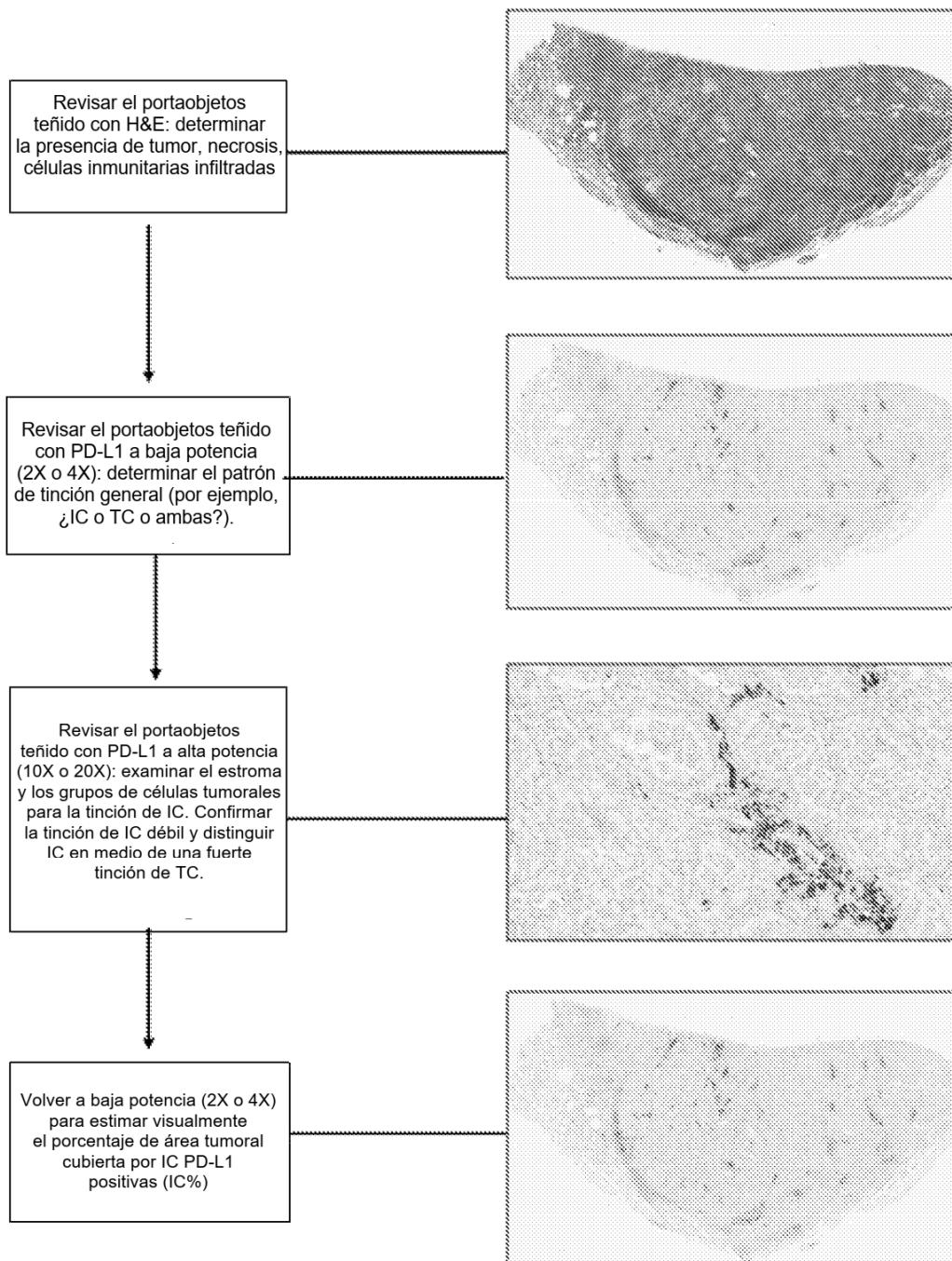
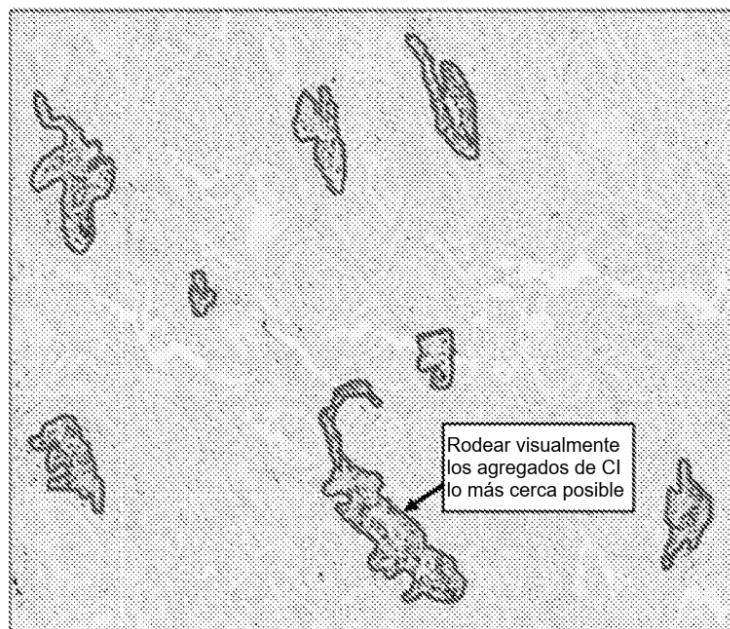


