



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 992 868**

⑮ Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.07.2017** PCT/US2017/040665

⑧7 Fecha y número de publicación internacional: **11.01.2018** WO18009507

⑨6 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2017** E 17740851 (5)

⑨7 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2024** EP 3481866

⑮ Título: **Combinación de antagonista de TIM-4 y antagonista de PD-1 y métodos de uso**

⑩ Prioridad:

06.07.2016 US 201662359073 P

⑪ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.12.2024

⑯ Titular/es:

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US

⑰ Inventor/es:

DOYLE, SEAN;
SELBY, MARK, J. y
CHADWICK, ERIC

⑲ Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 992 868 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

Combinación de antagonista de TIM-4 y antagonista de PD-1 y métodos de uso

5 **Antecedentes**

El National Cancer Institute ha estimado que solo en Estados Unidos, 1 de cada 3 personas se verá afectado con cáncer durante su vida. Además, aproximadamente del 50 % al 60 % de las personas que contraen cáncer finalmente sucumbirán a la enfermedad. Una vez que las células tumorales escapan del sitio primario, pasan a través del sistema linfático y/o circulatorio y, en última instancia, unas pocas se establecen en sitios distantes para dar metástasis, y el 95 % de las muertes por tumores sólidos en el mundo desarrollado se deben a metástasis.

10 Kim *et al.* (Clin. Cancer Res.; 23(1) (2017)) describen una terapia combinada con anti PD-1, anti TIM-3 y radiación focal que dio como resultado la regresión de gliomas murinos.

15 Koyama *et al.* (Nat. Commun. 7:10501 doi: 10.1038/ncomms10501 (2016)) describen que la resistencia adaptativa al bloqueo terapéutico de PD-1 está asociada con la regulación positiva de los puntos de control inmunitarios alternativos.

20 Sakuishi *et al.* (J. Exp. Med.; Vol. 207 N.º 10, 2187-2194 (2010)) describen que el direccionamiento combinado de las vías TIM-3 y PD-1 es más eficaz para controlar el crecimiento tumoral que el direccionamiento de cualquiera de las vías por separado.

25 Baghdadi *et al.* (Cancer Immunol Immunother; 62:629-637 (2013)) describen que el bloqueo combinado de TIM-3 y TIM-4 aumenta la eficacia de la vacuna contra el cáncer contra los melanomas establecidos.

30 La amplia aparición de tumores cancerosos subraya la necesidad de mejorar los regímenes anticancerosos. Sin embargo, a pesar de los avances en la terapia multimodal, los aumentos en la supervivencia general en pacientes con cáncer han sido limitados. Por consiguiente, un objetivo de la presente invención es proporcionar métodos mejorados para tratar sujetos con dichos tumores.

Sumario de la invención

35 Los presentes inventores han descubierto por primera vez que la administración conjunta de un antagonista de TIM-4 (por ejemplo, un anticuerpo) y un anti antagonista PD-1 (por ejemplo, un anticuerpo) inhibe eficazmente el crecimiento tumoral *in vivo*, incluso sinérgicamente. Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar medios mejorados para tratar a sujetos con cáncer. Específicamente, un objeto de la invención es proporcionar regímenes de tratamiento combinado eficaces en donde un antagonista de TIM-4 se combine con un anti antagonista PD-1 para el tratamiento del cáncer.

40 La presente invención se refiere a una combinación de un anticuerpo anti antagonista de PD-1 y un anticuerpo anti antagonista de TIM-4 para su uso en un método para el tratamiento del cáncer en un sujeto mediante la administración conjunta de una cantidad eficaz de un antagonista de PD-1 y un antagonista de TIM-4, en donde el método da como resultado que ambos anticuerpos antagonistas estén presentes simultáneamente en el sujeto.

45 Los antagonistas de TIM-4 incluyen ligandos, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y anticuerpos biespecíficos) y agentes multivalentes, un ligando no activador o un compañero de unión a ligando (por ejemplo, una molécula pequeña, un emulador de PS genomanipulado o TIM-1 soluble, u otra proteína de unión). De acuerdo con la invención reivindicada, el antagonista de TIM-4 es un anticuerpo anti antagonista de TIM4. En una realización, el antagonista de TIM-4 es un anticuerpo que se une a un epítopo dentro del dominio IgV de TIM-4. En otra realización, el antagonista de TIM-4 es un anticuerpo tal como 9F4, RMT4-53, RMT4-54, F31-563 o 21T112.

55 Un anticuerpo anti TIM-4 de ejemplo contiene cadenas pesadas y ligeras que comprenden las CDR de cadena pesada y ligera de 9F4, RMT4-53, RMT4-54, F31-563 o 21T112, y opcionalmente comprende una región marco con al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la región marco del anticuerpo correspondiente. Los anticuerpos anti TIM-4 también pueden comprender dominios variables de cadena pesada y ligera que son al menos aproximadamente un 90 %, 95 % o 99 % idénticos a los del anticuerpo 9F4, RMT4-53, RMT4-54, F31-563 o 21T112. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti antagonista de TIM-4 compite por la unión con, y/o se une al mismo epítopo en TIM-4 que, 9F4, RMT4-53, RMT4-54, F31-563 o 21T112.

60 Los antagonistas de PD-1 incluyen ligandos, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y anticuerpos biespecíficos), y agentes multivalentes. De acuerdo con la invención reivindicada, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti antagonista de PD-1. En una realización, el anticuerpo anti antagonista de PD-1 es MK-3475 o CT-011.

65 Un anticuerpo anti PD-1 de ejemplo es 5C4 (denominado 5C4 en el documento WO 2006/121168; también conocido

como MDX-1106, ONO-4538 y nivolumab) que comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias que se muestran en las SEQ ID NO: 11 y 12, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno y variantes de los mismos. En otras realizaciones, el anticuerpo comprende las CDR o regiones variables (VR) de cadena pesada y ligera de 5C4. Por consiguiente, en una realización, el anticuerpo comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VH de 5C4 que tienen la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 13, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VL de 5C4 que tienen la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 15. En otra realización, el anticuerpo comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 17, 18 y 19, respectivamente, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 20, 21 y 22, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo comprende las regiones VH y/o VL que tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 13 y/o la SEQ ID NO: 15, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo comprende las regiones variables de cadena pesada (VH) y/o variables de cadena ligera (VL) codificadas por las secuencias de ácidos nucleicos expuestas en la SEQ ID NO: 14 y/o la SEQ ID NO: 16, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo compite por la unión con y/o se une al mismo epítopo en PD-1 que los anticuerpos mencionados anteriormente. En otra realización, el anticuerpo tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos de la región variable con los anticuerpos mencionados anteriormente (por ejemplo, al menos aproximadamente un 90 %, 95 % o un 99 % de identidad de la región variable con la SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 15).

En el presente documento se describe un anticuerpo anti PD-L1, tal como MEDI4736 (también conocido como anti B7-H1) o MPDL3280A (también conocido como RG7446). Un anticuerpo anti PD-L1 de ejemplo es 12A4 (denominado 12A4 en el documento WO 2007/005874 y la Patente de EE. UU. N.º 7.943.743). El anticuerpo comprende las CDR o VR de cadena pesada y ligera de 12A4. Por consiguiente, el anticuerpo puede comprender los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VH de 12A4 que tienen la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VL de 12A4 que tienen la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 3. El anticuerpo puede comprender los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 8, 9 y 10, respectivamente. El anticuerpo puede comprender las regiones VH y/o VL que tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: 3, respectivamente. El anticuerpo puede comprender las regiones variables de cadena pesada (VH) y/o variables de cadena ligera (VL) codificadas por las secuencias de ácidos nucleicos expuestas en la SEQ ID NO: 2 y/o la SEQ ID NO: 4, respectivamente. El anticuerpo puede competir por la unión con y/o se une al mismo epítopo en PD-L1 que los anticuerpos mencionados anteriormente. El anticuerpo puede tener al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos de la región variable con los anticuerpos mencionados anteriormente (por ejemplo, al menos aproximadamente un 90 %, 95 % o un 99 % de identidad de la región variable con la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3).

En una realización, la invención proporciona la combinación de un anticuerpo anti antagonista de PD-1 y un anticuerpo anti antagonista de TIM-4 para su uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antagonista de PD-1 y un antagonista de TIM-4, en donde

(a) el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti PD-1 que comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena pesada que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 13, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena ligera que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 15; y
 (b) el antagonista de TIM-4 es un anticuerpo,

en donde el método da como resultado que ambos anticuerpos antagonistas estén presentes simultáneamente en el sujeto.

En otra realización, la invención proporciona una combinación de un anticuerpo anti antagonista de PD-1 y un anticuerpo anti antagonista de TIM-4 para su uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antagonista de PD-1 y un antagonista de TIM-4, en donde

(a) el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti PD-L1 que comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena pesada que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena ligera que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3; y
 (b) el antagonista de TIM-4 es un anticuerpo,

en donde el método da como resultado que ambos anticuerpos antagonistas estén presentes simultáneamente en el sujeto.

La eficacia de la combinación para su uso en los métodos de tratamiento proporcionados en el presente documento se puede evaluar usando cualquier medio adecuado. En una realización, el tratamiento produce al menos un efecto terapéutico seleccionado del grupo que consiste en reducción del tamaño de un tumor, reducción del número de lesiones metastásicas en el tiempo, respuesta completa, respuesta parcial y enfermedad estable. En otra realización, la administración de un antagonista de PD-1 y un antagonista de TIM-4 da como resultado una reducción de al

menos 1, 1,25, 1,50, 1,75, 2, 2,25, 2,50, 2,75, 3, 3,25, 3,5, 3,75 o 4 veces en el volumen del tumor, por ejemplo, en relación con el tratamiento con el antagonista de PD-1 o el antagonista de TIM-4 solo, o en relación con el volumen del tumor antes del inicio del tratamiento. En otra realización, la administración del antagonista de PD-1 y del antagonista de TIM-4 da como resultado una reducción de al menos 1, 2 o, más preferentemente, 3 veces del volumen del tumor, por ejemplo, en relación con el tratamiento con el antagonista de PD-1 o el antagonista de TIM-4 solo, o en relación con el volumen del tumor antes del inicio del tratamiento. En una realización adicional, la administración de un antagonista de PD-1 y un antagonista de TIM-4 da como resultado una inhibición del crecimiento del tumor de al menos el 50 %, 60 %, 70 % o el 80 %, por ejemplo, en relación con el tratamiento con el antagonista de PD-1 o el antagonista de TIM-4 solo, o en relación con el volumen del tumor antes del inicio del tratamiento. En determinadas realizaciones, el volumen del tumor se reduce en un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más, por ejemplo, con respecto al tamaño del tumor antes del inicio del tratamiento.

La combinación del antagonista de PD-1 y el antagonista de TIM-4 de acuerdo con la invención se puede administrar según una vía de dosificación adecuada (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratecal o subcutánea). El antagonista y el agonista también se pueden administrar de acuerdo con cualquier programa adecuado. Por ejemplo, el antagonista y el agonista se pueden administrar simultáneamente en una sola formulación. Como alternativa, el antagonista y el agonista se pueden formular para administración separada, en donde se administran de forma concurrente o secuencial. En una realización, el antagonista de PD-1 se administra antes de la administración del antagonista de TIM-4. En otra realización, el antagonista de TIM-4 se administra antes de la administración del antagonista de PD-1. En una realización adicional, el antagonista de TIM-4 y el antagonista de PD-1 se administran simultáneamente.

En una realización, el cáncer es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en carcinoma, sarcoma, blastoma, linfoma y leucemia. En una realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer gastrointestinal, cáncer colorrectal, cáncer de estómago, carcinoma de colon y glioblastoma. En otra realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda positiva para el cromosoma Filadelfia (LLA Ph+), carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, glioma, cáncer gastrointestinal, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, cáncer de cuello del útero, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon y cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, tumor de células germinales, sarcoma pediátrico, linfocitos citolíticos naturales sinonasales, mieloma múltiple, leucemia mielógena aguda (LMA) y leucemia linfocítica crónica (LLC).

Se pueden administrar agentes y terapias adicionales junto con los agonistas y antagonistas descritos en el presente documento. En una realización, la combinación es para su uso en métodos que comprenden la administración de un agente terapéutico adicional (por ejemplo, una citotoxina o un agente quimioterápico).

También se proporcionan en el presente documento composiciones que comprenden un anticuerpo anti antagonista de PD-1 y un anticuerpo anti antagonista de TIM-4. En una realización, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti PD-1 que comprende las CDR o VR de cadena pesada y ligera de 5C4.

Se proporcionan además kits para tratar un cáncer en un sujeto, comprendiendo el kit:

(a) una dosis de un antagonista de PD-1;
 (b) una dosis de un antagonista de TIM-4; y
 (c) instrucciones para usar el antagonista de PD-1 y el antagonista de TIM-4 en los métodos descritos en el presente documento, en donde el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti antagonista de PD-1 y el

antagonista de TIM-4 es un anticuerpo anti antagonista de TIM-4. En una realización particular, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti PD-1 que comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena pesada que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 13, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena ligera que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 15.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa una alineación de las secuencias de aminoácidos de las isoformas 1 y 2 de TIM-4 humano.

La figura 2 representa la alineación de las secuencias de aminoácidos de ortólogos de TIM-4 de macaco cangrejero, ratón y ser humano.

Las figuras 3A-E son gráficos que representan las poblaciones de células mieloides en el bazo y tumores de ratones después de la administración de un control, un anticuerpo antagonista de TIM-4, un anticuerpo antagonista de PD-1 o una combinación de un anticuerpo anti PD-1 y un anticuerpo anti TIM-4.

Las figuras 4A-F son gráficos que representan las poblaciones de células CD8+ en el bazo y tumores de ratones después de la administración de un control, un anticuerpo antagonista de TIM-4, un anticuerpo anti PD-1 o una combinación de un anticuerpo anti PD-1 y un anticuerpo anti TIM-4.

5 Las figuras 5A-F son gráficos que representan las poblaciones CD4+ en el bazo y tumores de ratones después de la administración de un control, un anticuerpo antagonista de TIM-4, un anticuerpo anti PD-1 o una combinación de un anticuerpo anti PD-1 y un anticuerpo anti TIM-4.

10 Las figuras 6A-D son gráficos que representan el volumen tumoral (mm^3) en ratones individuales después de la administración de un control, un anticuerpo antagonista de TIM-4, un anticuerpo anti PD-1 o una combinación de un anticuerpo anti PD-1 y un anticuerpo anti TIM-4.

15 Las figuras 7A-B son gráficos que representan el volumen tumoral (mm^3) medio y la mediana en ratones después de la administración de un control, un anticuerpo antagonista de TIM-4, un anticuerpo anti PD-1 o una combinación de un anticuerpo anti PD-1 y un anticuerpo anti TIM-4.

20 La figura 8 es un gráfico que representa los volúmenes tumorales (mm^3) el día 28 en ratones en ratones después de la administración de un control, un anticuerpo antagonista de TIM-4, un anticuerpo anti PD-1 o una combinación de un anticuerpo anti PD-1 y un anticuerpo anti TIM-4.

25 La figura 9 (A) es un gráfico que representa las tasas de supervivencia de los ratones después de la administración de un control, un anticuerpo antagonista de TIM-4, un anticuerpo anti PD-1 o una combinación de un anticuerpo anti PD-1 y un anticuerpo anti TIM-4 en el modelo animal CT26; y (B) es una tabla que indica la tasa de supervivencia media de cada grupo de tratamiento.

30 La figura 10 es un gráfico que representa el porcentaje de las tasas de supervivencia libre de progresión de los ratones después de la administración de un control, un anticuerpo antagonista de TIM-4, un anticuerpo anti PD-1 o una combinación de un anticuerpo anti PD-1 y un anticuerpo anti TIM-4 en el modelo animal MC38.

35 La figura 11 muestra el volumen tumoral medio en relación con los días posteriores al implante en los ratones que participaron en el experimento que se muestra en la figura 10.

La figura 12A-C muestra los volúmenes tumorales individuales en relación con los días posteriores al implante en los ratones que participaron en el experimento que se muestra en las figuras 10 y 11.

Descripción detallada de la invención

Como se describe en el presente documento, la invención se basa en el descubrimiento de que la administración conjunta de un antagonista de TIM-4 (por ejemplo, un anticuerpo) y un antagonista de PD-1 (por ejemplo, un anticuerpo) inhibe eficazmente el crecimiento tumoral *in vivo*, incluso sinérgicamente. Por consiguiente, la presente invención proporciona una combinación de un anticuerpo anti antagonista de PD-1 y un anticuerpo anti antagonista de TIM-4 para su uso en un método para el tratamiento del cáncer en un sujeto que comprende administrar a un sujeto (por ejemplo, un ser humano) una cantidad eficaz del anticuerpo antagonista de PD-1 y el anticuerpo antagonista de TIM-4, en donde el método da como resultado que ambos anticuerpos antagonistas estén presentes simultáneamente en el sujeto.

I. Definiciones

50 Para que la presente descripción pueda ser más fácilmente comprensible, en primer lugar, se definen determinados términos. Se exponen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica, y se emplean métodos convencionales de inmunología, química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología.

55 Como se usan en el presente documento, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El uso de "o" o "y" significa "y/o" a menos que se manifieste lo contrario. Además, el uso de la expresión "que incluye", así como otras formas, tales como "incluyen", "incluye" e "incluido", no es limitante.

60 Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" cuando se hace referencia a un valor medible, tal como una cantidad, y una duración temporal, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferentemente $\pm 5\%$, incluso más preferentemente $\pm 1\%$ y aún más preferentemente $\pm 0,1\%$ con respecto al valor especificado, ya que dichas variaciones son apropiadas para realizar los métodos divulgados. A menos que se indique lo contrario, todas las cifras que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como peso molecular, condiciones de reacción, etc., que se usan en el presente documento se consideran modificadas por el

5 término "aproximadamente".

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" o "paciente" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a un mamífero tal como un ser humano, ratón, rata, hámster, cobaya, conejo, gato, perro, mono, vaca, caballo y cerdo (por ejemplo, un paciente que tiene cáncer).

10 Un "tumor sólido" incluye, por ejemplo, sarcoma, melanoma, carcinoma, carcinoma de próstata, carcinoma de pulmón, carcinoma de colon u otro cáncer de tumor sólido.

15 10 Los términos "cáncer", "canceroso" o "maligno" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Como se usa en el presente documento, el término incluye cánceres premalignos, así como malignos. Los ejemplos de cáncer incluyen, por ejemplo, leucemia, linfoma, blastoma, carcinoma y sarcoma. Los ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda positiva para el cromosoma Filadelfia (LLA Ph+), carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, glioma, cáncer 20 20 gastrointestinal, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, cáncer de cuello del útero, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon y cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, tumor de células germinales, sarcoma pediátrico, linfocitos citolíticos naturales sinonasales, mieloma múltiple, leucemia mielógena aguda (LMA) y leucemia linfocítica crónica (LLC).

25 Como se usa en el presente documento, el término "carcinoma" se refiere a un tipo de cáncer que se desarrolla a partir de células epiteliales. Específicamente, un carcinoma es un cáncer que comienza en un tejido que recubre las superficies internas o externas del cuerpo, y que generalmente surge de células que se originan en la capa germinal endodérmica o ectodérmica durante la embriogénesis. Los diversos subtipos de carcinomas incluyen adenocarcinoma (que presenta citología tisular glándula microscópica, arquitectura tisular y/o productos moleculares glandulares, por ejemplo, mucina), carcinoma escamocelular (rasgos observables y características que indican diferenciación escamosa, por ejemplo, puentes intercelulares, queratinización, perlas escamosas), carcinoma 30 30 adenoescamoso (un tumor mixto que contiene tanto adenocarcinoma como carcinoma escamocelular, en donde cada uno de estos tipos de células comprende al menos el 10 % del volumen del tumor), carcinoma anaplásico o indiferenciado (un grupo heterogéneo de carcinomas de alto grado que presentan células que carecen de evidencia histológica o citológica distintiva de cualquiera de las neoplasias más específicamente diferenciadas), carcinoma de células grandes (compuesto por células grandes, monótonas, redondeadas o de forma abiertamente poligonal con abundante citoplasma), carcinoma de células pequeñas (las células suelen ser redondas y tienen un diámetro inferior a aproximadamente 3 veces el de un linfocito en reposo y un citoplasma poco evidente).

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "célula inmunitaria" se refiere a células que desempeñan una función en la respuesta inmunitaria, incluyendo linfocitos, tales como linfocitos B y linfocitos T; linfocitos citolíticos naturales; células mieloides, tales como monocitos, macrófagos, eosinófilos, mastocitos, basófilos y granulocitos.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "respuesta inmunitaria" se refiere a una respuesta inmunitaria celular, incluyendo respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T y/o linfocitos B tales como la estimulación de linfocitos T, macrófagos y/o linfocitos citolíticos naturales.