Figura 13

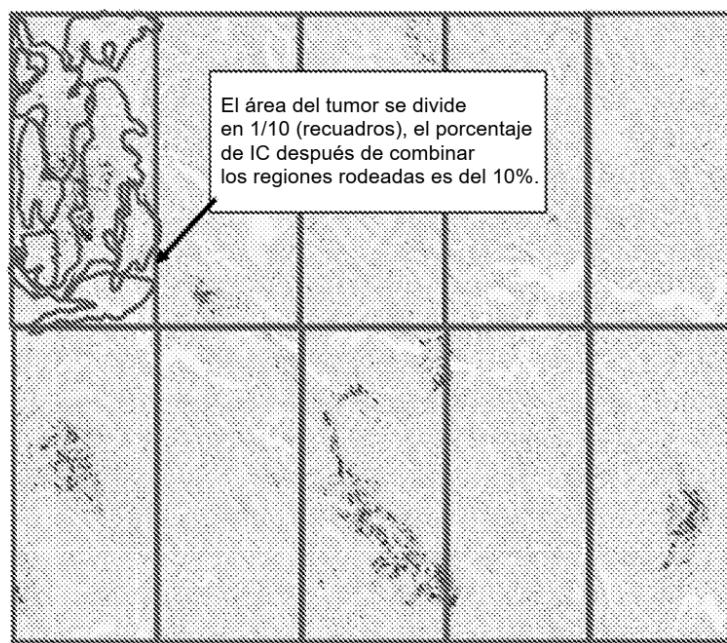


Figuras 14A-14B

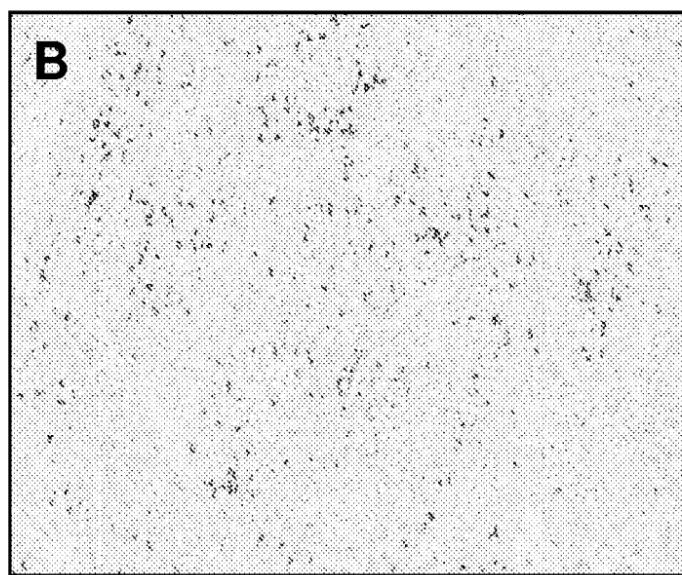
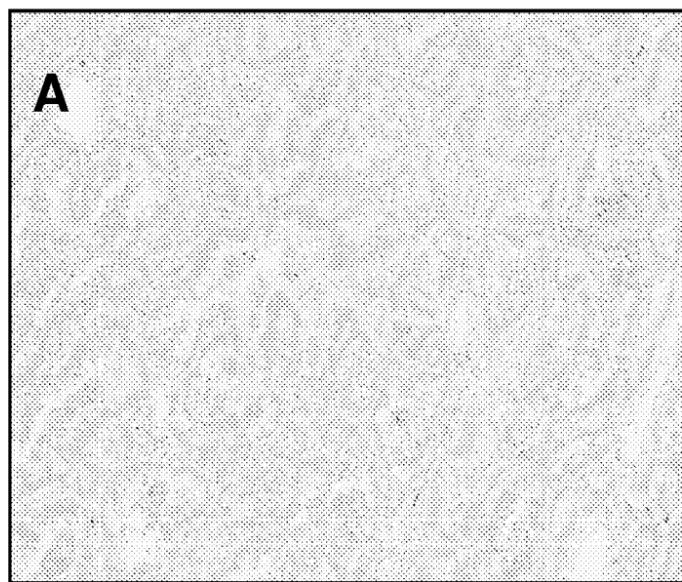
A.



B.



Figuras 15A-15B



Figuras 16A-16B

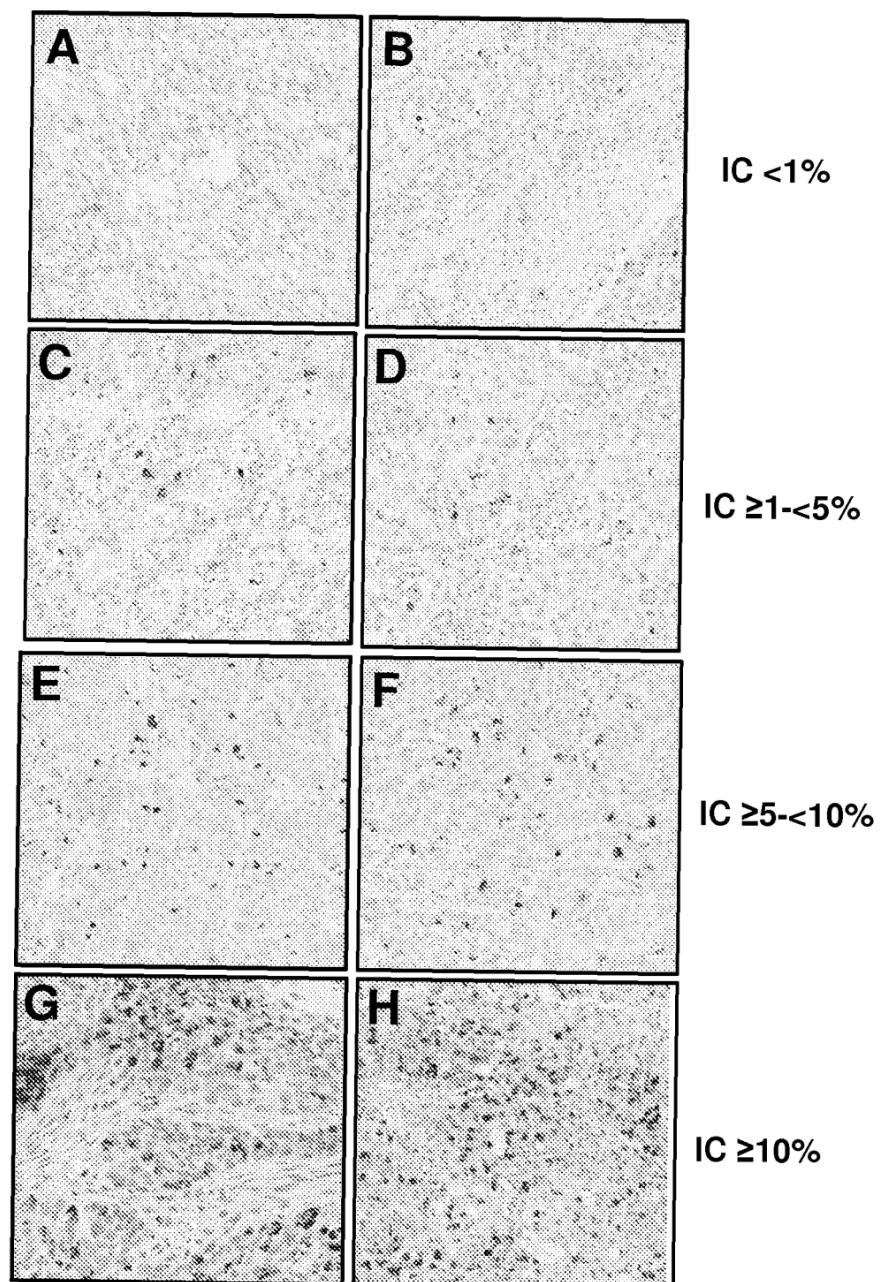