50 45 Las expresiones "célula supresora derivada de mieloides" o "MDSC" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un grupo heterogéneo de células inmunitarias del linaje mieloide (una familia de células que se originan a partir de células madre de la médula ósea), al que también pertenecen las células dendríticas, los macrófagos y los neutrófilos. Las MDSC se expanden fuertemente en situaciones patológicas tales como infecciones crónicas y cáncer, como resultado de una hematopoyesis alterada. Las MDSC se clasifican además en dos subtipos, MDSC monocíticas y MDSC granulocíticas. La función supresora de las MDSC reside en su capacidad para inhibir la proliferación y activación de linfocitos T. Por ejemplo, en condiciones inflamatorias crónicas (infecciones víricas y bacterianas) o cáncer, la diferenciación mieloide se inclina hacia la expansión de las MDSC. Estas MDSC se infiltran en sitios de inflamación y tumores, donde inhiben las respuestas inmunitarias inhibiendo los linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T CD8+) y linfocitos NK, por ejemplo. Las MDSC también aceleran la angiogénesis, la progresión tumoral y la metástasis a través de la expresión de citocinas y factores tales como TGF-beta.

55 60 65 Las expresiones "patrones moleculares asociados a daños" o "DAMP" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a moléculas intracelulares liberadas por tejidos lesionados. Los DAMP son moléculas que tienen un papel fisiológico dentro de la célula, pero adquieren funciones adicionales cuando se exponen al entorno extracelular. Por ejemplo, los DAMP alertan al cuerpo sobre el peligro, estimulan una respuesta inflamatoria y, finalmente, promueven el proceso de regeneración. Además de su liberación pasiva por las células muertas, algunos DAMP pueden secretarse o exponerse por células vivas que experimentan un estrés potencialmente mortal. Los DAMP se han relacionado con la inflamación y trastornos relacionados. Los DAMP incluyen, pero sin limitación, histonas, ADN genómico, HMGB1, IL1a, IL33, ATP, F-actina, ciclofilina A, HSP, cristales de ácido úrico, S100s, ADN mitocondrial, factor de transcripción mitocondrial A, alreticulina.

El término "eferocitosis" se refiere al proceso por el cual las células moribundas/muertas (por ejemplo, apoptóticas o necróticas) son eliminadas por las células fagocíticas (por ejemplo, neutrófilos, monocitos, macrófagos, mastocitos y células dendríticas). Durante la eferocitosis, los fagocitos se acumulan en los sitios de las células apoptóticas y la membrana celular de las células fagocíticas envuelve a la célula apoptótica, formando una gran vesícula llena de líquido, el "efersoma" que contiene la célula muerta. El efecto de la eferocitosis es que las células muertas son eliminadas antes de que se rompa la integridad de su membrana y su contenido se filtre al tejido circundante. La eferocitosis desencadena vías específicas de transducción de señales intracelulares cadena abajo, por ejemplo, dando como resultado efectos antiinflamatorios, antiproteasa y promotores del crecimiento. Por el contrario, la eferocitosis alterada se ha vinculado a enfermedades autoinmunitarias y daño tisular.

La "autofagia" o "autofagocitosis" es el mecanismo destructivo natural que desmonta, a través de un proceso regulado, los componentes celulares innecesarios o disfuncionales. La autofagia permite la degradación y el reciclaje ordenados de los componentes celulares. Durante este proceso, los constituyentes citoplasmáticos específicos se aislan del resto de la célula dentro de una vesícula de doble membrana conocida como autofagosoma. A continuación, el autofagosoma se fusiona con un lisosoma y el contenido se degrada y se recicla. Hay tres formas diferentes de autofagia que se describen comúnmente, concretamente, macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas. En el contexto de la enfermedad, la autofagia se ha visto como una respuesta adaptativa al estrés que promueve la supervivencia, mientras que, en otros casos, parece promover la muerte celular y la morbilidad.

Los términos "tratar", "que trata", y "tratamiento", como se usan en el presente documento, se refieren a cualquier tipo de intervención o proceso realizado en, o que administre un agente activo o una combinación de agentes activos al sujeto con el objetivo de revertir, aliviar, mejorar, inhibir, ralentizar o prever la progresión, desarrollo, gravedad o recidiva de un síntoma, complicación, afección o indicios bioquímicos asociados con una enfermedad.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento eficaz" o "respuesta terapéutica positiva" se refieren a un tratamiento que produce un efecto beneficioso, por ejemplo, la mejora de al menos un síntoma de una enfermedad o trastorno, por ejemplo, un cáncer. Un efecto beneficioso puede adoptar la forma de una mejora sobre el valor inicial, es decir, una mejora sobre una medición u observación realizada antes del inicio de la terapia de acuerdo con el método. Por ejemplo, un efecto beneficioso puede adoptar la forma de ralentizar, estabilizar, detener o revertir la progresión de un cáncer en un sujeto en cualquier estadio clínico, como resulta evidente por una disminución o eliminación de un síntoma clínico o diagnóstico de la enfermedad, o de un marcador de cáncer. Un tratamiento eficaz puede, por ejemplo, reducir el tamaño del tumor, disminuir la presencia de células tumorales circulantes, reducir o prevenir las metástasis de un tumor, ralentizar o detener el crecimiento del tumor y/o prevenir o retrasar la recidiva o recaída del tumor.

La expresión "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un agente o combinación de agentes que proporciona el resultado biológico, terapéutico y/o profiláctico deseado. Ese resultado puede ser la reducción, mejora, paliación, minimización, retraso y/o alivio de uno o más de los signos, síntomas o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. En referencia a los tumores sólidos, una cantidad eficaz comprende una cantidad suficiente para hacer que un tumor se contraiga y/o disminuya la velocidad de crecimiento del tumor (tal como para suprimir el crecimiento del tumor) o para prevenir o retrasar otra proliferación celular no deseada. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para retrasar el desarrollo del tumor. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para prevenir o retrasar la recidiva del tumor. Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más administraciones. La cantidad eficaz del fármaco o composición puede: (i) reducir el número de células cancerosas; (ii) reducir el tamaño del tumor; (iii) inhibir, retardar, ralentizar en cierta medida y puede detener la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; (iv) inhibir (es decir, retardar en cierta medida y puede detener la metástasis tumoral); (v) inhibir el crecimiento del tumor; (vi) prevenir o retrasar la aparición y/o recidiva del tumor; y/o (vii) aliviar hasta cierto punto una o más de los síntomas asociados con el cáncer. En un ejemplo, una "cantidad eficaz" es la cantidad de un antagonista de PD-1 (por ejemplo, un anticuerpo) y un anticuerpo antagonista de TIM-4 (por ejemplo, un anticuerpo), en combinación, para efectuar una disminución significativa del cáncer o ralentizar la progresión del cáncer, tal como un tumor sólido avanzado. Una cantidad eficaz de la terapia combinada se administra de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento en un "régimen eficaz" que se refiere a una combinación del antagonista de PD-1 y el antagonista de TIM-4, en donde el orden de administración y la frecuencia de dosificación son adecuados para lograr el tratamiento.

"Dosis biológica óptima (OBD)" se define como la dosis mínima de un agente o combinación de agentes que proporciona la respuesta *in vivo* más óptima y duradera sin toxicidad clínicamente inaceptable. La toxicidad y la eficacia terapéutica se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de la dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL50/DE50.

Como se usan en el presente documento, el término "sinergia", las expresiones "sinergia terapéutica" y "efecto

- sinérgico" se refieren a un fenómeno donde el tratamiento de pacientes con una combinación de agentes terapéuticos (por ejemplo, antagonista de PD-1 junto con antagonista de TIM-4) manifiesta un resultado terapéuticamente superior al resultado logrado por cada constituyente individual de la combinación usada cuando se usa solo (véase, por ejemplo, T. H. Corbett *et al.*, 1982, *Cancer Treatment Reports*, 66, 1187). En este contexto, un resultado terapéuticamente superior incluye uno o más de los siguientes (a) un aumento en la respuesta terapéutica que es mayor que la suma de los efectos separados de cada agente solo a la misma dosis que en la combinación; (b) una disminución en la dosis de uno o más agentes en la combinación sin una disminución en la eficacia terapéutica; (c) una disminución en la incidencia de eventos adversos mientras se recibe un beneficio terapéutico que es igual o superior a la monoterapia de cada agente en la misma dosis que en la combinación, (d) una reducción en las toxicidades limitantes de la dosis mientras se recibe un beneficio terapéutico que es superior a la monoterapia de cada agente; (e) un retraso o minimización de la inducción de resistencia a los fármacos. En modelos de xenoinjerto, una combinación, usada en su dosis máxima tolerada, en la que cada uno de los constituyentes estará presente a una dosis que generalmente no excede su dosis tolerada máxima individual, manifiesta una sinergia terapéutica cuando la disminución del crecimiento del tumor obtenido mediante la administración de la combinación es superior al valor de la disminución del crecimiento tumoral del mejor constituyente cuando el constituyente se administra solo. La sinergía de una combinación de fármacos puede determinarse, por ejemplo, de acuerdo con el teorema del índice de combinación (CI) de Chou-Talalay (Chou *et al.*, *Adv. Enzyme Regul.* 1984; 22:27-55; Chou, *Cancer Res.* 2010;70(2):440-446).
- 20 "Libre de cáncer" o "libre de enfermedad" o NED (sin evidencia de enfermedad) significa que el paciente ha demostrado una respuesta clínica inducida por el tratamiento con las terapias estándar de atención actuales. Por "respuesta clínica", se entiende que los signos clínicos, los signos radiológicos y los síntomas del cáncer se han reducido significativamente o han desaparecido por completo según los diagnósticos clínicos, aunque aún pueden existir células cancerosas en el cuerpo. Por lo tanto, se contempla que la respuesta clínica abarca una respuesta parcial y completa. La presencia de células cancerosas residuales se puede enumerar mediante ensayos como CTC (células tumorales circulantes) y puede predecir la recidiva.
- 30 "Recaída" o "recidiva" o "resurgimiento" se usan indistintamente en el presente documento, y se refieren al diagnóstico radiográfico de retorno, o signos y síntomas de retorno del cáncer después de un período de mejoría o respuesta.
- Como se usa en el presente documento, el término "antagonista" se refiere a una molécula que bloquea (por ejemplo, reduce o previene) una actividad biológica. El término "inhibir" o "inhibición" significa reducir en una cantidad medible.
- 35 Como se usa en el presente documento, el término "ligando" se refiere a una molécula que forma un complejo con una biomolécula (por ejemplo, un receptor) para servir a un propósito biológico. En un sentido menos amplio, es una molécula que desencadena señales, que se une a un sitio en una proteína diana. La unión se produce por fuerzas intermoleculares, tales como enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno y fuerzas de van der Waals. El acoplamiento (asociación) suele ser reversible (disociación). La unión covalente irreversible real entre un ligando y su molécula diana es rara en los sistemas biológicos. La unión del ligando a un receptor (proteína receptora) altera su conformación química (forma tridimensional). El estado conformacional de una proteína receptora determina su estado funcional.
- 45 El "nivel" de una proteína se refiere a la cantidad de proteína en una muestra, según se determina usando cualquier método conocido en la técnica para medir los niveles de proteína, incluyendo electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía de hiperdifusión, reacciones de precipitación de fluidos o geles, espectroscopia de absorción, ensayos colorimétricos, ensayos espectrofotométricos, citometría de flujo, inmunodifusión, ensayo en fase de solución, inmunoelectroforesis, transferencia de Western, radioinmunoensayo (RIA), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), ensayos inmunofluorescentes e inmunoensayos de electroquimioluminiscencia.
- 55 El término "muestra" se refiere a una colección de fluidos, células o tejidos aislados de un sujeto. Los fluidos biológicos son típicamente líquidos a temperaturas fisiológicas y pueden incluir fluidos de origen natural presentes en, extraídos de, expresados o extraídos de otro modo de un sujeto o fuente biológica. Los ejemplos de fluidos biológicos incluyen sangre, suero, fluidos serosos, plasma, linfa, orina, líquido cefalorraquídeo, saliva, líquidos oculares, líquido quístico, lágrimas, heces, esputo, secreciones mucosas, secreciones vaginales, líquido ginecológico, fluidos ascíticos tales como los asociados con tumores no sólidos, fluidos de las cavidades pleural, pericárdica, peritoneal, abdominal y otras cavidades corporales, y fluidos recogidos por lavado bronquial.
- 60 La expresión "muestra de control", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier muestra de control clínicamente relevante, incluyendo, por ejemplo, una muestra de un sujeto sano o una muestra hecha en un punto temporal anterior del sujeto que se va a evaluar. Por ejemplo, la muestra de control puede ser una muestra tomada del sujeto antes de la aparición del cáncer, en un estadio más temprano de la enfermedad o antes de la administración del tratamiento o de una parte del tratamiento.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "fragmentos de unión a antígeno" (también conocidos como "porciones de unión a antígeno")). Los anticuerpos enteros son glucoproteínas que comprenden al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, C_L . Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedador, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema del complemento clásico. El término "anticuerpo" también abarca anticuerpos químéricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos totalmente humanos, así como formas multiméricas de anticuerpos, tales como minicuerpos, bis-scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y multímeros Fab' conjugados químicamente.

La expresión "fragmento de anticuerpo" (también denominado "fragmento de unión a antígeno" o "porción de unión a antígeno"), como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados en la expresión "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul ed., 3.^a ed. 1993)); (iv) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1} ; (v) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (vi) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio V_H ; (vii) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada; y (viii) un nanocuerpo (también conocido como un anticuerpo de dominio único (sdAb)), que es una región variable de cadena pesada que contiene un único dominio variable y dos dominios constantes. Los anticuerpos de dominio único incluyen fragmentos V_{H1} (anticuerpos de un solo dominio genomanipulados a partir de anticuerpos de cadena pesada que se encuentran en camélidos, así como fragmentos VNAR (anticuerpos de dominio único obtenidos a partir de anticuerpos de cadena pesada (IgNAR, "receptor de nuevo antígeno de inmunoglobulina") de peces cartilaginosos).

Los "armazones de unión a antígeno" son proteínas que se unen específicamente a una diana (o antígeno) o epítopo, tales como proteínas que comprenden un pliegue de Ig o un pliegue similar a Ig. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos son también armazones de unión a antígeno. Los armazones unión a antígeno pueden ser monovalentes, multivalentes, por ejemplo, bivalentes, trivalentes, tetravalentes, o estar unidos a 5, 6 o más epítopos. Los armazones de unión a antígeno multivalentes pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos, es decir, que se unen a múltiples (al menos 2, 3, 4 o 5) epítopos que son diferentes entre sí. Por ejemplo, un armazón de unión a antígeno monoespecífico multivalente es una proteína que se une al menos a 2, 3, 4 o 5 epítopos idénticos, y puede ser una proteína que comprende al menos 2, 3, 4 o 5 porciones de unión a antígeno idénticas. Por ejemplo, los armazones de unión de TIM-4 pueden comprender 2-10, por ejemplo, 2-6, 2-5, 2-4 o 2-3 porciones de unión a TIM-4, que pueden ser iguales o diferentes entre sí.

Un anticuerpo multivalente incluye anticuerpos que comprenden al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más porciones de unión a antígeno de anticuerpos, cuyas porciones de unión a antígeno pueden comprender una porción de una cadena pesada y una porción de una cadena ligera. Una porción de unión a antígeno puede estar en un único polipéptido o comprender más de un polipéptido. Por ejemplo, un anticuerpo multivalente puede comprender 2-10 porciones de unión a antígeno, que pueden ser iguales o diferentes entre sí. Un anticuerpo multivalente puede ser monoespecífico o multiespecífico. Un anticuerpo multiespecífico puede ser biespecífico, triespecífico, tetraespecífico o unirse a 5 o más epítopos diferentes.

Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , estén codificados por genes independientes, se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite formarse como una única cadena de proteína en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv); véanse, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). También se pretende que dichos anticuerpos monocatenarios estén abarcados dentro de la expresión "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica y los fragmentos se criban para determinar su utilidad del mismo modo que los anticuerpos intactos.

Como se usa en el presente documento, un armazón de unión al antígeno que "se une específicamente" a un antígeno o epítopo del mismo es un armazón de unión a antígeno que se une al antígeno o epítopo del mismo con

una K_D de 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M o menos. Por ejemplo, un armazón de unión a antígeno que se une específicamente a TIM-4 es un armazón de unión a antígeno que se une a TIM-4 con una K_D de 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M o menos. Por ejemplo, un anticuerpo que "se une específicamente a

5 PD-1 humano" o "se une específicamente a PD-L1 humano" pretende hacer referencia a un anticuerpo que se une a PD-1 o PD-L1 humano, respectivamente, con una K_D de 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M o menos. Un armazón de unión a antígeno que comprende 2 o más regiones que se unen a un antígeno o epítopo puede unirse específicamente al antígeno o epítopo incluso si tiene una menor afinidad de unión al antígeno o epítopo que los intervalos proporcionados anteriormente, ya que se unirá 10 al antígeno o epítopo con mayor avidez.

Un "anticuerpo biespecífico" o "bifuncional" es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesadas/ligeras diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante una diversidad de métodos que incluyen la fusión de hibridomas o la unión de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos que muestran una única especificidad de unión y afinidad 20 por un epítopo particular, excepto por posibles variantes que pueden surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando dichas variantes generalmente presentes en escasas cantidades. Por consiguiente, la expresión "anticuerpo monoclonal humano" o "composición de anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que tiene regiones constantes variables y opcionales procedentes de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos 25 sustancialmente homogénea y no debe interpretarse que requiere la producción del anticuerpo por ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento pueden elaborarse mediante una diversidad de técnicas. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos están producidos por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido a partir de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de 30 cadena ligera fusionados a una célula inmortalizada.

El término "epítopo" o la expresión "determinante antigénico" se refieren a un lugar sobre un antígeno al que se une de manera específica una inmunoglobulina o anticuerpo. Los epítopos se pueden formar tanto a partir de aminoácidos contiguos como a partir de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante el plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos típicamente se conservan al tratarlos con 35 disolventes desnaturalizantes, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario se pierden típicamente tras el tratamiento con disolventes desnaturalizantes. Un epítopo incluye típicamente al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de un epítopo incluyen las técnicas en la materia y las descritas en el presente documento, por ejemplo, cristalografía por rayos X, HDX-MS y resonancia magnética nuclear bidimensional (véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

La expresión "cartografía de epítopos" se refiere al proceso de identificación de los determinantes moleculares para el reconocimiento de anticuerpo-antígeno.

45 La expresión "se une al mismo epítopo", con referencia a dos o más anticuerpos, significa que los anticuerpos compiten por unirse a un antígeno y se unen a los mismos segmentos de aminoácidos, superpuestos o que abarcan segmentos continuos o discontinuos. Los expertos en la técnica entienden que la expresión "se une al mismo epítopo" no significa necesariamente que los anticuerpos se unan exactamente a los mismos aminoácidos. Los 50 aminoácidos precisos a los que se unen los anticuerpos pueden diferir. Por ejemplo, un primer anticuerpo puede unirse a un segmento de aminoácidos que está completamente abarcado por el segmento de aminoácidos al que se une un segundo anticuerpo. En otro ejemplo, un primer anticuerpo se une a uno o más segmentos de aminoácidos que se solapan significativamente con el uno o más segmentos a los que se une el segundo anticuerpo. Para los 55 fines del presente documento, se considera que dichos anticuerpos "se unen al mismo epítopo". Dos anticuerpos "se unen al mismo epítopo" según se determina mediante un método determinado, por ejemplo, HDX-MS, cristalografía o análisis mutacional de la diana, lo que requiere que se identifiquen los mismos aminoácidos para ambos anticuerpos mediante uno o más métodos determinados.

Por consiguiente, además, abarcados por la combinación de un anticuerpo anti antagonista de PD-1 y un anticuerpo 60 anti antagonista de TIM-4 para su uso como se describe en el presente documento, la composición que comprende un anticuerpo anti antagonista de PD-1 y un anticuerpo anti antagonista de TIM-4, y el kit como se describe en el presente documento son anticuerpos que se unen a un epítopo que comprende la totalidad o una parte de un epítopo reconocido por los anticuerpos particulares descritos en el presente documento (por ejemplo, la misma región o una región superpuesta o una región entre o que abarca la región) o que se unen al mismo epítopo según 65 se determina mediante un método determinado, por ejemplo, HDX-MS, cristalografía o análisis mutacional de la diana.

5 También abarcados por la combinación de un anticuerpo anti antagonista de PD-1 y un anticuerpo anti antagonista de TIM-4 para su uso como se describe en el presente documento, la composición que comprende un anticuerpo anti antagonista de PD-1 y un anticuerpo anti antagonista de TIM-4, y el kit como se describe en el presente documento son anticuerpos que compiten por la unión con los anticuerpos descritos en el presente documento, y opcionalmente se unen al mismo epítopo. Los anticuerpos que compiten por la unión se pueden identificar usando técnicas rutinarias. Dichas técnicas incluyen, por ejemplo, un inmunoensayo, que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana, *es decir*, un ensayo de unión competitiva. La unión competitiva se determina en un ensayo en el que la inmunoglobulina que se está ensayando inhibe la unión 10 específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: Biacore, citometría de flujo, radioinmunoensayo directo o indirecto en fase sólida (RIA), inmunoensayo enzimático directo o indirecto en fase sólida (EIA), ensayo de competición tipo sándwich (véase Stahli *et al.*, *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); EIA directo de biotina-avidina en fase sólida (véase Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); ensayo de marcate directo en fase sólida, ensayo tipo sándwich de marcate directo en 15 fase sólida (véase Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA de marcate directo en fase sólida usando marcado I-125 (véase Morel *et al.*, *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); EIA directo de biotina-avidina en fase sólida (Cheung *et al.*, *Virology* 176:546 (1990)); y RIA de marcate directo. (Moldenhauer *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)). Típicamente, tal ensayo implica el uso de antígeno purificado unido a una 20 superficie sólida o a células que portan cualquiera de estos, una inmunoglobulina de ensayo sin marcar y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o a las células en presencia de la inmunoglobulina de ensayo. Normalmente, la inmunoglobulina de ensayo está presente en exceso. Por lo general, cuando un anticuerpo competitivo está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en al menos un 50-55 %, 55-60 %, 60-65 %, 65-70 %, 70-75 % o más.

25 30 35

Los métodos de cartografía de epítopos también incluyen análisis de rayos X de cristales de complejos antígeno:anticuerpo que proporciona resolución atómica del epítopo. Otros métodos controlan la unión del anticuerpo a fragmentos de antígeno o variaciones mutadas del antígeno, donde la pérdida de unión debido a una modificación de un residuo de aminoácido dentro de la secuencia del antígeno se considera a menudo una indicación de un componente de epítopo. Además, también se pueden usar métodos combinatorios computacionales para la cartografía de epítopos. Estos métodos se basan en la capacidad del anticuerpo de interés para aislar por afinidad péptidos cortos específicos de bibliotecas de péptidos de presentación en levadura o de presentación en fagos combinatorios. Por lo tanto, los péptidos se consideran guías para la definición del epítopo correspondiente al anticuerpo usado para cribado de la biblioteca de péptidos. Para la cartografía de epítopos, también se han desarrollado algoritmos computacionales que ha demostrado que cartografián epítopos conformacionales discontinuos.

40 45 50

También se describen en el presente documento moléculas químéricas (o moléculas de fusión) que comprenden un dominio de unión a antígeno, o equivalente, fusionado a otro polipéptido o molécula. Por ejemplo, los polipéptidos pueden fusionarse o conjugarse con una región Fc de anticuerpo, o una porción de la misma (por ejemplo, una proteína de fusión Fc). La porción de anticuerpo fusionada a un polipéptido puede comprender la región constante, la región bisagra, el dominio CH1, el dominio CH2 y el dominio CH3 o cualquier combinación de dominios enteros o porciones de los mismos. Los polipéptidos también pueden estar fusionados o conjugados a las porciones de anticuerpo anteriores para formar multímeros. Por ejemplo, las porciones Fc fusionadas a los polipéptidos de la presente invención pueden formar dímeros a través de enlaces disulfuro entre las porciones Fc. Pueden prepararse formas multiméricas superiores fusionando los polipéptidos a porciones de IgA e IgM. Se conocen en la técnica métodos para fusionar o conjugar los polipéptidos de la presente invención con porciones de anticuerpo. Véase, por ejemplo, Pat. de EE. UU. N.º 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851 y 5.112.946; documentos EP 307.434; EP 367.166; Publicaciones PCT N.º WO 96/04388 y WO 91/06570; Ashkenazi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:10535-10539 (1991); Zheng *et al.*, *J. Immunol.*, 154:5590-5600 (1995); y Vil *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:11337-11341 (1992).

55 60 65

Como se usa en el presente documento, el término "inmunoconjungado" se refiere a un anticuerpo unido a un resto terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco o un radioisótopo. Cuando se conjugan con una citotoxina, estos conjugados de anticuerpo se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o un agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células (por ejemplo, que las destruya). Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina-platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). Los anticuerpos usados en la presente invención se pueden conjugar con un

radioisótopo, por ejemplo, yodo radiactivo, para generar radiofármacos citotóxicos para el tratamiento del cáncer.

5 Los inmunoconjungados se pueden usar para modificar una respuesta biológica dada y el resto farmacológico no debe interpretarse como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto farmacológico puede ser una proteína o un polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa o fragmento activo de la misma, tales como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina difterica; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o interferón- γ ; o, 10 modificadores de la respuesta biológica, tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento.

15 Las técnicas para conjugar dichos restos terapéuticos a anticuerpos se conocen bien, véanse, *por ejemplo*, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2.^a Ed.), Robinson *et al.* (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), págs. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

20 Como se usa en el presente documento, el término "multivalente" se refiere a una molécula recombinante que incorpora más de dos segmentos biológicamente activos. Los fragmentos de proteína que forman la molécula multivalente opcionalmente pueden estar unidos a través de un enlace polipeptídico que une las partes constituyentes y permite que cada una funcione independientemente.

25 Como se usan en el presente documento, "equivalentes funcionales" se refieren a péptidos o polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos o una porción de unión a antígeno de los mismos) que mantienen una cantidad sustancial de su actividad inmunológica original. Por ejemplo, determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos 30 en una estructura proteica sin pérdida apreciable de la capacidad de unión interactiva con estructuras, tales como, por ejemplo, regiones de unión a antígeno de anticuerpos o sitios de unión en moléculas de sustrato. Por lo tanto, se contempla que se pueden realizar diversos cambios en las secuencias de aminoácidos de las composiciones divulgadas sin una pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológica. Las sustituciones de aminoácidos pueden 35 basarse en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofilia, carga y tamaño. Las sustituciones de ejemplo que tienen en cuenta varias de las características anteriores se conocen bien por los expertos en la técnica.

40 "Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" se define en el presente documento como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en una secuencia seleccionada, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin tomar en consideración ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de diversas maneras que se encuentran dentro de las capacidades del experto en la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles de manera pública, tales como los programas 45 BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros adecuados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima sobre toda la longitud de las secuencias que se comparan.

50 A efectos del presente documento, 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 veces la parte X/Y, donde X es el número de restos de aminoácidos registrados como coincidencias idénticas mediante un programa de alineación de secuencias, tal como BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR), en esa alineación de A y B en el programa, 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 aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A.

60 II. Antagonistas de PD-1

Como se usan en el presente documento, los términos "proteína PD-1", "PD-1", "PD1", "PDCD1" se usan indistintamente con "Muerte programada 1", "Muerte celular programada 1". La secuencia de PD-1 humana completa se puede encontrar con el n.^o de acceso de GenBank U64863 (SEQ ID NO:23).

65 Como se usan en el presente documento, los términos "PD-L1", "PDL1", "PDCD1L1", "PDCD1LG1", "CD274",

"homólogo 1 de B7", "B7-H1", "B7-H" y "B7H1" se usan indistintamente con "Ligando 1 de muerte celular programada 1". La secuencia de aminoácidos de PD-L1 humana completa, precursor de la isoforma a, se puede encontrar con el n.º de acceso NP_054862.1 (SEQ ID NO:24). La secuencia de aminoácidos de PD-L1 humana completa, precursor de la isoforma b, se puede encontrar con el n.º de acceso NP_001254635.1 (SEQ ID NO:25).

- 5 La proteína Muerte programada 1 (PD-1) es un miembro inhibidor de la familia de receptores CD28, que también incluye CD28, CTLA-4, ICOS y BTLA. PD-1 se expresa en linfocitos B activados, linfocitos T y células mieloides (Agata *et al.*, anteriormente; Okazaki *et al.* (2002) *Curr. Opin. Immunol.* 14: 391779-82; Bennett *et al.* (2003) *J Immunol* 170:711-8). Los miembros iniciales de la familia, CD28 e ICOS, fueron descubiertos por efectos funcionales 10 en el aumento de la proliferación de linfocitos T después de la adición de anticuerpos monoclonales (Hutloff *et al.* (1999) *Nature* 397:263-266; Hansen *et al.* (1980) *Immunogenetics* 10:247-260). PD-1 fue descubierto a través del cribado de expresión diferencial en células apotóticas (Ishida *et al.* (1992) *EMBO J* 11:3887-95). Los demás 15 miembros de la familia, CTLA-4 y BTLA, se descubrieron mediante el cribado selectivo para determinar la expresión diferencial en linfocitos T citotóxicos y células TH1, respectivamente. CD28, ICOS y CTLA-4 tienen todos un resto de cisteína no emparejado que permite la homodimerización. Por el contrario, se sugiere que PD-1 existe como un monómero, que carece del resto de cisteína no emparejado característico de demás miembros de la familia de CD28.
- 20 La proteína PD-1 es una proteína transmembrana de tipo I de 55 kDa que forma parte de la superfamilia de genes Ig (Agata *et al.* (1996) *Int Immunol* 8:765-72). La PD-1 contiene un motivo inhibidor de tirosina del inmunorreceptor proximal a la membrana (ITIM, por sus siglas en inglés) y un motivo de conmutación basado en tirosina distal a la membrana (ITSM, por sus siglas en inglés) (Thomas, M.L. (1995) *J Exp Med* 181:1953-6; Vivier, E y Daeron, M (1997) *Immunol Today* 18:286-91). Aunque estructuralmente es similar a CTLA-4, PD-1 carece del motivo MYPPPY (SEQ ID NO:27) que es crítico para la unión de B7-1 y B7-2.
- 25 Consistente con que PD-1 es un miembro inhibidor de la familia de CD28, los animales deficientes en PD-1 desarrollan diversos fenotipos autoinmunitarios, incluyendo miocardiopatía autoinmunitaria y un síndrome similar al lupus con artritis y nefritis (Nishimura *et al.* (1999) *Immunity* 11:141-51; Nishimura *et al.* (2001) *Science* 291:319-22). Adicionalmente, se ha encontrado que PD-1 desempeña una función en la encefalomielitis autoinmunitaria, lupus 30 eritematoso sistémico, enfermedad de injerto contra hospedador (EICH), diabetes tipo I y artritis reumatoide (Salama *et al.* (2003) *J Exp Med* 198:71-78; Prokunina y Alarcon-Riquelme (2004) *Hum Mol Genet* 13:R143; Nielsen *et al.* (2004) *Lupus* 13:510). En una línea tumoral de linfocitos B murinos, se ha demostrado que el ITSM de PD-1 es esencial para bloquear el flujo de Ca²⁺ mediado por BCR y la fosforilación de tirosina de las moléculas efectoras cadena abajo (Okazaki *et al.* (2001) *PNAS* 98:13866-71).
- 35 Se han identificado dos ligandos para PD-1, PD-L1 y PD-L2, que han demostrado regular negativamente la activación de los linfocitos T tras la unión a PD-1 (Freeman *et al.* (2000) *J Exp Med* 192:1027-34; Latchman *et al.* (2001) *Nat Immunol* 2:261-8; Carter *et al.* (2002) *Eur J Immunol* 32:634-43). Tanto PD-L1 como PD-L2 son homólogos de B7 que se unen a PD-1, pero no se unen a otros miembros de la familia de CD28. PD-L1 es 40 abundante en una diversidad de cánceres humanos (Dong *et al.* (2002) *Nat. Med.* 8:787-9). La interacción entre PD-1 y PD-L1 da como resultado una disminución de linfocitos infiltrantes de tumor, una disminución de la proliferación mediada por el receptor de linfocitos T y la evasión inmunitaria por parte de las células cancerosas (Dong *et al.* (2003) *J. Mol. Med.* 81:281-7; Blank *et al.* (2005) *Cancer Immunol. Immunother.* 54:307-314; Konishi *et al.* (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:5094-100). La supresión inmunitaria se puede revertir inhibiendo la interacción local de PD-1 con PD-L1, y el efecto es aditivo cuando también se bloquea la interacción de PD-1 con PD-L2 (Iwai *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:12293-7; Brown *et al.* (2003) *J. Immunol.* 170:1257-66).
- 45 La combinación para su uso como se describe en el presente documento comprende un anticuerpo antagonista de PD-1 junto con un anticuerpo antagonista de TIM-4. Por consiguiente, los antagonistas de PD-1 de la invención se unen a ligandos de PD-1 e interfieren con, reducen o inhiben la unión de uno o más ligandos al receptor de PD-1, o se unen directamente al receptor de PD-1, sin comprometer la transducción de señales a través del receptor de PD-1. En una realización, el antagonista de PD-1 se une directamente a PD-1 y bloquea la transducción de señales inhibidoras de PD-1. En otra realización, el antagonista de PD-1 se une a uno o más ligandos de PD-1 (por ejemplo, PD-L1 y PD-L2) y reduce o inhibe que el uno o más ligandos desencadenen la transducción de señales inhibidoras a través de PD-1. En una realización, el antagonista de PD-1 se une directamente a PD-L1, inhibiendo o impidiendo que PD-L1 se una a PD-1, bloqueando de este modo la transducción de señales inhibidoras de PD-1.
- 50 Los antagonistas de PD-1 incluyen proteínas de armazón de unión a PD-1 e incluyen, pero sin limitación, ligandos de PD-1, anticuerpos, agentes multivalentes y una proteína de fusión, tales como AMP-224. En una realización, el antagonista es un anticuerpo anti PD-1 ("anticuerpo PD-1"). Los anticuerpos anti PD-1 humano (o dominios VH y/o VL derivados de los mismos) adecuados para su uso en la invención se pueden generar usando métodos bien conocidos en la técnica. Como alternativa, se pueden usar anticuerpos anti PD-1 reconocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar los anticuerpos nivolumab (OPDIVO™), MK-3475 (pembrolizumab (KEYTRUDA™), PDR001 o CT-011. Adicionalmente, se pueden usar los anticuerpos monoclonales 5C4, 17D8, 2D3, 4H1, 4A11, 7D3 y 5F4, 55 descritos en el documento WO 2006/121168. También se pueden usar anticuerpos que compiten con cualquiera de estos anticuerpos reconocidos en la técnica por unirse a PD-1.

- Un anticuerpo anti PD-1 de ejemplo es 5C4, que comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 11 y 12, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno y variantes de los mismos. En otras realizaciones, el anticuerpo comprende las CDR o regiones variables de cadena pesada y ligera de 5C4. Por consiguiente, en una realización, el anticuerpo comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH de 5C4 que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 13, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la VL de 5C4 que tienen las secuencias expuestas en la SEQ ID NO: 15. En otra realización, el anticuerpo comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 17, 18 y 19, respectivamente, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 20, 21 y 22, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo comprende las regiones VH y/o VL que tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 13 y/o la SEQ ID NO: 15, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo comprende las regiones variables de cadena pesada (VH) y/o variables de cadena ligera (VL) codificadas por las secuencias de ácidos nucleicos expuestas en la SEQ ID NO: 14 y/o la SEQ ID NO: 16, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo compite por la unión con y/o se une al mismo epítopo en PD-1 que los anticuerpos mencionados anteriormente. En otra realización, el anticuerpo tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos de la región variable con los anticuerpos mencionados anteriormente (por ejemplo, al menos aproximadamente un 90 %, 95 % o un 99 % de identidad de la región variable con la SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 15).
- En determinadas realizaciones, los anticuerpos de PD1 exhiben una o más propiedades funcionales deseables, tales como unión de alta afinidad a PD-1, por ejemplo, unión a PD-1 humano con una K_D de 10^{-7} M o menos; falta de reactividad cruzada significativa con otros miembros de la familia de CD28, por ejemplo, CD28, CTLA-4 e ICOS; la capacidad de estimular la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción linfocítica mixta (MLR); la capacidad de aumentar la secreción de IFN-γ y/o IL-2 en una MLR; la capacidad de inhibir la unión de uno o más ligandos de PD-1 (por ejemplo, PD-L1 y/o PD-L2) a PD-1; la capacidad de estimular respuestas de memoria específicas de antígeno; la capacidad para estimular respuestas de anticuerpos y/o la capacidad para inhibir el crecimiento de células tumorales *in vivo*.
- En otra realización, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti PD-L1. Los anticuerpos anti PD-L1 humano (o dominios VH y/o VL derivados de los mismos) adecuados para su uso en la invención se pueden generar usando métodos bien conocidos en la técnica. Como alternativa, se pueden usar anticuerpos anti PD-L1 reconocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar MEDI4736 (también conocido como anti B7-H1; durvalumab (IMFINZI™)), MPDL3280A (atezolizumab (TECENTRIQ™), también conocido como RG7446), y avelumab (BAVENCIO™). Adicionalmente, se pueden usar los anticuerpos monoclonales 12A4, 3G10, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 y 13G4 descritos en el documento WO 2007/005874 y la Patente de EE. UU. N.º 7.943.743. También se pueden usar anticuerpos que compiten con cualquiera de estos anticuerpos reconocidos en la técnica por unirse a PD-L1.
- Un anticuerpo anti PD-L1 de ejemplo es 12A4 (documento WO 2007/005874 y Patente de EE. UU. N.º 7.943.743). En una realización, el anticuerpo comprende las CDR o VR de cadena pesada y ligera de 12A4. Por consiguiente, en una realización, el anticuerpo comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VH de 12A4 que tienen la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VL de 12A4 que tienen la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 3. En otra realización, el anticuerpo comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 8, 9 y 10, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo comprende las regiones VH y/o VL que tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: 3, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo comprende las regiones variables de cadena pesada (VH) y/o variables de cadena ligera (VL) codificadas por las secuencias de ácidos nucleicos expuestas en la SEQ ID NO: 2 y/o la SEQ ID NO: 4, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo compite por la unión con y/o se une al mismo epítopo en PD-L1 que los anticuerpos mencionados anteriormente. En otra realización, el anticuerpo tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos de la región variable con los anticuerpos mencionados anteriormente (por ejemplo, al menos aproximadamente un 90 %, 95 % o un 99 % de identidad de la región variable con la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3).
- Los anticuerpos anti PD-1 o anti PD-L1 pueden unirse a PD-1 o PD-L1, respectivamente, con una K_D de 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M o menos.
- En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti PD-1 o anti PD-L1 es un anticuerpo IgG, tal como un anticuerpo IgG1, IgG2 o IgG4. En realizaciones específicas, un anticuerpo anti PD-1 o PD-L1 tiene una región constante sin efecto. Los anticuerpos anti PD-1 o PD-L1 pueden ser anticuerpos IgG4, por ejemplo, anticuerpos IgG4 que tienen una mutación S228P.

III. Antagonistas de TIM-4

- Como se usan en el presente documento, los términos "TIM-4" y "TIMD-4", también conocidos como "proteína 4 que

5 contiene el dominio de mucina e inmunoglobulina de linfocitos T", "receptor 4 de mucina de inmunoglobulina de linfocitos T", "proteína 4 de membrana de linfocitos T" y "SMUCKLER" se usan indistintamente. Las secuencias completas de aminoácidos y nucleótidos de la isoforma 1 de TIM-4 humana se pueden encontrar con los n.º de acceso de GenBank NP_612388.2 y NM_138379.2, respectivamente (SEQ ID NO: 26-27). Las secuencias completas de aminoácidos y nucleótidos de la isoforma 2 de TIM-4 humana se pueden encontrar con los n.º de acceso de GenBank NP_001140198.1 y NM_001146726.1, respectivamente (SEQ ID NO: 28-29) (Jones *et al.*, *Int Arch Allergy Immunol.* 2006;141(4):331-6). En la figura 1 se representa una alineación de las dos isoformas humanas.

10 Las secuencias de aminoácidos de las isoformas de TIM-4 del macaco cangrejero se pueden encontrar en los n.º de acceso de GenBank XP_005558436 y EHH54702, y las secuencias de aminoácidos de las isoformas de TIM-4 murinas se pueden encontrar en los n.º de acceso de GenBank NP_848874 y NP_599009. En la figura 2 se proporciona una alineación de las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos TIM-4 de ratón, macaco cangrejero y ser humano, y en la Tabla 1 se expone el porcentaje de identidad de las regiones de longitud completa 15 e IgV de los ortólogos humanos, de macaco cangrejero y murinos.

Tabla 1. Ortólogos de TIM-4

| | hTIM4-FL | hTIM4 IgV |
|-------------------|----------|-----------|
| Macaco cangrejero | 87 % | 93 % |
| Ratón | 49 % | 64 % |

20 La proteína "TIM-4" es una proteína de membrana de tipo I que es miembro de la familia de inmunoglobulinas de linfocitos T y que contiene dominios de mucina (TIM). La familia TIM humana contiene tres miembros (TIM-1, TIM-3 y TIM-4) en el cromosoma humano 5q33.2, ubicado en una región cromosómica que se ha vinculado con el asma, la alergia y la autoinmunidad. Las proteínas TIM son glucoproteínas de la superficie celular de tipo I con características estructurales comunes que incluyen un dominio similar a la inmunoglobulina (IgV) en el extremo N con restos de cisteína altamente conservados, un dominio de mucina rico en treonina con glucosilaciones unidas a O y N, un dominio transmembrana único y una región citoplasmática. Mientras que el dominio citoplasmático de TIM-1 y TIM-3 humanos contiene uno o más motivos de fosforilación de tirosina, TIM-4 carece de un motivo de fosfotirosina.

25 TIM-4 se expresa en células mieloides, incluyendo las células dendríticas (CD) y los macrófagos del bazo, los ganglios linfáticos o la cavidad peritoneal. Se ha demostrado que TIM-4 se une a TIM-1, MerTK, integrina $\alpha v \beta 3$ y fosfatidilserina a través del dominio IgV. MerTK e Integrina $\alpha v \beta 3$ pueden desempeñar una función en determinadas actividades biológicas mediadas por TIM4 (Nishi *et al.* (2014) *Mol Cell Biol.* 34(8):1512-20 y Toda *et al.* (2012) *Mol Cell Biol.* 32(1):118-25). TIM-4 regula de manera diferencial la homeostasis de los linfocitos T al inhibir los linfocitos T sin tratar durante la fase de inducción de una respuesta inmunitaria y mejorar las respuestas de los linfocitos T en la fase efectora (Rodríguez-Manzanet *et al.*, anteriormente). Por ejemplo, TIM-4 se une a TIM-1, que está presente en 35 los linfocitos T activados, y coestimula la proliferación de linfocitos T.