Figura 17A

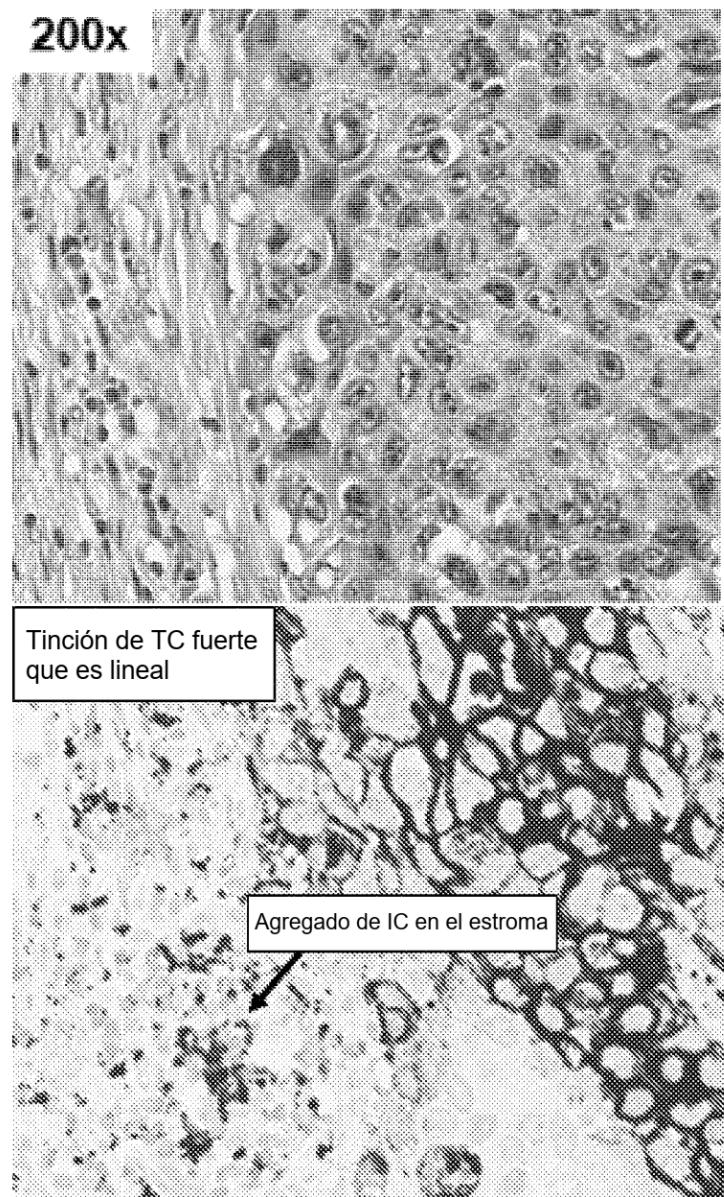


Figura 17B

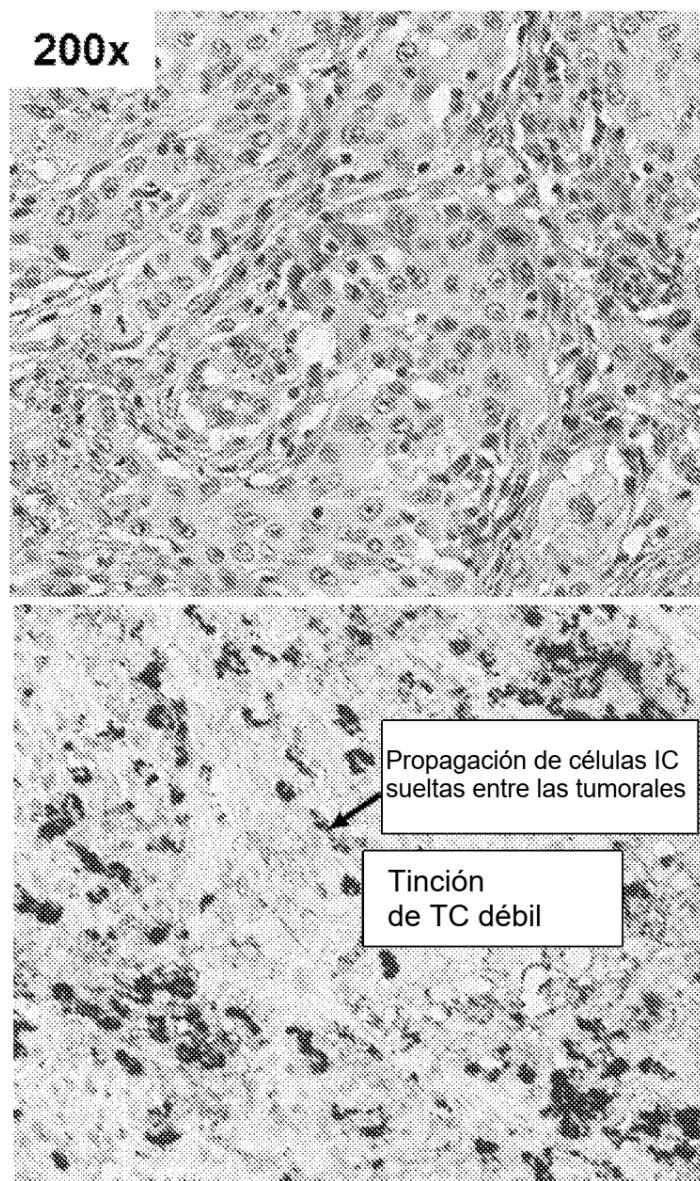