30 TIM-4 se une a la fosfatidilserina (PS) a través de la hendidura de unión de FG-CC en el dominio variable de inmunoglobulina (IgV) en el extremo N. TIM-4 se regula positivamente tras la liberación de DAMP y mejora la 35 eferocitosis de las células apoptóticas por parte de los macrófagos (Kobayashi, 2007; Albacker, *et al.*, *J. Immunol.* 2010; 185:6839-6849; Mizui *et al.* *Int. Immunol.* 2008; 20:695-708). Por el contrario, los ratones con inactivación de 40 TIM-4 tienen defectos en la degradación lisosomal, la presentación de antígenos y la preparación cruzada (Miyanishi 2012, Rodrigues-Manzaneta, 2010).

45 Se ha demostrado que TIM-4 se expresa en macrófagos y CD en el microambiente tumoral (TME, por sus siglas en inglés), y puede modular la interacción entre las células mieloides y los linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno dentro de los tumores. Bahgadadi *et al.* (anteriormente) informaron que las células tumorales apoptóticas fueron 50 ingeridas por macrófagos procedentes de médula ósea (BMDM) TIM-4+, lo que sugiere que TIM-4 contribuye a la tolerancia inmunitaria al promover la degradación lisosomal excesiva de las células tumorales ingeridas, lo que conduce a una presentación alterada del antígeno tumoral por parte de los macrófagos asociados a tumores (TAM, por sus siglas en inglés) TIM-4+. La inhibición de esta función parece promover la actividad antitumoral después de la monoterapia con un anticuerpo bloqueador anti TIM-4 y demuestra una actividad antitumoral sinérgica cuando se combina con un anticuerpo bloqueador anti TIM-3 en el contexto del modelo de terapia con vacunas (Baghdadi 2013).

55 El término "antagonista" como se usa con referencia a TIM-4 se refiere a cualquier molécula que inhibe parcial o totalmente una o más actividades biológicas de TIM-4, *in vitro*, *in situ* o *in vivo*. Los ejemplos de dichas actividades biológicas incluyen la unión de TIM-4 a PS, la eferocitosis de células tumorales y la supresión de la presentación de antígenos tumorales, así como las demás informadas en la bibliografía. Los antagonistas de TIM-4 pueden funcionar de manera directa o indirecta. Por ejemplo, el antagonista de TIM-4 puede funcionar para inhibir parcial o totalmente 60 una o más actividades biológicas de TIM-4, *in vitro*, *in situ* o *in vivo* como resultado del bloqueo de la unión directa de TIM-4 a PS y/o el bloqueo de la interacción de TIM-4 con otros receptores de PS y la reducción de la capacidad celular para participar en la eferocitosis de las células tumorales. El antagonista también puede funcionar interfiriendo con la interacción de TIM-4 con TIM-1, impidiendo así la actividad reguladora directa de los linfocitos T.

El antagonista de TIM-4 también puede funcionar indirectamente para inhibir parcial o totalmente una o más actividades biológicas de TIM-4, *in vitro*, *in situ* o *in vivo* como resultado, por ejemplo, de inhibir otra molécula que, a continuación, bloquea la activación o expresión de TIM-4. Se contempla que un antagonista puede actuar como una molécula que funciona indirectamente para bloquear, inhibir o disminuir la expresión o actividad de TIM-4.

- 5 Un antagonista de TIM-4 puede ser cualquier molécula que inhiba o disminuya directa o indirectamente la actividad de TIM-4 y reduzca el crecimiento tumoral, ya sea por sí sola o junto con otro tratamiento, tal como un antagonista de PD-1. Los antagonistas de TIM-4 de ejemplo incluyen armazones de unión a TIM-4, tales como anticuerpos anti TIM-4 ("anticuerpos de TIM-4"), por ejemplo, anticuerpos químéricos, humanizados o completamente humanos, una porción de unión a antígeno de los mismos, o moléculas que se basan en o proceden de cualquiera de estos. Los antagonistas de TIM-4 también pueden ser proteínas que no son anticuerpos. Por ejemplo, los antagonistas de TIM-4 también incluyen ligandos de TIM-4 modificados o proteínas de unión, por ejemplo, TIM-1 y moléculas que proceden de o se basan en PS. Además, la biología regulada por TIM-4 puede verse interferida por proteínas de fusión tales como TIM-4: Ig.
- 10 15 Un antagonista de TIM-4 puede ser monovalente o multivalente. En determinadas realizaciones, un antagonista de TIM-4 es bivalente, trivalente, tetravalente o se une a 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más epítopos de TIM-4, que pueden ser epítopos de TIM-4 iguales o diferentes. En determinadas realizaciones, un antagonista de TIM-4 es un armazón de unión a TIM-4 monoespecífico multivalente, por ejemplo, una proteína que comprende un armazón de unión a TIM-4 que comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más regiones que se unen específicamente al mismo epítopo de TIM-4, cuyas regiones de unión pueden estar compuestas por la misma secuencia de aminoácidos o por una diferente. Por ejemplo, un antagonista de TIM-4 puede ser un armazón de unión a TIM-4 que comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más repeticiones de la misma región de unión a TIM-4, *por ejemplo*, la región IgV en el extremo N o una porción de la misma que contiene la hendidura de unión FG-CC¹ de la región IgV.
- 20 25 30 En determinadas realizaciones, un antagonista de TIM-4 se une específicamente a TIM-4, pero no se une significativamente o específicamente a otros miembros de la familia TIM, tal como TIM-1 o TIM-3. En otras realizaciones, un antagonista de TIM-4 se une específicamente a TIM-4 y TIM-1.
- 35 En otra realización, el antagonista de TIM-4 es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo que se une a TIM-4 humano con una K_D de 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M o menos, en donde el anticuerpo inhibe el crecimiento tumoral y/o aumenta los CTL específicos del antígeno tumoral. Los anticuerpos que se unen a TIM-4 humano son conocidos en la técnica. Cualquiera de estos anticuerpos puede usarse junto con un antagonista de PD-1, con la condición de que su combinación de como resultado la inhibición del crecimiento del tumor o la reducción del tamaño del tumor, por ejemplo, en un sujeto que tiene cáncer. Los anticuerpos de ejemplo incluyen aquellos que se unen específicamente al dominio IgV en el extremo N de TIM-4 (por ejemplo, la hendidura de unión FG-CC¹). Los anticuerpos anti TIM-4 incluyen aquellos que se unen a TIM-4 humano, *por ejemplo*, 9F4 (BioLegend). Los anticuerpos anti TIM4 de ratón incluyen RMT4-53 (BioXCell, GeneTex), RMT4-54 (BioLegend) F31-5G3 y 21H12 (BioLegend, BD Biosciences, respectivamente). Las variantes de estos anticuerpos, tales como los anticuerpos que comprenden las CDR de estos anticuerpos, o los anticuerpos que compiten por la unión a TIM-4 humano o murino con uno de estos anticuerpos o los anticuerpos que se unen al mismo epítopo o a uno similar en TIM-4 que uno de estos anticuerpos, pueden usarse en combinaciones con un antagonista de PD-1.
- 40 45 En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti TIM4 para su uso en los métodos descritos en el presente documento se une a una región en TIM-4 humano que no es el dominio IgV, y puede ser, por ejemplo, el dominio madre o cualquier otra región en el dominio extracelular de TIM-4, siempre que el anticuerpo antagonice la actividad biológica de TIM-4, y tenga al menos un efecto aditivo con un antagonista de PD-1 cuando se use para tratar el cáncer (en relación con cualquiera de los agentes solos).
- 50 En otra realización, el antagonista de TIM-4 es un agente multivalente, tal como un multímero (por ejemplo, una construcción de polipéptido con dominio de trimerización y un polipéptido que se une a TIM-4).
- 55 También se pueden usar agentes que compiten por la unión a TIM-4 con cualquiera de los agentes de ejemplo enumerados en el presente documento, y que inhiben el crecimiento tumoral o reducen el tamaño del tumor. Se pueden usar anticuerpos que tienen cadenas VH y VL que comprenden una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, 95 %, 98 % o un 99 % idéntica a las de cualquiera de los anticuerpos anti TIM-4 enumerados en el presente documento.
- 60 65 La administración de un antagonista de TIM-4 puede controlarse mediante imágenes con un agente de unión a fosfatidilserina (PS) (por ejemplo, péptidos de anexina V, fragmentos de unión a TIM-4), donde el agente de unión a PS puede estar marcado para la obtención de imágenes, por ejemplo, PET, SPECT, fluorescencia, etc. El agente de unión se pone en contacto con las células tumorales diana, y la presencia del agente unido es indicativa de que la PS está presente y es capaz de interactuar con TIM-4.
- Por ejemplo, la anexina V es una proteína intracelular ubicua en los seres humanos que tiene una afinidad nanomolar por el fosfolípido aniónico constitutivo unido a la membrana fosfatidilserina (PS), que se expresa

selectivamente en la superficie de células apoptóticas o estresadas fisiológicamente. Como tal, las formas radiomarcadas de la anexina V se han usado tanto en modelos animales como en ensayos humanos de Fase I y Fase II para utilizar el trazador como un marcador sustituto temprano de la eficacia terapéutica (por ejemplo, Blankenberg *et al.* Proc. Am. J. Thoracic. Soc. 2009; 6:469-476). Por ejemplo, el control *in vivo* de PS dentro del 5 microambiente tumoral puede realizarse con anti anexina V unida a un radiotrazador marcador (para PET o SPECT), o con una proteína de fusión TIM-4 unida a un marcador o radiotrazador. Los marcadores podrían incluir puntos q para imágenes de infrarrojo cercano u otros marcadores más convencionales. Los estudios de pK/Kd pueden realizarse con anticuerpos radiomarcados.

10 **IV. Composiciones**

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende un antagonista de PD-1 y un antagonista de TIM-4 (por ejemplo, formulados juntos en una única composición o formulados por separado). En una 15 realización, el antagonista de PD-1 es nivolumab, pembrolizumab, durvalumab, atezolizumab, avelumab o PDR001. En una realización, la composición comprende un antagonista de PD-1 y un antagonista de TIM-4, en donde (a) el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti PD-1 que comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena pesada que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 13, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena ligera que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 15; y (b) el antagonista de TIM-4 es un anticuerpo. En otra realización, la composición comprende un antagonista de PD-1 y un 20 antagonista de TIM-4, en donde (a) el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti PD-L1 que comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena pesada que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena ligera que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3 y (b) el antagonista de TIM-4 es un anticuerpo.

25 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración a pacientes humanos se formulan típicamente para administración parenteral, por ejemplo, en un portador líquido, o son adecuadas para la reconstitución en una solución o suspensión líquida para administración intravenosa.

30 En general, dichas composiciones típicamente comprenden un portador farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno o enumerado en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, particularmente en seres humanos. El término "transportador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto. Dichos portadores farmacéuticos 35 pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen en el petróleo, animal, vegetal o sintéticos, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y ricinoleato de polietilenglicol y glicerol. Como portadores pueden emplearse agua o soluciones salinas acuosas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para soluciones inyectables. Las composiciones líquidas para administración parenteral se pueden formular para administración por inyección o infusión continua. Las vías de administración mediante inyección o infusión incluyen las vías intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratecal y 40 subcutánea.

45 Para uso oral, las composiciones farmacéuticas de la presente invención, pueden administrarse, por ejemplo, en forma de comprimidos o cápsulas, polvos, gránulos dispersables u obleas, o como soluciones o suspensiones acuosas. En el caso de comprimidos para uso oral, los portadores que se usan habitualmente incluyen lactosa, almidón de maíz, carbonato de magnesio, talco y azúcar, y normalmente se añaden agentes lubricantes tales como esteаратo de magnesio. Para administración oral en forma de cápsula, los portadores útiles incluyen lactosa, almidón de maíz, carbonato de magnesio, talco y azúcar. Cuando se usan suspensiones acuosas para administración oral, habitualmente se añaden agentes emulsionantes y/o de suspensión.

50 Además, a las composiciones orales se les pueden añadir agentes edulcorantes y/o saporíferos. Para administración intramuscular, intraperitoneal, subcutánea e intravenosa, normalmente se emplean soluciones estériles del uno o más principios activos, y el pH de las soluciones deberá ajustarse y tamponarse de forma adecuada. Para uso intravenoso, la concentración total del uno o más solutos debe controlarse con el fin de convertir en isotónica la preparación.

55 Para preparar supositorios de acuerdo con la invención, primero se funde una cera de bajo punto de fusión, tal como una mezcla de glicéridos de ácidos grasos o manteca de cacao, y el principio activo se dispersa homogéneamente en la cera, por ejemplo, mediante agitación. A continuación, la mezcla homogénea fundida se vierte en moldes de tamaño conveniente y se deja enfriar y, de este modo, solidificar.

60 Las preparaciones líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones. Dichas preparaciones tienen como ejemplo soluciones de agua o agua/propilenglicol para inyección parenteral. Las preparaciones líquidas pueden incluir también soluciones para administración intranasal.

65 Las preparaciones en aerosol adecuadas para inhalación pueden incluir soluciones y sólidos en forma de polvo, que pueden estar en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable, tal como un gas comprimido inerte.

También se incluyen preparaciones sólidas que están destinadas a convertirse, poco antes de su uso, en preparaciones líquidas para administración oral o parenteral. Dichas formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones.

5

V. Poblaciones de pacientes

En el presente documento se proporciona una combinación de un antagonista de TIM-4 y un antagonista de PD-1 para su uso en métodos eficaces para tratar el cáncer en un paciente. En una realización, el paciente padece un cáncer seleccionado del grupo que consiste en carcinoma, sarcoma, blastoma, leucemia y linfoma. En otra realización, el paciente padece un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer gastrointestinal, cáncer colorrectal, cáncer de estómago, carcinoma de colon y glioblastoma. En otra realización, el paciente padece un cáncer seleccionado del grupo que consiste en leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda positiva para el cromosoma Filadelfia (LLA Ph+), carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, glioma, cáncer gastrointestinal, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, cáncer de cuello del útero, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon y cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, tumor de células germinales, sarcoma pediátrico, linfocitos citolíticos naturales sinonasales, mieloma múltiple, leucemia mielógena aguda (LMA) y leucemia linfocítica crónica (LLC).

VI. Terapias/agentes adicionales

Las combinaciones para su uso de la presente invención (por ejemplo, anticuerpo antagonista de PD-1 junto con un anticuerpo antagonista de TIM-4) también pueden usarse junto con otras terapias bien conocidas que se seleccionan por su utilidad particular contra el cáncer que se está tratando. Como alternativa, las combinaciones de la presente invención pueden usarse secuencialmente con uno o más agentes farmacéuticamente aceptables conocidos cuando no sea adecuado.

Por ejemplo, los antagonistas de PD-1 y el antagonista de TIM-4 descritos en el presente documento se pueden usar además junto (por ejemplo, simultáneamente o por separado) con un tratamiento adicional, tal como irradiación, quimioterapia (por ejemplo, usando camptotecina (CPT-11), 5-fluorouracilo (5-FU), cisplatino, doxorrubicina, irinotecán, paclitaxel, gemcitabina, cisplatino, paclitaxel, doxorrubicina, 5-fu o camptotecina + apo2l/TRAIL (un combo 6X)), uno o más inhibidores del proteasoma (por ejemplo, bortezomib o MG132), uno o más inhibidores de Bcl-2 (por ejemplo, BH3L-2' (inhibidor de bcl-xL), AT-101 (derivado de R-(-)-gossipol), ABT-263 (molécula pequeña), GX-15-070 (obatoclax) o MCL-1 (antagonistas de la proteína 1 de diferenciación celular de leucemia mieloide), antagonistas de iAP (inhibidor de la proteína de apoptosis) (por ejemplo, smac7, smac4, mimético smac de molécula pequeña, péptidos smac sintéticos (véase Fulda *et al.*, Nat Med 2002;8:808-15), ISIS23722 (LY2181308) o AEG-35156 (GEM-640)), HDAC (inhibidores de la histona desacetilasa), anticuerpos anti CD20 (por ejemplo, rituximab), inhibidores de la angiogénesis (por ejemplo, bevacizumab), agentes antiangiogénicos dirigidos a VEGF, y VEGFR, triterpenoides sintéticos (véase Hyer *et al.*, Cancer Research 2005;65:4799-808), moduladores de c-FLIP (proteína inhibidora celular de FLICE) (por ejemplo, ligandos naturales y sintéticos de PPARy (receptor activado por el proliferador de peroxisomas γ), 5809354 o 5569100), inhibidores de cinasa (por ejemplo, sorafenib) y/o fármacos genotóxicos.

Los antagonistas de PD-1 y los antagonistas de TIM-4 descritos en el presente documento se pueden usar además junto con uno o más agentes citotóxicos antiproliferativos. Las clases de compuestos que pueden usarse como agentes citotóxicos antiproliferativos incluyen, pero sin limitación, las siguientes: Agentes alquilantes (incluyendo, sin limitación, mostazas nitrogenadas, derivados de etilenimina, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas y triazenos): mostaza de uracilo, clormetina, ciclofosfamida (CYTOXAN™) fosfamida, melfalán, clorambucilo, pipobromano, trietilenomelamina, trietilenotiofosforamina, busulfán, carmustina, lomustina, estreptozocina, dacarbazine y temozolomida.

Antimetabolitos (incluyendo, sin limitación, antagonistas de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores de adenosina desaminasa): metotrexato, 5-fluorouracilo, floxuridina, citarabina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, fosfato de fludarabina, pentostatina y gemcitabina.

Los agentes antiproliferativos adecuados para su uso en los métodos de la invención incluyen, sin limitación, taxanos, paclitaxel (el paclitaxel está disponible comercialmente como TAXOL.RTM.), docetaxel, discodermolida (DDM), dictiostatina (DCT), pelorusida A, epotilonas, epotilona A, epotilona B, epotilona C, epotilona D, epotilona E, epotilona F, furanoepotilona D, desoxiepotilona B1, [17]-deshidrodesoxiepotilona B, [18]-deshidrodesoxiepotilona B, C12,13-ciclopamil-epotilona A, epotilona A puenteada C6-C8, trans-9,10-deshidroepotilona D, cis-9,10-deshidroepotilona D, 16-desmetilepotilona B, epotilona B10, discoderomolida, patupilona (EPO-906), KOS-862, KOS-1584, ZK-EPO, ABJ-789, XAA296A (discodermolida), TZT-1027 (soblidotina), ILX-651 (tasidotina clorhidrato), halicondrina B, mesilato de eribulina (E-7389), hemiasterlina (HTI-286), E-7974, criptofincinas, LY-355703, inmunoconjungados de maitansinoide (DM-1), MKC-1, ABT-751, T1-38067, T-900607, SB-715992 (ispinesib), SB-

743921, MK-0731, STA-5312, eleuterobina, 17beta-acetoxi-2-etoxy-6-oxo-B-homo-estra-1,3,5(10)-trien-3-ol, ciclostreptina, isolaulimalida, laulimalida, 4-epi-7-deshidroxi-14,16-didemetyl-(+)-discodermolidas y criptotilona 1, además de otros agentes estabilizadores de la microtubulina conocidos en la técnica.

- 5 En los casos donde es deseable hacer que las células proliferativas aberrantes queden inactivas junto con o antes del tratamiento con los métodos quimioterápicos de la invención, también se pueden administrar al paciente hormonas y esteroides (incluidos análogos sintéticos), tales como 17a-etinilestradiol, dietilestilbestrol, testosterona, prednisona, fluoximasterona, propionato de dromostanolona, testolactona, megestrolacetato, metilprednisolona, metil-testosterona, prednisolona, triamcinolona, clorotriานiseno, hidroxiprogesterona, aminoglutetimida, estramustina, medroxiprogesteronaacetato, leuprolida, flutamida, toremifeno, ZOLADEX™. Cuando se emplean las combinaciones para su uso o composiciones de la presente invención, también se pueden administrar otros agentes usados en la modulación del crecimiento o metástasis tumoral en un entorno clínico, tales como antimiméticos, según se deseé.
- 10 Los métodos para la administración segura y eficaz de la mayoría de los agentes quimioterápicos son conocidos por los expertos en la técnica. Además, su administración se describe en la bibliografía convencional. Por ejemplo, la administración de muchos de los agentes quimioterápicos se describe en la Physicians' Desk Reference (PDR), por ejemplo, edición de 1996 (Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, EE. UU.).
- 15 Un anticuerpo antagonista de PD-1 y un anticuerpo antagonista de TIM4 también pueden combinarse con uno o más agentes de inmunoterapia que estimulan el sistema inmunitario, por ejemplo, un agente que se une a CTLA-4, LAG-3, GITR, OX40, IDO, CSF-1R humanos, etc.
- 20 El uno o más agentes quimioterápicos y/o la radioterapia se pueden administrar de acuerdo con protocolos terapéuticos bien conocidos en la técnica. Resultará evidente para los expertos en la técnica que la administración del uno o más agentes quimioterápicos y/o la radioterapia se puede variar dependiendo de la enfermedad a tratar y los efectos conocidos del uno o más agentes quimioterápicos y/o la radioterapia sobre dicha enfermedad. Además, de acuerdo con el conocimiento del médico experto, los protocolos terapéuticos (por ejemplo, cantidades de dosificación y tiempos de administración) se pueden variar a la luz de los efectos observados de los agentes terapéuticos administrados sobre el paciente, y a la luz de las respuestas observadas de la enfermedad a los agentes terapéuticos administrados.
- 25
- 30

VII. Protocolos de tratamiento

35 Los protocolos de tratamiento adecuados para tratar el cáncer en un paciente incluyen, por ejemplo, administrar al paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista de PD-1 y un anticuerpo antagonista de TIM-4.

40 Como se usa en el presente documento, la administración adyuvante o combinada (administración conjunta) incluye la administración simultánea de los dos antagonistas en la misma forma farmacéutica o en una forma farmacéutica diferente, o la administración separada de los dos antagonistas (por ejemplo, administración secuencial). Por lo tanto, el anticuerpo antagonista de PD-1 y el anticuerpo antagonista de TIM-4 se pueden administrar simultáneamente en una única formulación. Como alternativa, el antagonista de PD-1 y el antagonista de TIM-4 se pueden formular para una administración separada y se administran de forma concurrente o secuencial.

45 Por ejemplo, el antagonista de PD-1 se puede administrar primero seguido (por ejemplo, inmediatamente seguido) de la administración del antagonista de TIM-4, o viceversa. En una realización, el antagonista de PD-1 se administra antes de la administración del antagonista de TIM-4, por ejemplo, el antagonista de PD-1 se infunde en el paciente primero, seguido de 10 minutos a 3 horas más tarde de una infusión del antagonista de TIM-4. En una realización, el antagonista de TIM-4 se administra antes de la administración del antagonista de PD-1, por ejemplo, el antagonista de TIM-4 se infunde en el paciente primero, seguido de 10 minutos a 3 horas más tarde de una infusión del antagonista de PD-1. Dicha administración concurrente o secuencial da como resultado preferentemente que ambos antagonistas estén presentes simultáneamente en los pacientes tratados. En otra realización, el antagonista de TIM-4 y el antagonista de PD-1 se administran simultáneamente.

55 En una realización, a un sujeto se le administra una dosis única de un antagonista de TIM-4 y una dosis única del antagonista de PD-1, por ejemplo, un anticuerpo anti PD-1 o anti PD-L1. En determinadas realizaciones, se administran múltiples dosis (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) de un antagonista de TIM-4 y múltiples dosis (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) de un antagonista de PD-1 a un sujeto que necesita tratamiento. La administración del antagonista de TIM-4 y del antagonista de PD-1 puede realizarse el mismo día o, como alternativa, el antagonista de TIM-4 puede administrarse 1 o más días antes o después del antagonista de PD-1.

60 En una realización, las administraciones de un antagonista de TIM-4 y un antagonista de PD-1 pueden realizarse semanal o mensualmente, en cuyo régimen pueden administrarse el mismo día (por ejemplo, simultáneamente), o uno después del otro (por ejemplo, uno o más minutos, horas o días antes o después uno del otro). En una realización, el antagonista de TIM-4 y el antagonista de PD-1 se administran cada tres días.

65 En una realización, la dosis del antagonista de PD-1 y/o antagonista de TIM-4 varía con el tiempo. Por ejemplo, el

antagonista de PD-1 y/o antagonista de TIM-4 pueden administrarse inicialmente a una dosis alta y puede reducirse con el tiempo. En otra realización, el antagonista de PD-1 y/o antagonista de TIM-4 se administran inicialmente a una dosis baja y se aumenta con el tiempo.

- 5 En otra realización, la cantidad del antagonista de PD-1 y/o antagonista de TIM-4 administrada es constante para cada dosis. En otra realización, la cantidad del antagonista de PD-1 y/o antagonista de TIM-4 varía con cada dosis. Por ejemplo, la dosis de mantenimiento (o de continuación) del antagonista puede ser mayor o igual que la dosis de carga que se administra primero. En otra realización, la dosis de mantenimiento del antagonista puede ser inferior o igual que la dosis de carga. Un médico clínico puede utilizar dosificaciones preferidas según se justifique por la
10 afección del paciente que está tratando. La dosis puede depender de una serie de factores, incluyendo el estadio de la enfermedad, etc. La dosis específica que debe administrarse en función de la presencia de uno o más de dichos factores está dentro de la habilidad del experto. Generalmente, el tratamiento se inicia con dosificaciones más pequeñas por debajo de la dosis óptima del compuesto. Posteriormente, la dosificación se aumenta en pequeñas cantidades hasta que se alcanza el efecto óptimo en las circunstancias dadas. Por conveniencia, la dosificación
15 diaria total puede dividirse y administrarse en porciones durante el día, si se desea. También puede usarse terapia intermitente (por ejemplo, una semana de cada tres semanas o tres de cada cuatro semanas).

En una realización, el anticuerpo antagonista de TIM-4 se administra a una dosis de 0,1, 0,3, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mg/kg de peso corporal. En otra realización, el anticuerpo antagonista de PD-1 se administra a una dosis de 0,5, 20 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mg/kg de peso corporal. Generalmente, 200 µg/ratón son aproximadamente 10 mg/kg y 100 µg/ratón son aproximadamente 5 mg/kg. Por lo tanto, basándose en los experimentos descritos en el presente documento, pueden administrarse a un sujeto una o más dosis de 1-20 mg/kg de peso corporal, 1-10 mg/kg de peso corporal, 5-20 mg/kg de peso corporal o 5-10 mg/kg de peso corporal de un antagonista de TIM-4 y antagonista de PD-1. En determinadas realizaciones, se usa una dosis de 0,3 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal de un antagonista de TIM-4 y se usa una dosis de al menos 1 mg/kg, por ejemplo, 1-10 mg/kg de peso corporal de un antagonista de PD-1.

VIII. Resultados

- 30 Los pacientes, por ejemplo, seres humanos, tratados de acuerdo con la invención experimentan preferentemente una mejora en al menos un signo de cáncer. En una realización, la mejora se mide mediante una reducción de la cantidad y/o tamaño de las lesiones tumorales medibles. En otra realización, las lesiones se pueden medir en radiografías de tórax o en las películas de TAC o RMN. En otra realización, se puede usar citología o histología para evaluar la respuesta a una terapia.
35

En una realización, el paciente tratado exhibe una reducción en el tamaño de un tumor, reducción del número de lesiones metastásicas en el tiempo, respuesta completa, respuesta parcial y enfermedad estable. En otra realización, el paciente tratado experimenta retracción del tumor y/o disminución de la velocidad de crecimiento, es decir, supresión del crecimiento del tumor. En otra realización, la proliferación celular no deseada se reduce o se inhibe.
40 En otra realización más, se puede producir uno o más de los siguientes: se puede reducir el número de células cancerosas; se puede reducir el tamaño del tumor; la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos se puede inhibir, retrasar, ralentizar o detener; la metástasis tumoral se puede ralentizar o inhibir; el crecimiento del tumor se puede inhibir; la recidiva del tumor se puede prevenir o retrasar; uno o más de los síntomas asociados con el cáncer se pueden aliviar en cierta medida.
45

En otra realización, la combinación para su uso descrita en el presente documento produce una tasa de beneficio clínico comparable (CBR = CR (respuesta completa), PR (respuesta parcial) o SD (enfermedad estable) ≥6 meses) mejor que la lograda por un antagonista de PD-1 (por ejemplo, anticuerpo) o TIM-4 (por ejemplo, anticuerpo) solo. En otras realizaciones, la mejora de la tasa de beneficio clínico es de aproximadamente el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o más, por ejemplo, en comparación con el tratamiento con un antagonista de PD-1 o antagonista de TIM-4 solo o en relación con el crecimiento del tumor el primer día de tratamiento o inmediatamente antes del inicio del tratamiento.
55

En otra realización, la administración de un antagonista de PD-1 y un antagonista de TIM-4 da como resultado una reducción de al menos tres veces (por ejemplo, una reducción de 3,5 veces) en el volumen del tumor, por ejemplo, en relación con el tratamiento con el antagonista de PD-1 o el antagonista de TIM-4 solo o en relación con el crecimiento del tumor el primer día de tratamiento o inmediatamente antes del inicio del tratamiento.

En una realización adicional, la administración de un antagonista de PD-1 y un antagonista de TIM-4 da como resultado una inhibición del crecimiento del tumor de al menos el 80 %, por ejemplo, en relación con el tratamiento con el antagonista de PD-1 o el antagonista de TIM-4 solo o en relación con el crecimiento del tumor el primer día de tratamiento o inmediatamente antes del inicio del tratamiento.
60

En determinadas realizaciones, la administración de un antagonista de PD-1 y un antagonista de TIM-4 reduce la masa tumoral en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % con respecto a la masa tumoral antes del inicio del tratamiento o el primer día de tratamiento. En alguna realización, la masa
65

tumoral ya no es detectable después del tratamiento como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, un sujeto está en remisión parcial o completa. En determinadas realizaciones, un sujeto tiene una mayor supervivencia general, tasa de supervivencia media y/o supervivencia libre de progresión.

5 **IX. Kits y formas farmacéuticas unitarias**

También se proporcionan en el presente documento kits que incluyen una composición farmacéutica que contiene (a) un anticuerpo antagonista de PD-1 y (b) un anticuerpo antagonista de TIM-4 y un portador farmacéuticamente aceptable, en una cantidad terapéuticamente eficaz adaptada para su uso en los métodos anteriores. En una 10 realización, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo (por ejemplo, 5C4 o 12A4, respectivamente). En otra realización, el antagonista de TIM-4 es un anticuerpo. Los kits opcionalmente también pueden incluir instrucciones, por ejemplo, que comprenden programas de administración, para permitir que un profesional (por ejemplo, un 15 médico, enfermera o paciente) administre la composición contenida en el mismo a un paciente que tiene cáncer. El kit también puede incluir una jeringa.

15 Opcionalmente, los kits incluyen múltiples envases de las composiciones farmacéuticas de dosis única que contienen cada uno una cantidad eficaz del antagonista de PD-1 y el antagonista de TIM-4 para una única administración de acuerdo con los métodos proporcionados anteriormente. También pueden incluirse en los kits 20 instrumentos o dispositivos necesarios para administrar la una o más composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, un kit puede proporcionar una o más jeringas precargadas que contienen una cantidad del antagonista de PD-1 y el antagonista de TIM-4.

25 En una realización, la presente invención proporciona un kit para tratar el cáncer en un paciente, comprendiendo el kit:

25 (a) una dosis de un antagonista de PD-1;
 (b) una dosis de un antagonista de TIM-4; y
 (c) instrucciones para usar el antagonista de PD-1 y el antagonista de TIM-4 en los métodos descritos en el 30 presente documento, en donde el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti antagonista de PD-1 y el antagonista de TIM-4 es un anticuerpo anti antagonista de TIM-4.

En una realización, la presente invención proporciona un kit para tratar el cáncer en un paciente, comprendiendo el kit:

35 (a) una o más dosis de un antagonista de PD-1;
 (b) una o más dosis de un antagonista de TIM-4; y
 (c) instrucciones para usar el antagonista de PD-1 y el antagonista de TIM-4 en los métodos descritos en el 40 presente documento, en donde el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti antagonista de PD-1 y el antagonista de TIM-4 es un anticuerpo anti antagonista de TIM-4.

40 En determinadas realizaciones, el antagonista de TIM-4 es un anticuerpo. En determinadas realizaciones, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo. En realizaciones particulares, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti PD-1 que comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena pesada que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 13, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena 45 ligera que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 15. En otra realización particular, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti PD-L1 que comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena pesada que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena ligera que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3.

50 **Ejemplos**

Materiales y métodos

Animales

55 Se usaron ratones C57BL6 hembra de diez a once semanas de edad (Harlan) en los estudios. Los ratones recibieron comida y agua *ad libitum* y se mantuvieron en un ambiente controlado de acuerdo con las regulaciones internacionales de la Asociación para la Evaluación y Acreditación de Laboratorio de Cuidado de Animales (AAALAC, por sus siglas en inglés). Todos los estudios en animales han sido aprobados por el comité de ética 60 correspondiente y, por lo tanto, se han realizado de conformidad con las normas éticas establecidas en la Declaración de Helsinki de 1964 y sus enmiendas posteriores.

Anticuerpos

65 El anticuerpo monoclonal anti PD-1 de ratón (mAb anti mPD-1) clon 4H2, isotipo IgG1 de ratón, se produjo y se purificó por Bristol-Myers Squibb (Biologics Discovery, CA). El mAb anti TIM-4, RMT4-53 se ha descrito previamente

(Yeung *et al.*, J. Immunol. 2009; 191:4447-4455). Brevemente, se inmunizaron ratas Sprague Dawley con una proteína de fusión TIM-4-Ig que contenía el dominio extracelular de TIM-4 murino (aa 1-288) con la porción Fc de IgG2a de ratón, y que fusionaba células LN con células de mieloma P3U1. RMT4-53 reacciona con células TIM-4/NRK pero no con células NRK progenitoras u otras células de la familia TIM transfectadas (TIM-1 B6/NRK, TIM-1 BALB/NRK, TIM-2/NRK, TIM-3 B6/NRK, TIM-3 BALB/NRK). Se certificó que los anticuerpos tenían niveles de endotoxina <0,5 UE/mg, >95 % de pureza y <5 % de especies de alto peso molecular. Las soluciones madre de mAb anti mPD-1 (clon 4H2; IgG1 de ratón) y anticuerpo anti mTIM-4 (clon RM 4-53; IgG2a de rata) se mantuvieron a 4 °C antes de su uso. Las soluciones de dosificación de mAb anti mPD-1 y mAb anti mTIM-4 se prepararon en solución salina tamponada con fosfato estéril (pH 7,0) y se mantuvieron a 4 °C.

10

Líneas celulares

CT-26 es una línea celular de carcinoma de colon indiferenciado con una morfología de fibroblastos (ATCC). Los ratones inoculados por vía subcutánea desarrollan tumores letales con una frecuencia del 80 % con 10^3 células y del 100 % con 10^4 células. Las metástasis pulmonares se desarrollan cuando se inoculan ratones, por vía intravenosa, con 10^4 células (Wang *et al.* J. Immunol. 1995; 154:4685-4692). La línea celular MC38 se obtuvo de células de adenocarcinoma de colon murino C57BL6 (CD44+ALDH1+) con una morfología epitelial.

20

Expresión de TIM-4

20

La expresión de TIM-4 en macrófagos peritoneales de ratón y TAM se confirmó mediante citometría de flujo.

Inmunohistoquímica

25 El análisis inmunohistoquímico con anticuerpo anti TIM4 de conejo (Atlas Antibodies, HPA015625) demostró la expresión de TIM-4 en macrófagos residentes en tejido presentes en amígdalas, pulmón e hígado humanos. La expresión se demostró en tejido fijado que se seccionó y se aplicó a un portaobjetos de vidrio Superfrost Plus con un grosor de 5 micrómetros. Las secciones se dejaron secar durante una noche a temperatura ambiente. A continuación, los tejidos se desparafinaron en xileno seguido de hidratación con agua destilada en una serie 30 graduada de etanol. La recuperación de antígeno se realizó usando HIER con EDTA Biocare Medical, a pH 8,2 (1x) a aproximadamente 115 °C durante 1 minuto y a continuación se enfrió durante 20 minutos a TA. Las secciones se aclararon en tampón TNT (TBS + Tween al 0,5 %) y se aislaron usando un bolígrafo PAP. El bloqueo se realizó con Biocare Medical Background Sniper durante 30 minutos a TA, seguido de aclarado con tampón TNT 1x, incubación en bloqueo de peroxidasa Dako durante 10 minutos a TA y aclarados con tampón TNT 2x. La tinción primaria de 35 anticuerpos se realizó usando una dilución 1/1000 en diluyente de anticuerpos Biocare Medical Renaissance y reductor de fondo durante 60 minutos a TA y aclarados con tampón TNT 3x. El anticuerpo de detección se aplicó usando la cantidad adecuada de gotas para cubrir la sección con polímero de conejo-HRP MACH3 de Biocare Medical e incubando durante 30 minutos a TA seguida de aclarados con tampón TNT 3x. Las muestras se incubaron con Biocare Medical Betazoid DAB y la reacción se detuvo colocando los portaobjetos en agua). Las secciones se 40 contratiñieron con hematoxilina, Leica durante 30 segundos, se lavaron con agua del grifo, se incubaron en solución Bluing durante 45 segundos a 1 minuto, se lavaron 2 veces con agua, se deshidrataron en series graduadas de alcohol y xileno y a continuación se montaron.

Ejemplo 1: Inhibición de la eferocitosis por el anticuerpo anti TIM-4

45

Los timocitos se aislaron de ratones BALB/c y se cultivaron con o sin dexametasona durante 4 horas para inducir la apoptosis. A continuación, las células se incubaron con el colorante pHrodo durante 5-10 minutos de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Thermofisher Scientific). Brevemente, se lavaron 2×10^7 células en medio sin suero 1x y se suspendieron de nuevo en 1 ml de diluyente C (número de catálogo G8278). A continuación, las células se tiñeron añadiendo 1 ml de solución de colorante 2x (añadiendo 4 ml de la solución de colorante etanólico PKH26 (número de catálogo P9691) a 1 ml de diluyente C) y mezclando la muestra mediante pipeteo. La incubación fue durante 5 minutos con mezcla periódica. La reacción de tinción se detuvo añadiendo un volumen igual de suero e incubando durante 1 minuto. A continuación, las células se lavaron 1 vez en medio sin suero y 2 veces en PBS. Se inyectaron i.p. 3×10^6 células marcadas con pHrodo en ratones BALB/c y los macrófagos peritoneales se recogieron mediante lavado inyectando 3-5 ml de PBS enfriado con hielo + EDTA 2 mM en la cavidad peritoneal de los ratones sacrificados, palpando el abdomen y a continuación extrayendo la solución mediante aspiración con aguja. A los animales experimentales se les inyectó el anticuerpo anti TIM4 RMT4-53 1 hora antes de la inyección de los timocitos T marcados con pHrodo.

60 La captación de células apoptóticas por parte de los macrófagos peritoneales se midió usando citometría de flujo. Brevemente, los macrófagos peritoneales se lavaron 2 veces en PBS, se suspendieron de nuevo en 100 µl de colorante de viabilidad (eBioscience) y se incubaron en hielo durante 15 minutos. Las células se lavaron 1 vez en PBS y se incubaron en FcBlock (BioLegend) durante 15 minutos sobre hielo. A continuación, las células se tiñeron con anticuerpos contra CD45 (BD), Tim-4 (BioLegend), CD 11b (BioLegend), CD 206 (BioLegend) y F4/80+ (BioLegend), durante 30 minutos sobre hielo. A continuación, las células se lavaron 1 vez y se suspendieron de nuevo en Perm/Fix. A continuación, las muestras se recogieron en un LSR Fortessa x20 (BD). Para identificar las

células que participaban en la eferocitosis, se seleccionaron células mieloídes CD45+/CD11b+ de la población de células vivas. De estas células, los macrófagos que participaban en la eferocitosis se definieron como F4/80+, OPKH26+. Los resultados se exponen en la Tabla 2.

5

Tabla 2.

| | % de células apoptóticas |
|----------------------------|--------------------------|
| Control | 25-40 |
| Control + Dex | 50-70 |
| Experimental + anti TIM4 | 10-15 |
| Experimental + Dex y TIM-4 | 22-42 |

Los resultados demuestran un aumento de la eferocitosis de las células apoptóticas (50-70 %) en relación con las células no apoptóticas (25-40 %). La adición del anticuerpo de bloqueo anti TIM-4 redujo en gran medida la captación tanto de células viables como apoptóticas. Esto demuestra que TIM-4 es un mediador importante de la captación celular.

10

Ejemplo 2: Inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* en el modelo CT26 mediante tratamiento combinado con anticuerpo anti TIM-4 y anticuerpo anti PD-1

15 Se realizó un experimento en un modelo tumoral murino para ensayar la hipótesis de que la combinación de anti TIM-4 y anti PD-1 potenciaría la eficacia antitumoral. Se evaluó el crecimiento tumoral en ratones SC CT-26, un modelo tumoral de adenocarcinoma de colon (TGM-1438), después del tratamiento con el anticuerpo anti TIM4, RTM-453, solo o junto con un anticuerpo anti PD1, IgG1 D265A.