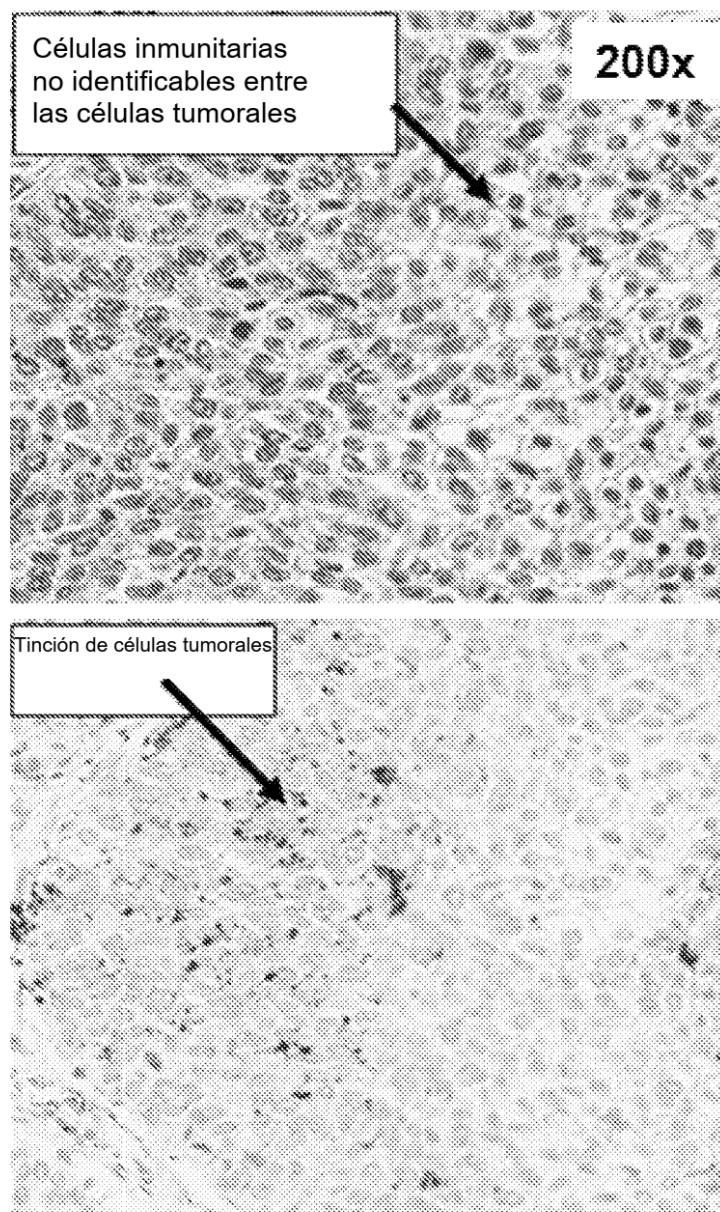


Figura 17C



Figuras 18A-18F