20 El día 0 se implantaron por vía subcutánea 10^6 células CT-26 a ratones BALB/c hembra (Harlan; de aproximadamente 8-9 semanas de edad). Se evaluaron sesenta ratones por peso corporal y mediciones de tumores después de una dosificación 2 veces/semana de acuerdo con el siguiente programa:

Tabla 3: Programa de dosificación:

| Grupo | N | Tratamiento | Régimen de dosificación |
|-------|----|--|------------------------------------|
| 1 | 15 | mAb de control de isotipo IgG1 | 0,45 mg, IP, d. 7, 10, 13 |
| 2 | 15 | mAb de IgG1 mPD-1 D265A + mAb de control | 0,2 + 0,25* mg, IP, d. 7, 10, 13 |
| 4 | 15 | mAb de IgG2a mTIM-4 de rata + mAb de control | 0,25 + 0,2* mg, IP, d. 7, 10, 13 |
| 6 | 15 | mAb mTIM-4 + mPD-1 | 0,25 mg + 0,2 mg, IP, d. 7, 10, 13 |

25

Los días de la dosificación, se combinaron los dos anticuerpos y se inyectó un total de 100 μ l de anticuerpo combinado en los ratones. Se extrajeron los bazo y los tumores de cinco ratones por grupo y se procesaron para el análisis de citometría de flujo de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) y células inmunitarias del bazo el día 16 de acuerdo con el siguiente protocolo:

30 Brevemente, las células se suspendieron de nuevo en PBS y se dividieron en alícuotas en placas (bazos 2 x 10^6 /pocillo, todas las células tumorales/pocillo) y a continuación se lavaron 2 veces en PBS, con retroceso. A continuación, las células se suspendieron de nuevo en 100 μ l de colorante de viabilidad (eBioscience) y se incubaron en hielo durante 15 minutos. Las células se lavaron 1 vez en PBS y se incubaron en 50 μ l de FcBlock (BioLegend) durante 15 minutos sobre hielo y a continuación se tiñeron con 50 μ l de mezcla de tinción de

35 anticuerpos como se describe a continuación durante 30 minutos. A continuación, las células se lavaron 1 vez con tampón FACS y se suspendieron de nuevo en Perm/Fix. A continuación, las muestras se recogieron en un LSR Fortessa x20 (BD).

Panel de linfocitos T

| Fluor | Especificidad | Ciso | Anticuerpo | N.º de cat. | Empresa | Ab diln |
|------------------------------|---------------|------|--|-------------|-------------|---------|
| AlexaFluor 488 (FITC) CD107a | 104E | | Anticuerpo anti CD107a de rata Alexa Fluor® (LAMP-1) | 121608 | BioLegend | 1:100 |
| PE-Cy5.1 | AF598 | | Anticuerpo anti CD115 de rata PE (CSF-1R) | 135596 | BioLegend | 1:100 |
| PerCP-Cy5.5 CD49b | BU5 | | Anticuerpo anti CD49b de rata PerCP/Cy5.5 (linfocitos pan-NK) | 108916 | BioLegend | 1:100 |
| BUV395 CD45 | 30-F11 | | Anticuerpo anti CD45 de rata de rata BUV395 | 564279 | eBioscience | 1:100 |
| BV421 CD8 | 53-6.7 | | Anticuerpo anti CD8a de rata Brilliant Violet 421™ | 100738 | BioLegend | 1:200 |
| BVS10 CD4 | RM4-5 | | Anticuerpo anti CD4 de rata Brilliant Violet 510™ | 100653 | BioLegend | 1:200 |
| BV605 Thy1.2 | 53-2.1 | | Anticuerpo anti CD80.2 de rata Brilliant Violet 605™ (Thy-1.2) | 140317 | BioLegend | 1:200 |
| BV711 CD62L | MEL-14 | | Anticuerpo anti CD62L de rata Brilliant Violet 711™ | 104445 | BioLegend | 1:200 |
| BV785 CD44 | IM7 | | Anticuerpo anti CD44 de rata Brilliant Violet 785™ | 103041 | BioLegend | 1:200 |
| APC-Foxp3 | FR-165 | | APC anti Foxp3 de rata/ratón | 17-5773-808 | eBioscience | 1:100 |
| PE-Cy7 Ki-67 | 5G10S | | Antígeno Ki-67 de rata/ratón PE-Cy7 | ZS-5692-82 | eBioscience | 1:100 |
| APC-eFluor 780 (APC-Cy7) | n/a | | Colorante de viabilidad fíbrila eFluor® 780 | ES-0665-14 | eBioscience | 1:1000 |
| Blóqueo Fc bloque | 93 | | TruStain FcX anti CD16/32 de rata | 101320 | BioLegend | |

40

Ki-67 para evaluar las células en proliferación;

análisis de CD44/CD62L para determinar los linfocitos T del subconjunto en subconjuntos de linfocitos T sin tratar, activados y de memoria;

5

FoxP3 para evaluar la población de Tregs (FoxP3+CD4+linfocitos T);

CD8+CD107a+ para evaluar los linfocitos T CD8+ de desgranulación (Antígeno/CTL específico de tumor)

10

Panel mieloide

| Fluor | Especificidad | Clon | Anticuerpo | N.º de cat. | Empresa | |
|---|---------------------------------|-------------|--|-------------|-------------|--------|
| Alexa Fluor 488 (FITC) | CD11c | N418 | Anticuerpo anti CD11c de ratón FITC | 117306 | BioLegend | 1:100 |
| PE | CD115 | AFS98 | Anticuerpo anti CD115 de ratón PE (CSF-1R) | 135506 | BioLegend | 1:100 |
| PerCp-Cy5.5 | CD49b | DX5 | Anticuerpo anti CD49b de ratón PerCp/Cv5.5 (linfocitos pan-NK) | 108916 | BioLegend | 1:100 |
| BUV 395 | CD45 | 30-F11 | Anticuerpo anti CD45 de ratón de rata BUV395 | 564279 | eBioscience | 1:100 |
| BV 421 | Lv6C | HK1.4 | Anticuerpo anti Ly6C de ratón Brilliant Violet 421™ | 128032 | BioLegend | 1:200 |
| BV 605 | Thv 1.2 (CD90.2) | 53-2,1 | Anticuerpo anti Thv1.2 de ratón Brilliant Violet 605™ | 140317 | BioLegend | 1:200 |
| BV 711 | Gr-1 | RB6-8C5 | Anticuerpo anti Gr-1 de ratón Brilliant Violet 711™ | 104731 | BioLegend | 1:200 |
| BV 785 | F4-80 | BM8 | Anticuerpo anti F4/80 de ratón Brilliant Violet 785™ | 123141 | BioLegend | 1:200 |
| APC | Lv6G | 1A8 | Anticuerpo anti Lv-6G de ratón APC | 127614 | BioLegend | 1:200 |
| AF-700 | CD11b | MI/70 | Anticuerpo anti CD11b de ratón/humano Alexa Fluor 700 | 101222 | BioLegend | 1:100 |
| PE-Cy7 | MHC II | M5/114.15.2 | Anticuerpo anti I-A/I-E de ratón PE-Cy7 | 107630 | eBioscience | 1:100 |
| APC eFluor 780 (APC-Cv7) | Colorante de viabilidad fijable | n/d | Colorante de viabilidad fijable eFluor® 780 | 65-0865-14 | eBioscience | 1:1000 |
| Bloque Fc | bloque | 93 | TruStain FcX anti CD16/32 de ratón | 101320 | BioLegend | |
| Subconjunto de células mieloides para TAM, MDSC, linfocitos NK, linfocitos B CD80, Tinción de CD86 para APC activadas | | | | | | |

Subconjunto de células mieloides para TAM, MDSC, linfocitos NK, linfocitos B CD80, Tinción de CD86 para APC activadas

Las poblaciones mieloides en el bazo y los tumores se muestran en la figura 3. Las poblaciones de linfocitos T CD8+ en el bazo y los linfocitos infiltrantes de tumor se muestran en la figura 4. Las poblaciones de células CD4+ en el bazo y los linfocitos infiltrantes de tumor se muestran en la figura 5. Los datos demuestran un cambio en las poblaciones de células mieloides y un aumento de los linfocitos T activados en los linfocitos infiltrantes de tumor.

Los diez ratones restantes por grupo se controlaron para determinar el crecimiento tumoral. El tamaño del tumor y el peso corporal se midieron dos veces por semana. El tamaño del tumor (medido en mm³) se calculó multiplicando la longitud del tumor por el cuadrado de la anchura del tumor dividido por 2. Los tratamientos se iniciaron cuando los tumores subcutáneos alcanzaron un tamaño medio de 200 mm³ (modelo establecido).

El anticuerpo anti TIM-4 administrado junto con el anticuerpo anti PD-1 proporcionó una actividad antitumoral mejorada por encima de la actividad de cada agente por separado. La combinación demostró tasas de crecimiento tumoral reducidas (figuras 6-8) y un aumento de la tasa de supervivencia general (figura 9). En resumen, la combinación del mAb anti TIM-4 y el mAb PD-1 dio como resultado una actividad sinérgica en comparación con la actividad obtenida por agentes individuales por separado. Por lo tanto, los resultados de este estudio demuestran que un régimen de combinación de mAb anti mTIM-4 y mAb PD-1 es bien tolerado y da como resultado una actividad antitumoral marcada.

30

Ejemplo 3: Inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* en el modelo MC38 mediante tratamiento combinado con anticuerpo anti TIM-4 y anticuerpo anti PD-1

Se evaluó el crecimiento tumoral en ratones MC38, un modelo de tumor de adenocarcinoma de colon, después del tratamiento con el anticuerpo anti TIM4, RTM-453, solo o junto con un anticuerpo anti PD1, IgG1 D265A.

- 5 El día 0 se implantaron por vía subcutánea 10^6 células MC38 a ratones C57/BL6 hembra (Harlan; de aproximadamente 8-9 semanas de edad). Se dosificó a los ratones a partir del día 6. Se administraron tres dosis de 200 µg/inyección por vía intraperitoneal cada 4 días. Cuando se administraron los dos anticuerpos a un ratón, primero se combinaron los anticuerpos y se administraron juntos al ratón. Los tumores se midieron usando calibradores y los volúmenes tumorales se calcularon usando la fórmula $(L^2 \times A)/2$. Supervivencia libre de progresión definida como el n.º de días que el tumor necesita para alcanzar el cuádruple del volumen tumoral inicial.

- 10 Los resultados se proporcionan en las figuras 10, 11 y 12, y en la Tabla X. La figura 10, que proporciona el porcentaje de supervivencia libre de progresión en relación con los días posteriores al implante, muestra que la administración de la combinación de los anticuerpos anti PD-1 y anti TIM4 da como resultado un mayor porcentaje de supervivencia libre de progresión en relación con cada anticuerpo por separado y en relación con el control de isotipo. La Tabla X muestra que el tratamiento combinado proporcionó regresiones más completas en relación con cada anticuerpo por separado y en relación con el control de isotipo. La figura 11, que muestra el volumen tumoral medio de MC38 en relación con los días posteriores al implante, indica que el tratamiento combinado redujo el volumen tumoral medio más en relación con cada anticuerpo por separado y en relación con el control de isotipo. La figura 12A-C muestra los volúmenes tumorales individuales de MC38 y confirma los resultados que se muestran en las figuras 10, 11 y la Tabla X.

Tabla 5: Número de ratones con regresiones tumorales completas

| Tratamiento | Regresiones completas |
|--|-----------------------|
| Control de isotipo | 0/10 |
| Anti PD1 solo | 2/10 |
| anti TIM4 (RMT4-53 mlgG1 D265A) solo | 0/10 |
| Anti PD1 + anti TIM4 (RMT4-53 mlgG1 D265A) | 4/10 |

- 25 Por lo tanto, la administración de una combinación de un anticuerpo anti TIM4 con un anticuerpo anti PD-1 en los modelos animales CT26 y MC39 dio como resultado un efecto antitumoral más fuerte en relación con cada anticuerpo solo.

Sumario del listado de secuencias

| SEQ ID NO: | SECUENCIA |
|------------|---|
| 1 | Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada (VH) de mAb anti PD-L1 (12A4; 12A4 en el documento WO 2007/005874 y la Patente de EE. UU. N.º 7.943.743) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKTSQDIFSTYAIISWVRQAPGQQGLENMGGIT PIFGKAHYAQKPFQGRVTIITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARKFHFVSS GSPFGMDVWQGQ3TIVTVSS |
| 2 | Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada (VH) de mAb anti PD-L1 (12A4; 12A4 en el documento WO 2007/005874 y la Patente de EE. UU. N.º 7.943.743) cag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gac aag aac col ggg tcc tcc gtc gtc aag gtc tcc tcc aag act tct tcc gga gac acc tcc aac tcc gtt atc aac tgg gtg cgt cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg gga ggg atc atc col atc tcc ggt aaa gca ccc tcc tcc gca cag aag tcc cag ggc aca gtc aac act acc gcc gac gaa tcc aac aac gcc tcc atg gag ctg aac aac tgg aca tcc gag tcc aac aac gcc tcc gag aac aac tcc tcc ggt tcc ggg aac ccc tcc ggt aac gac gtc tcc ggc aca ggg aac aac gtc acc gtc tcc |
| 3 | Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera (VL) de mAb anti PD-L1 (12A4; 12A4 en el documento WO 2007/005874 y la Patente de EE. UU. N.º 7.943.743) EIVLTQSPATISLSPGERATISCRASQSVSSYLAHYQQKPGQQAPRLIIVY DASNRATIGCIPARFSSGGSGTDFLTISSEIPEFEDFAYYYCQQQRSNWPTFG QQGKVEIK |

(continuación)

| SEQ ID NO: | SECUENCIA |
|------------|--|
| 4 | Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena ligera (VL) de mAb anti PD-L1 (12A4; 12A4 en el documento WO 2007/005874 y la Patente de EE. UU. N.º 7.943.743) gaa aii gtg tlg aca cag tct cca ggc acc ctc tgg tct cca 999 gaa aca ggc acc ctc tcc tgc agg gca aca cag aca gtc aca aca tta gcc tgg tcc caa cag aca ccc ggc cag gct ccc agg ctc aca tat gat gca tcc aac agg gca act ggc atc cca gcc agg ttc aca agt ggg tcc ggg aca gac tcc act ctc acc atc aca aca cta gac ctc gaa gat ttt gca gtt tcc tcc tgg cag cgt aca aca tgg ccc acc ttc ggc cca ggg aca aac gtc gaa aca aca |
| 5 | Secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada mAb anti PD-L1 (12A4; 12A4 en el documento WO 2007/005874 y la Patente de EE. UU. N.º 7.943.743) TYAIS |
| 6 | Secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada mAb anti PD-L1 (12A4; 12A4 en el documento WO 2007/005874 y la Patente de EE. UU. N.º 7.943.743) GIIPIFGKAHYAQKFQ |
| 7 | Secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada mAb anti PD-L1 (12A4; 12A4 en el documento WO 2007/005874 y la Patente de EE. UU. N.º 7.943.743) KFHFVSGSPFGMDV |
| 8 | Secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera mAb anti PD-L1 (12A4; 12A4 en el documento WO 2007/005874 y la Patente de EE. UU. N.º 7.943.743) RASQSVSSYLA |
| 9 | Secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera mAb anti PD-L1 (12A4; 12A4 en el documento WO 2007/005874 y la Patente de EE. UU. N.º 7.943.743) DASNRAT |
| 10 | Secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera mAb anti PD-L1 (12A4; 12A4 en el documento WO 2007/005874 y la Patente de EE. UU. N.º 7.943.743) QQRSNWPT |
| 11 | Secuencia de aminoácidos de cadena pesada mAb anti PD-1 (5C4 en el documento WO 2006/121168) (región variable subrayada; región constante en negrita) <u>QVQLVESGGGVVQPCRSLRLDKASCTITFSNSCMHWVRQAPGKGGL</u> <u>EWVAVIWYDGSKRYTADSVKGRTTISRDNSKNLFLQMNSLRAEDT</u> <u>AVYYCACNDDYWQGQILVYSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA</u> <u>LGCLVKDYPFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT</u> <u>VPSSSLGTKTYYTCNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCCPAPEFLG</u> <u>GPSVFLFPKKPKDTILMISRTPEVTVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV</u> <u>EVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG</u> <u>LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS</u> <u>DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRNQEGNV</u> <u>FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK</u> |
| 12 | Secuencia de aminoácidos de cadena ligera mAb anti PD-1 (5C4 en el documento WO 2006/121168) (región variable subrayada; región constante en negrita) <u>EIVLTIQSPATLISLYSPGERATLSCRASQEVSSYIAYWYQQKPGQAPRIL</u> <u>YDASMPATCIPARFSCSCGCTDFIITLSELEPEPFAVYYCQDQSSNWPR</u> <u>IFCQCTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA</u> <u>KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLKADYERKHK</u> <u>YVACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> |
| 13 | Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada (VH) mAb anti PD-1 (5C4 en el documento WO 2006/121168) (SEQ ID NO:4 del documento WO 2006/121168) QVQLVESGGGVVQPCRSLRLDKASCTITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWAV IWYDGSKRYTADSVKGRTTISRDNSKNLFLQMNSLRAEDTAVYYCACTND DYWGQGILVYSS |
| 14 | Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada (VH) mAb anti PD-1 (5C4 en el documento WO 2006/121168) (SEQ ID NO:60 del documento WO 2006/121168) |

(continuación)

| SEQ ID NO: | SECUENCIA |
|------------|--|
| | cag glg cag clg glg gag tct ggg gga ggc glg glc cag cct ggg agg tcc ctg aga ctc gac tgt aaa ggc tct gga atc acc ttc agt aac tct ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtc gca gtt att tgg tat gat gga agt aaa aga tac tat gca gac tcc gtc aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg ttt ctg caa atg aac agc clg aga gcc gag gac acg gct glg tct tac tgl gcg aca aac gac gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca |
| 15 | Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera (VL) mAb anti PD-1 (5C4 en el documento WO 2006/121168) (SEQ ID NO:11 del documento WO 2006/121168) EIVLTQSPATLGSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAQYQQKPCQQAFLRLTYD ASRATGQIPARFSGSGSGTIDFTLTISSLEPEDFAVY?CQQSSNWPRIFGQ CIKVEIK |
| 16 | Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena ligera (VL) mAb anti PD-1 (5C4 en el documento WO 2006/121168) (SEQ ID NO:67 del documento WO 2006/121168) gaa all glg llg aca cag tct cca gcc acc ctc tcc tgg ggc aca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgg ggc agt cag agt gtt agt agt tac tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc age cta gag cct gaa gal ttt gca gtt tat tac tgt cag cag agt agc aac tgg cct egg acg ttc ggc caa ggg acc aag glg gaa atc aaa |
| 17 | Secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada mAb anti PD-1 (5C4 en el documento WO 2006/121168) (SEQ ID NO:18 del documento WO 2006/121168) NSGMH |
| 18 | Secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada mAb anti PD-1 (5C4 en el documento WO 2006/121168) (SEQ ID NO:25 del documento WO 2006/121168) VIWYDGSKRYYADSVKG |
| 19 | Secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada mAb anti PD-1 (5C4 en el documento WO 2006/121168) (SEQ ID NO:32 del documento WO 2006/121168) NDDY |
| 20 | Secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera mAb anti PD-1 (5C4 en el documento WO 2006/121168) (SEQ ID NO:39 del documento WO 2006/121168) RASQSVSSYLA |
| 21 | Secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera mAb anti PD-1 (5C4 en el documento WO 2006/121168) (SEQ ID NO:46 del documento WO 2006/121168) DASNRAT |
| 22 | Secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera mAb anti PD-1 (5C4 en el documento WO 2006/121168) (SEQ ID NO:53 del documento WO 2006/121168) QQSSNWPR |
| 23 | Secuencia completa de PD-1 (n.º de acceso de GenBank: U64863) |

(continuación)

| SEQ ID NO: | SECUENCIA |
|------------|---|
| | agLLLcccl ccgcLcaccl ccgcclgagc aglggagaag gggcacLcl gglggggclg ctcaggcat gcagatccca caggcgcctt ggccagtcgt ctggggcggtg ctacaactgg gclggcgcc aggaLggLc ttagacLccc cagacaggcc clggaaacccc cccacclcl tcccageccct qctcggtgg accgaagggg acaaLgcac acacatcgga gagttcgtg ctaaactggt accgeatgag ccccagcaac cagacggaca agctggccgc ctccccagag gaccgcagcc accccggcca ggactgcgc ttcctgtgtca cacaacLgcc caacggcgL gacLccaca Lgageglgl cagggccccg cgcaalgcaca gcccaccta cctctgtggg gccatctccs tggccccca ggcgcagata aaagagagcc tgccggcaga gtcagggtg acagagagaa gggcagaagt gcccacagcc caccggcc ccLcaccag gccagccgc cagLcccaaa ccLggLggL LggLgLgLg ggcggccLgc tggcagccct ggtctgtca gtctgggtcc tggccgtcat ctgtccccgg gcccacagag ggacaatagg agccaggcage accggcage ccttgaagga ggaccctca ggcgtgcctg tgttctgt gactatggg gagttcgatt tccatgtgg agagaagacc cccggcc ccgtgcctt tgcctcttag cagacggat atgcacatct tgccttctt aegggatgg gcacctcata ccccgccccc aggggtcaag cccacggccc tcggagtggc cagccactga gcccLgagga LggacacLgc LcLggcccc Lcgacccgc LccLggcc accagLgllc tgcaLgaccct ccaccatgg cccgggclag cgcatttctt caggagaagc aggcaagggtg caggccatLg caggccgllc aggggcLgag cLggcLgggg ggcacccggg cLccagccLg caccLgcacc aggcacccgc ccaccacagg acLcLgcLc caalgcaccc acLgagccca ggcagcaggL gtcacccgtcc cttacaggga gggccagatg cagtcactgc ttcaLgttct gcccaccaL agcLgcLgc LggcagLcc elgaalLclc gLgctgcLg cLgctgcLgc tgctgtgc tgcggccccg ggctgaaggs ggcgtggccc tgcctgacgc cccggagcc cctgcctgaa ctLggggctt ggttggagat ggcttggag cagccaaagt gcccctggca gtggcatccc gaaacggccct ggacgcaggg cccaaagactg ggcacaggag tggaggtac atggggctgg ggactccca ggagttaLctt gtcctctca ggccttagaga agttttaggg aaggLcagaa gagttctgg ctgtgggtgg caggcagga aaccctcc acctttacac atggccaggc agcaccLcag gcccLgtLg gggcaggggaa gLgaggcag Laggggca ggcagagctg gggcccttcc aggcacccca gcaLctgcLc ctctggcc cgcattccac cccagccct cacaccaLc gggagggga catctcaagg tcccaaggLc aggaggcag ggcLggggL gacLcaggcc ccccccagLc LggccacL gggLggLgg agggcagaag tgcaLggcacc tagggccccc catgtgcaca ccctgggagc ttccttggc accatttct gaaattattt aaagggggtt gcccggctcc caccaggccc tgggtggggaa ggtacaggcg ttccccggg gcttagtacc cccggctggc ctatccactc ctacacatccca cacactgcac cccactcct gggcaggggc caccaggcLc caggccggccca gcaggcacct gagtggctgg gacaaggat ccccttccct tgggttcttata ttatattata attataattt aatatgagag catLgcL |
| 24 | Secuencia de aminoácidos de PD-L1 humano, precursor de la isoforma a (n.º de acceso de GenBank NP_054862.1) MR_FAVF_FIM TYWHL_NAFT VVVPKD_YVV EYGSNMTIEC KFPVVKQ_DL AA_LVYWE DKNCIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARILKD QISLGNAAIQL ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR LIVVDPVSEHE LTCQAEQY PKAEVIWTS DHQVLSQLTT TTNSKREEKL FNVTSITLRIN CTTNEIFYCT FRRIDPEENH TAEVVIPELP LAHPPNERTH LVII_GAIILIC LGVALIFIFR LRKGMMMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET |
| 25 | Secuencia de aminoácidos de PD-L1 humano, precursor de la isoforma b (n.º de acceso de GenBank NP_001254635.1) MR_FAVF_FIM TYWHLNAPY NKKINQRLVV DPVTEHELT CQAECPKAQ VIWTSSDHQV LSGKTTTNS KREEKLFNVT STLRINTTN EIFYCTFRRRL DPEENHTAEL VIPELPLAHP PNERTHLVII_GAIILICLGA LTFIFRLRKG FMMMDVKKCGI QDTNSKKQSD THLEET |
| 26 | Secuencia de aminoácidos de TIM-4 humano, isoforma 1 (n.º de acceso de GenBank NP_612388.2) MSKEPILWLMIEFWWLYLTPVSETVVTTEVLGHRTLPCLYSSWSHNSNSMCWCKDQCPYSGCCKEAIIR TDGMRVTSRKSAYRLQGIPRGDVSLTILNPSESDSGVYCCRIEVPGWFNDVKINVRNLQRASTTTHR TATTTTTRRTTTSPTTTTRQMTTTPAAAPTEVVVTPDLITCTPLQMTTIAVFTTANTCISLTPSTLPEEAT CLLPEPSKEGPILTAESETVLPDSWSSVESTSADTVLLTSKESKVWDLPSTSHVSMWKTSDSVSSPQP GASDTAVPEQNKTTKTGQMDGIPMSMKNEMP1SQIIMI1APSLGFVLFALFVAFLLRGKLMLETYCSQKHT RLDYIGDSKNVNDVQHGREDEDGLFTL |
| 27 | Linfocito T de <i>Homo sapiens</i> (TIMD4), variante de transcripto 1, ARNm (n.º de acceso de GenBank NM_138379.2) |

(continuación)

REIVINDICACIONES

1. Una combinación de un anticuerpo anti antagonista de PD-1 y un anticuerpo anti antagonista de TIM-4 para su uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto, en donde el método da como resultado que ambos anticuerpos antagonistas estén presentes simultáneamente en el sujeto.
2. La combinación para su uso de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo anti antagonista de TIM-4 se une al dominio IgV de TIM-4, por ejemplo, la hendidura FG-CC" del dominio IgV.
3. La combinación para su uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo anti antagonista de PD-1 es
 - (i) un anticuerpo anti PD-1 que comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena pesada que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 13, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena ligera que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 15, por ejemplo, en donde el anticuerpo anti PD-1 comprende:
 - (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 17;
 - (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 18;
 - (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 19;
 - (d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 20;
 - (e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 21; y
 - (f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 22; o
 - (ii) un anticuerpo anti PD-L1 que comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena pesada que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena ligera que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3, por ejemplo:
 - (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 5
 - (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 6;
 - (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 7;
 - (d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 8;
 - (e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9; y
 - (f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 10.
4. La combinación para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el anticuerpo anti antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti PD-1 que comprende
 - (i) regiones variables de cadena pesada y ligera que tienen las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 13 y 15, respectivamente; o
 - (ii) cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 11 y 12, respectivamente.
5. La combinación para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el anticuerpo anti antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti PD-L1 que comprende regiones variables de cadena pesada y ligera que tienen las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 1 y 3, respectivamente.
6. La combinación para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la administración de la combinación produce al menos un efecto terapéutico elegido entre
 - (i) una reducción del tamaño de un tumor, por ejemplo, al menos en un 50 % o al menos en un 80 %;
 - (ii) inhibición del crecimiento del tumor, por ejemplo, al menos en un 80 %;
 - (iii) reducción del número de lesiones metastásicas en el tiempo;
 - (iv) respuesta completa;
 - (v) respuesta parcial; y
 - (vi) enfermedad estable.
7. La combinación para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde los anticuerpos antagonistas anti PD-1 y anti TIM-4 están formulados para administración intravenosa.
8. La combinación para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde
 - (i) el anticuerpo anti antagonista de PD-1 y el anticuerpo anti antagonista de TIM-4 se formulan por separado para administración simultánea o secuencial; o
 - (ii) el anticuerpo anti antagonista de TIM-4 y el anticuerpo anti antagonista de PD-1 se formulan en una única formulación para administración simultánea.

9. La combinación para su uso de la reivindicación 8, en donde el anticuerpo anti antagonista de PD-1 y el anticuerpo anti antagonista de TIM-4 se formulan por separado para administración secuencial, en donde,

5 (i) el anticuerpo anti antagonista de PD-1 se infunde en el paciente primero, seguido de 10 minutos a 3 horas después de una infusión del anticuerpo anti antagonista de TIM-4; o

5 (ii) el anticuerpo anti antagonista de TIM-4 se infunde en el paciente primero, seguido de 10 minutos a 3 horas después de una infusión del anticuerpo anti antagonista de PD-1.

10 10. La combinación para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia, linfoma, blastoma, carcinoma, sarcoma, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer gastrointestinal, cáncer colorrectal, glioblastoma y carcinoma de colon.

15 11. La combinación para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el método comprende la administración de un agente terapéutico adicional, opcionalmente, en donde el agente terapéutico adicional es una citotoxina o un agente quimioterápico.

20 12. La combinación para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el sujeto es un ser humano.

25 13. Una composición que comprende un anticuerpo anti antagonista de PD-1 y un anticuerpo anti antagonista de TIM-4.

25 14. La composición de la reivindicación 13, en donde el anticuerpo anti antagonista de TIM-4 se une al dominio IgV de TIM-4, por ejemplo, la hendidura FG-CC" del dominio IgV.

30 15. La composición de la reivindicación 13 o de la reivindicación 14, en donde el anticuerpo anti antagonista de PD-1 es

30 (i) un anticuerpo anti PD-1 que comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena pesada que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 13, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena ligera que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 15, por ejemplo:

35 (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 17;

35 (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 18;

35 (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 19;

35 (d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 20;

35 (e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 21; y

35 (f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 22; o

40 (ii) un anticuerpo anti PD-L1 que comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena pesada que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena ligera que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3, por ejemplo:

45 (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 5

45 (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 6;

45 (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 7;

45 (d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 8;

45 (e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9; y

45 (f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 10.

50 16. Un kit que comprende la combinación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, comprendiendo el kit:

55 (a) una dosis de un anticuerpo anti antagonista de PD-1; y

55 (b) una dosis de un anticuerpo anti antagonista de TIM-4.

ES 2 992 868 T3

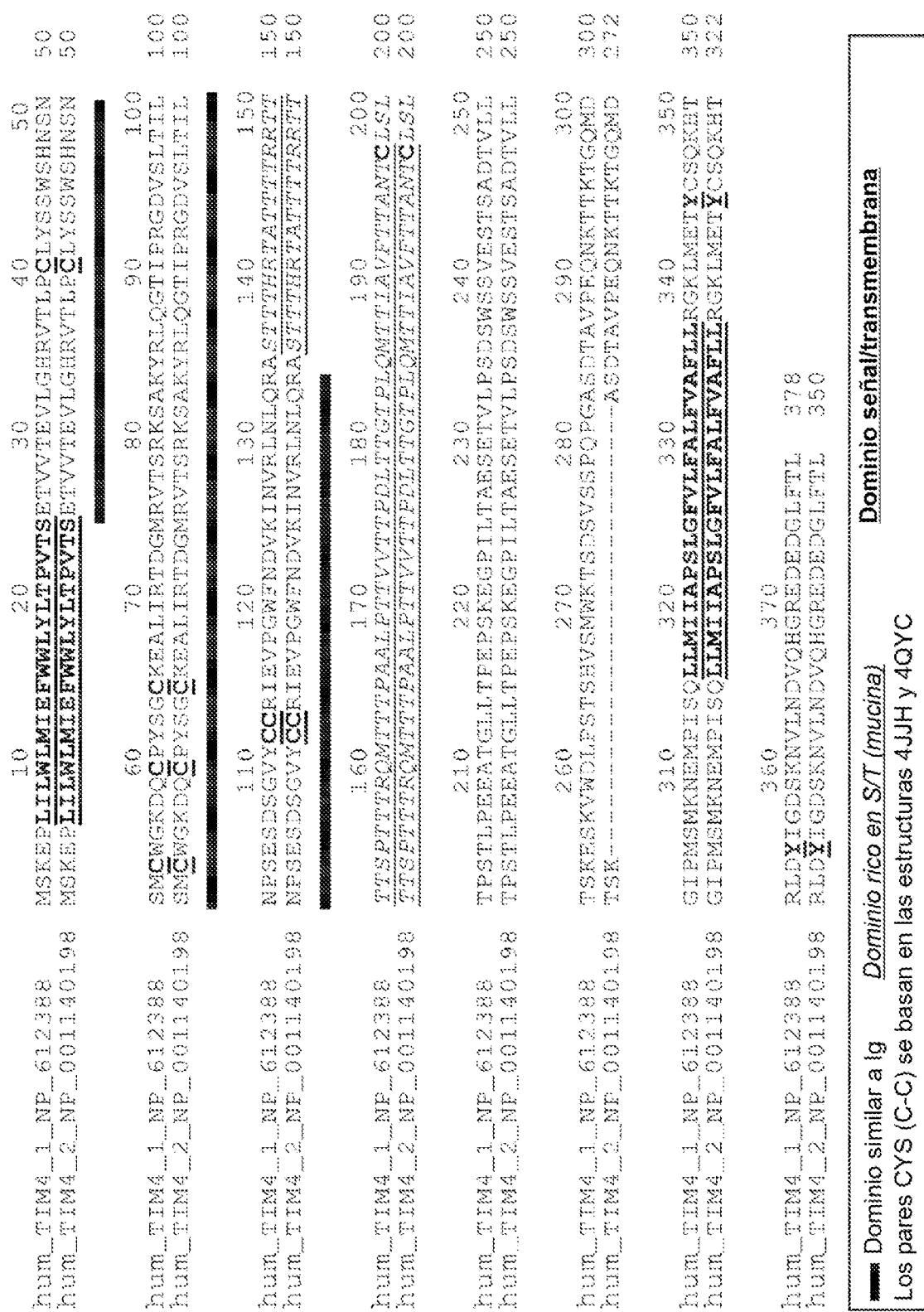


FIGURA 1

ES 2 992 868 T3

| | | | | | | | |
|-------------------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| TIME_cyno1_EHE54702 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 |
| TIME_cyno2_XP_005558436 | MSKEPLILIVYMEFWWLYLITPOTSETVOTVTEVIGRVTLLPCLYSSNSQNSNSMCQGKCPYSSCKEALIRDTGR | 75 | | | | | |
| hum_TIM4_1NP_612388 | MSKEPLILIVYMEFWWLYLITPOTSETVOTVTEVIGRVTLLPCLYSSNSQNSNSMCQGKCPYSSCKEALIRDTGR | 75 | | | | | |
| TIME_mus_NP_848874 | MSKGLLILWLVTEILWLYLITPAASEDTIIGLQQPVLLPCHYLWSNSQNSNSMCQGKSSCPNSKCNMELLKTDGTR | 75 | | | | | |
| TIME_cyno1_EHE54702 | 90 | 100 | 120 | 140 | 150 | | |
| TIME_cyno2_XP_005558436 | VTSEKSAKXYRQGTLIPRGDVSLTINPSESDGSEVYCCRIEVPGENDVSKINVRNLQRASTPHTPATTERRT | 150 | | | | | |
| hum_TIM4_1NP_612388 | VTSEKSAKXYRQGTLIPRGDVSLTINPSESDGSEVYCCRIEVPGENDVSKINVRNLQRASTPHTPATTERRT | 150 | | | | | |
| TIME_mus_NP_848874 | LISRKSTAYLLAGXQFGEVSVLTSITNNGDSEVYCCRIEVPGENDVSKINVRNLQRASTPHTPATTERRT | 142 | | | | | |
| TIME_cyno1_EHE54702 | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 | 220 |
| TIME_cyno2_XP_005558436 | TTSEPTTPHVTTR-AALPTVYKTPDLTTEPLQTTAVETTAN-TCSPTTPSPEATSLLIPPEPSKEP | 223 | | | | | |
| hum_TIM4_1NP_612388 | TTSEPTTPHVTTR-AALPTVYKTPDLTTEPLQTTAVETTAN-TCSPTTPSPEATSLLIPPEPSKEP | 215 | | | | | |
| TIME_mus_NP_848874 | TTSEPTTPHVTTR-AALPTVYKTPDLTTEPLQTTAVETTAN-TCSPTTPSPEATSLLIPPEPSKEP | 223 | | | | | |
| TIME_cyno1_EHE54702 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 |
| TIME_cyno2_XP_005558436 | TTAESEPPVLPSS-DSSSESTESP-AOTVLLTSESKVWLPSS-DSSSESTESP-AOTVLLTSESKVWLPSS-DSSSESTESP | 296 | | | | | |
| hum_TIM4_1NP_612388 | TTAESEPPVLPSS-DSSSESTESP-AOTVLLTSESKVWLPSS-DSSSESTESP-AOTVLLTSESKVWLPSS-DSSSESTESP | 288 | | | | | |
| TIME_mus_NP_848874 | TTAESEPPVLPSS-DSSSESTESP-AOTVLLTSESKVWLPSS-DSSSESTESP-AOTVLLTSESKVWLPSS-DSSSESTESP | 297 | | | | | |
| TIME_cyno1_EHE54702 | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | 370 |
| TIME_cyno2_XP_005558436 | QMDGMPKMMPEKQMLLAPSLGFLVLL-LIMAFLLKGKLMETCQKHTLDCIGKSKVNLNDASHGRED | 370 | | | | | |
| hum_TIM4_1NP_612388 | QMDGMPKMMPEKQMLLAPSLGFLVLL-LIMAFLLKGKLMETCQKHTLDCIGKSKVNLNDASHGRED | 362 | | | | | |
| TIME_mus_NP_848874 | QIN-----DQPTILLIACCVGTVKVLLEPLFLRKGKTVGACLQRKEDNTENPSVNLNDASHGRED | 371 | | | | | |
| TIME_cyno1_EHE54702 | 380 | | | | | | |
| TIME_cyno2_XP_005558436 | EDGLFL | 377 | | | | | |
| hum_TIM4_1NP_612388 | EDGLFL | 369 | | | | | |
| TIME_mus_NP_848874 | EDGLFL | 378 | | | | | |
| TIME_cyno1_EHE54702 | EDGLFL | 343 | | | | | |

FIGURA 2

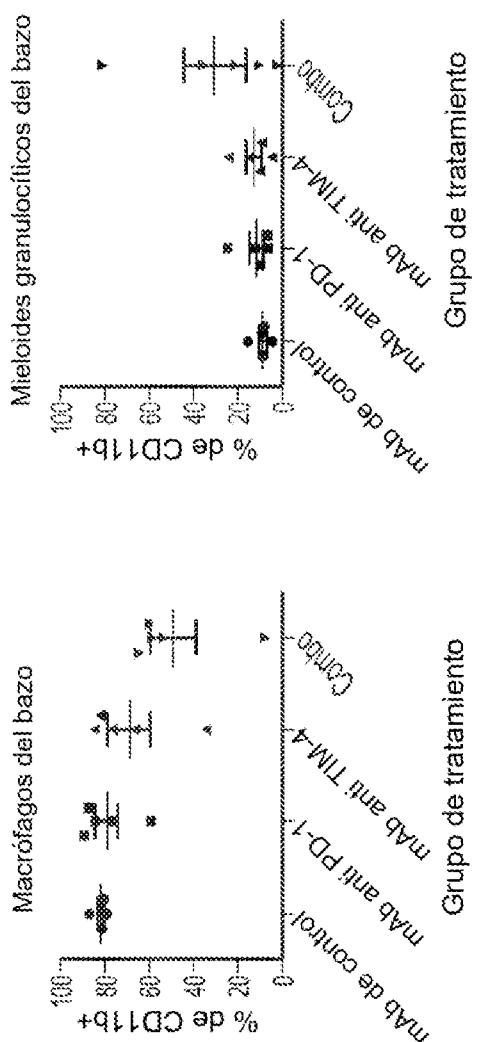


FIGURA 3A

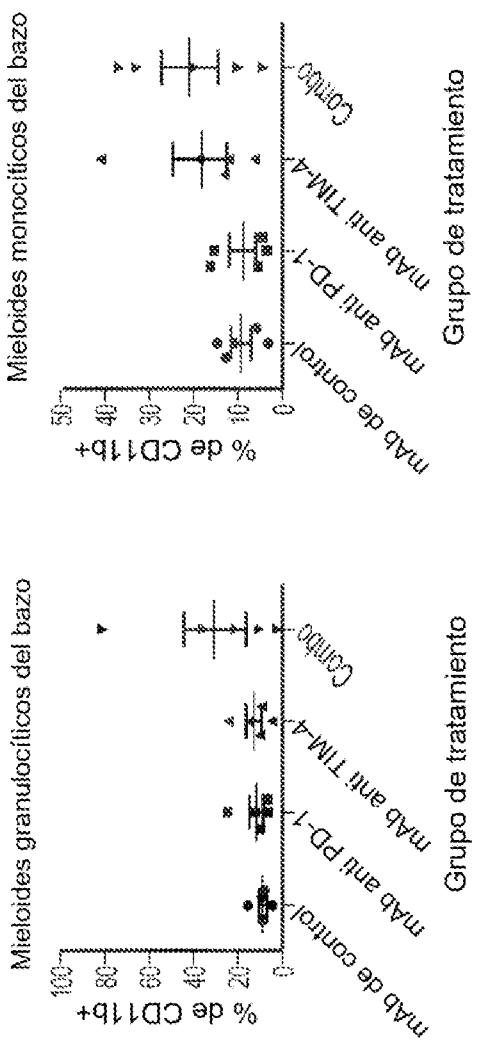


FIGURA 3B

Grupo de tratamiento

FIGURA 3C

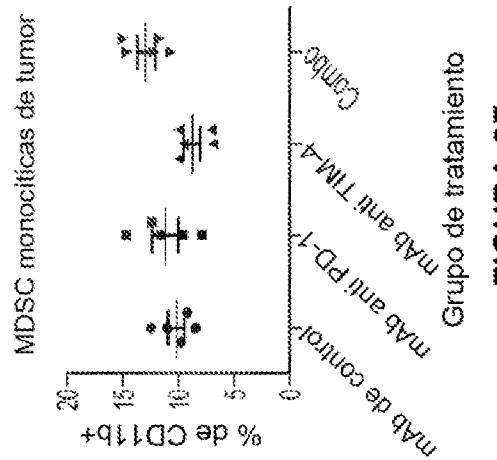
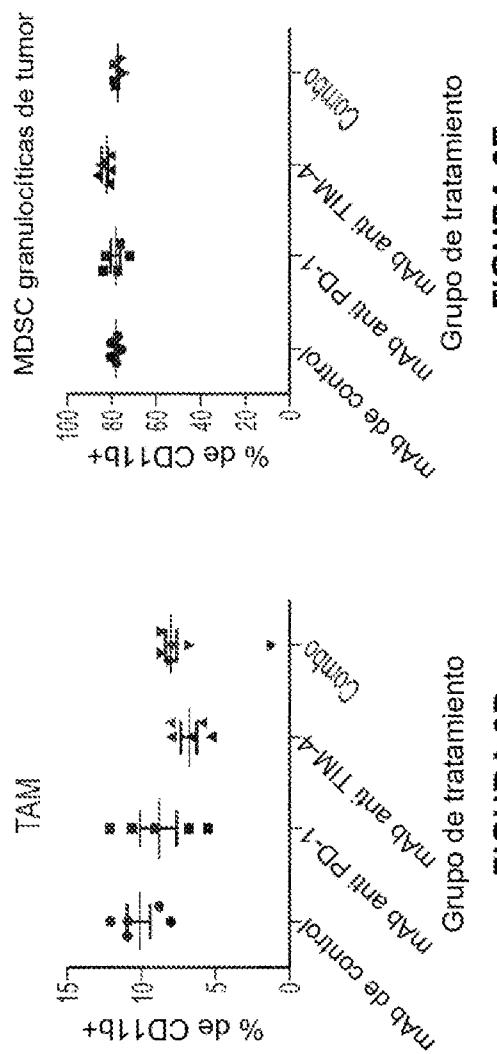


FIGURA 3F

FIGURA 3E

FIGURA 3D

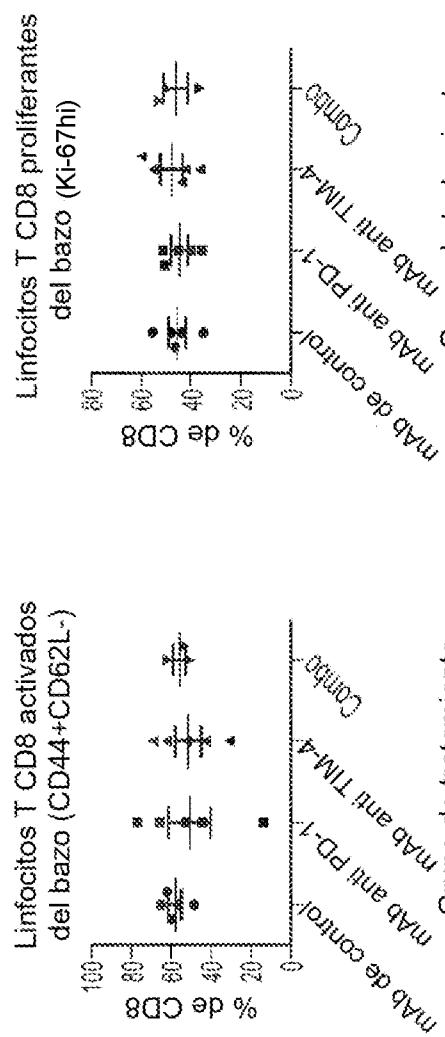


FIGURA 4A

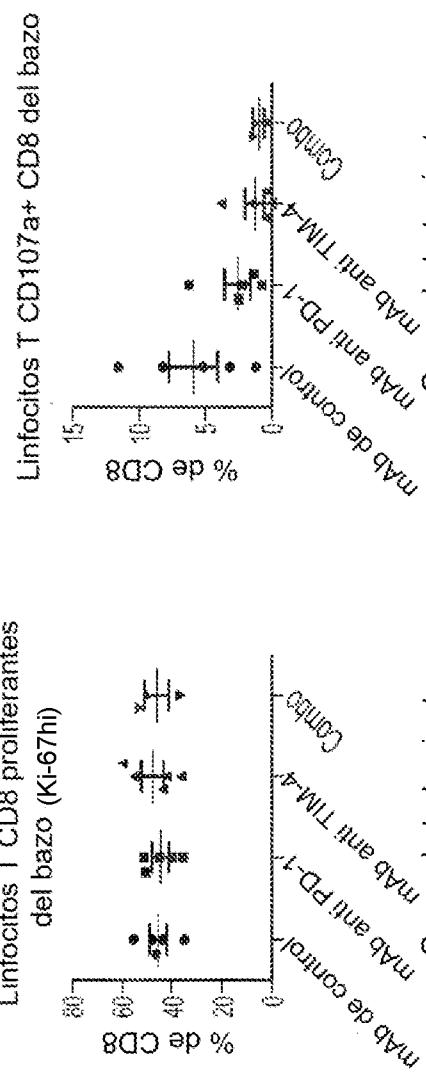


FIGURA 4B

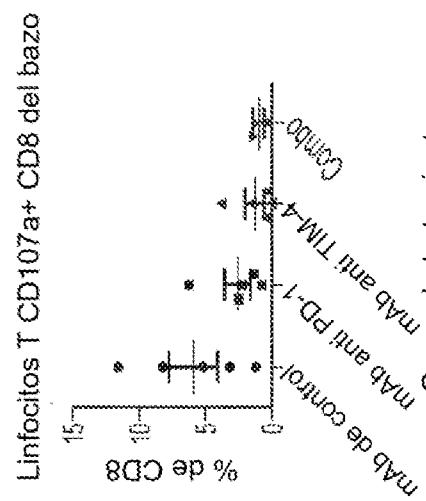


FIGURA 4C

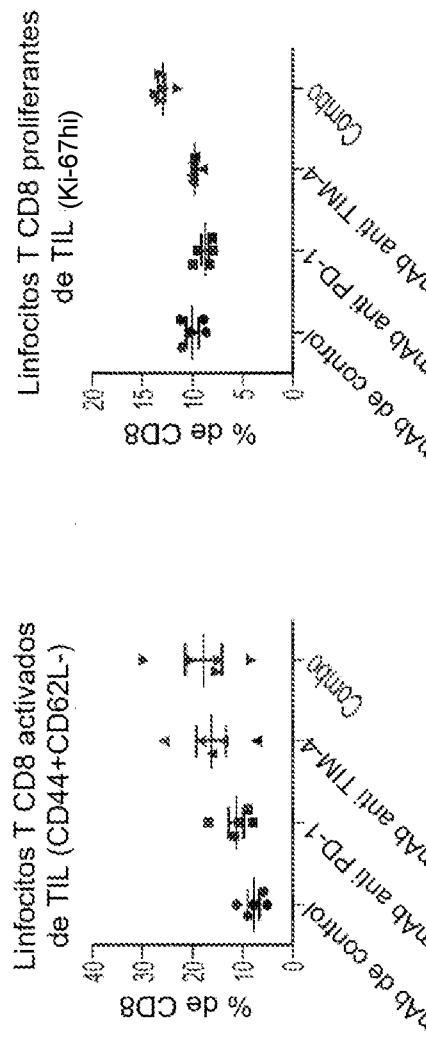


FIGURA 4D

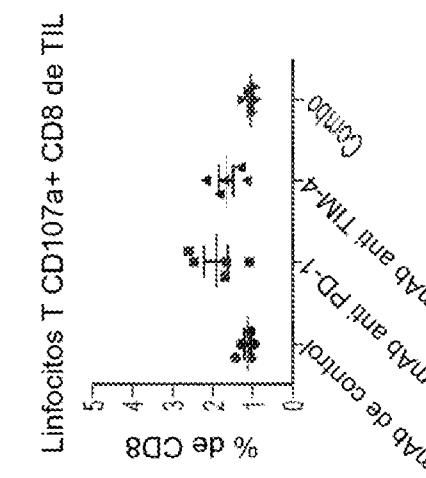


FIGURA 4E

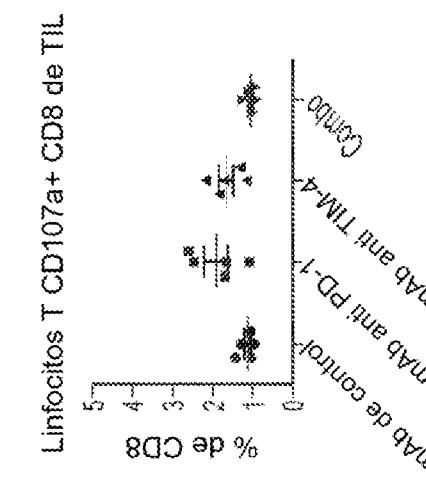
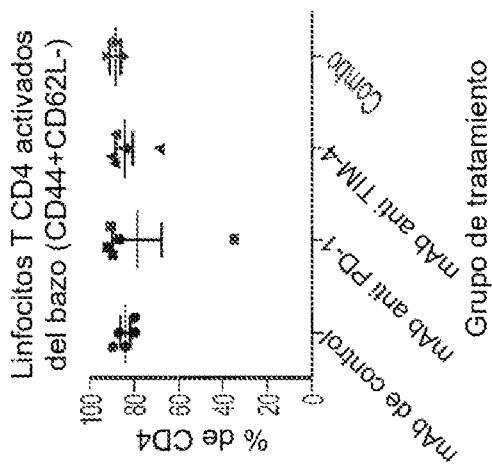
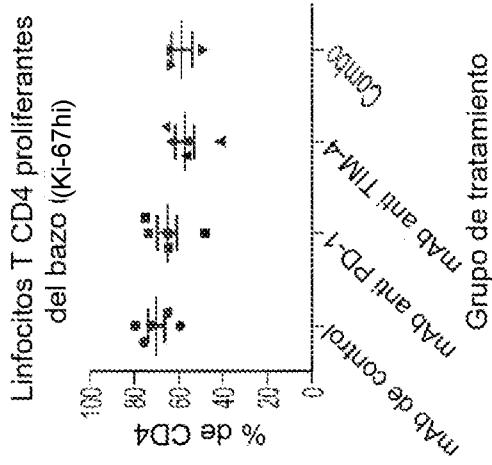
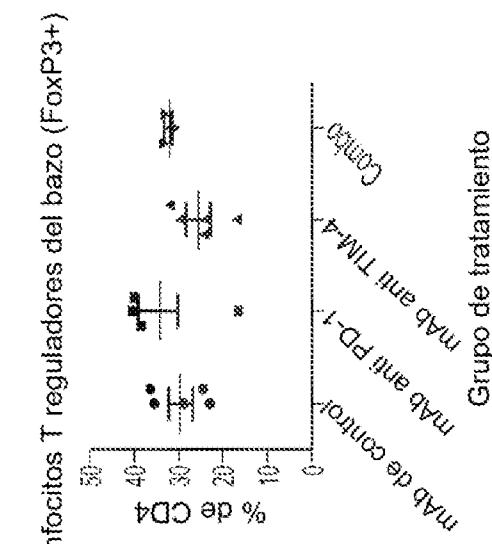
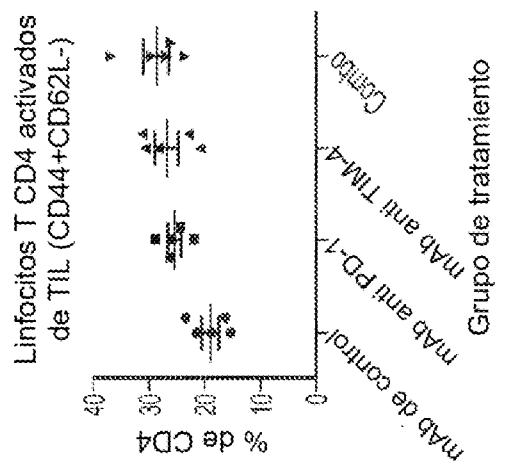
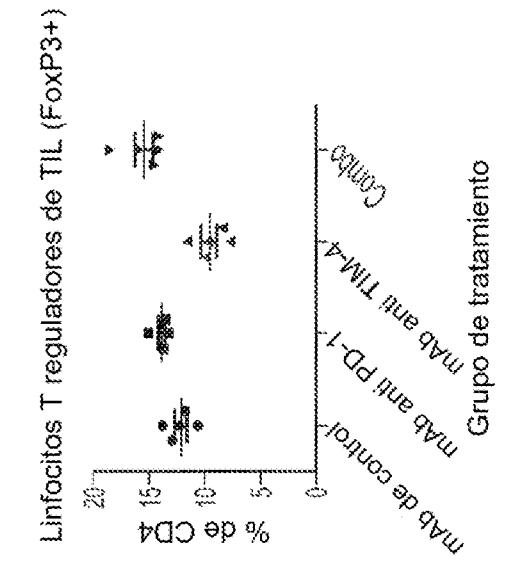


FIGURA 4F

**FIGURA 5A****FIGURA 5B****FIGURA 5C****FIGURA 5D****FIGURA 5E**

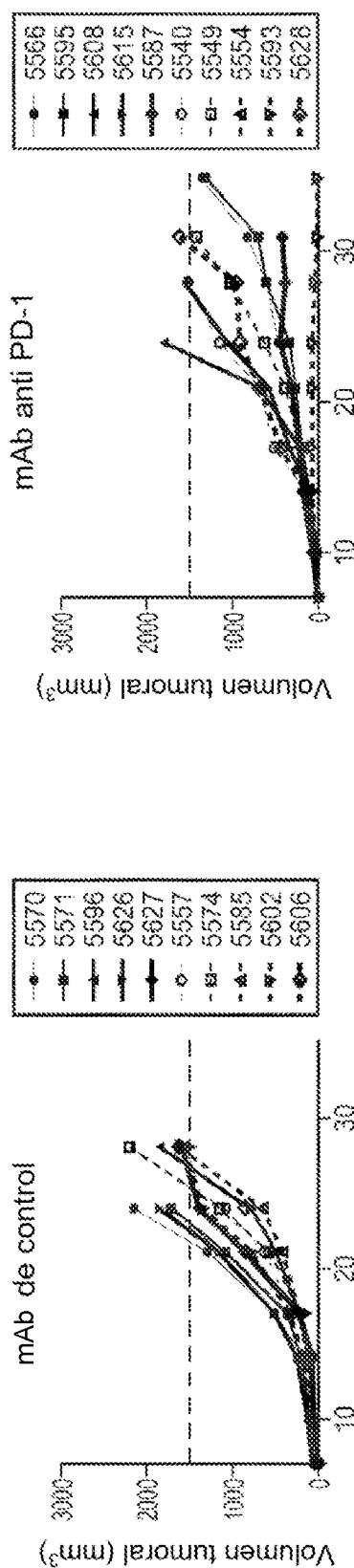


FIGURA 6A

Día posterior a la inyección de 1×10^6 células CT-26

FIGURA 6B

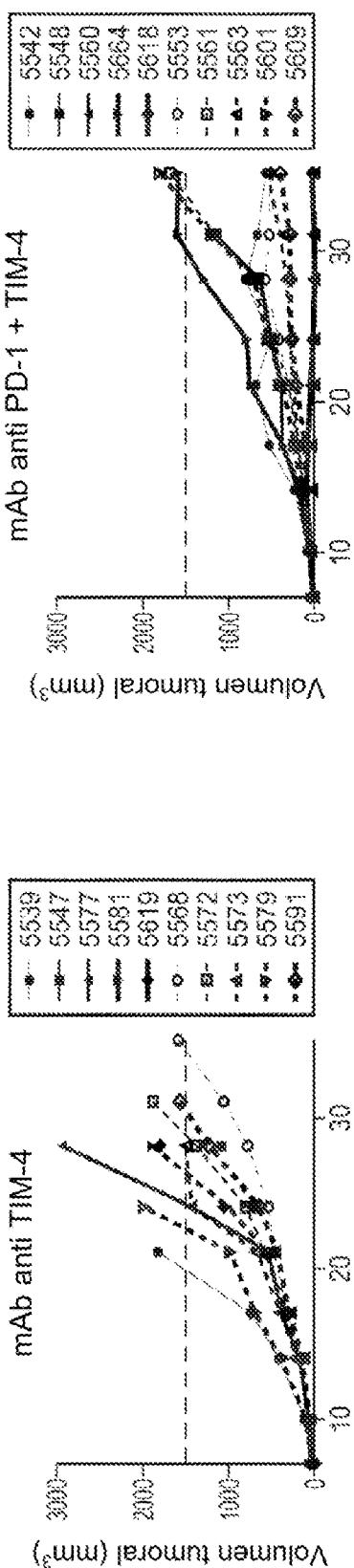
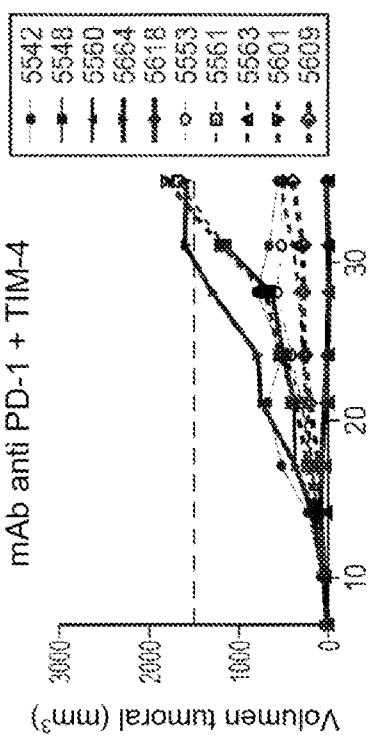


FIGURA 6C

Día posterior a la inyección de 1×10^6 células CT-26

FIGURA 6D



Día posterior a la inyección de 1×10^6 células CT-26

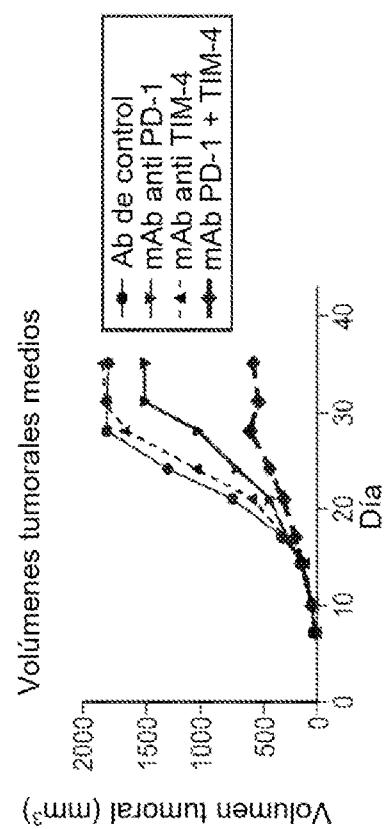


FIGURA 7B

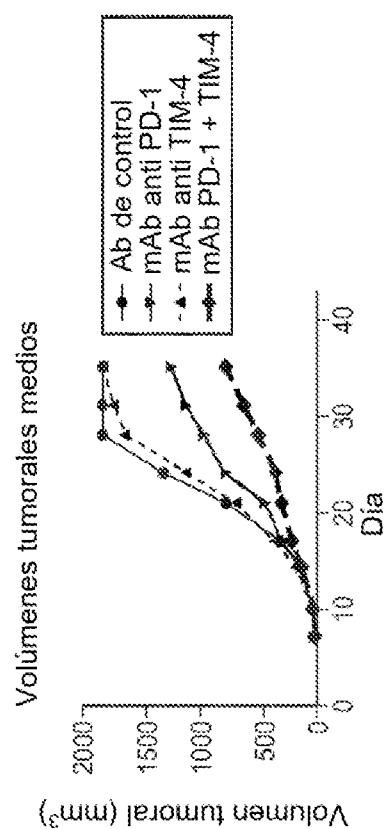
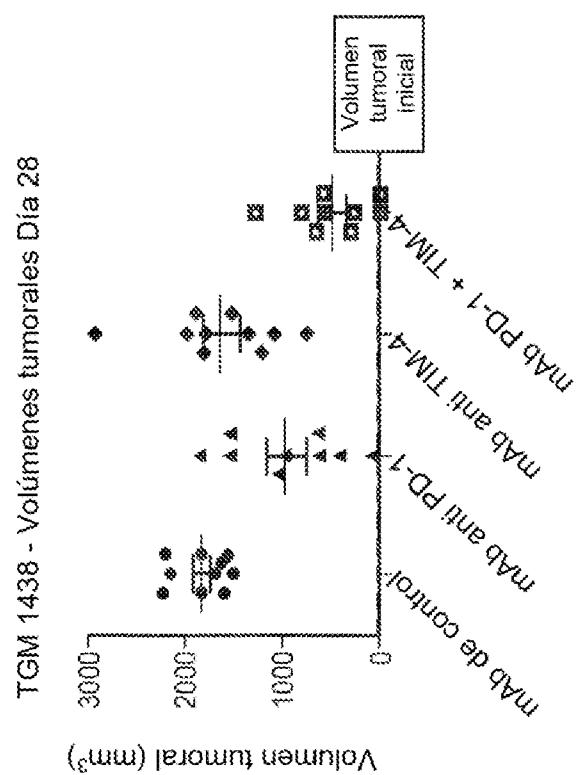


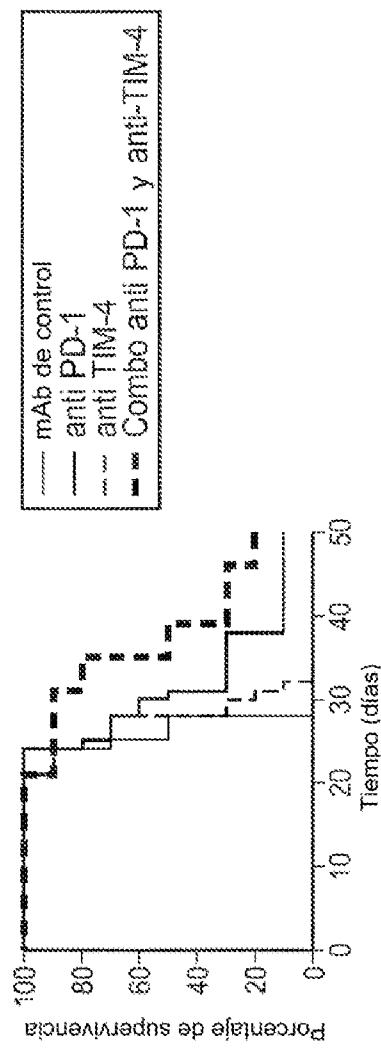
FIGURA 7A



Grupo de tratamiento (3 dosis; Día 7, 10, 13)

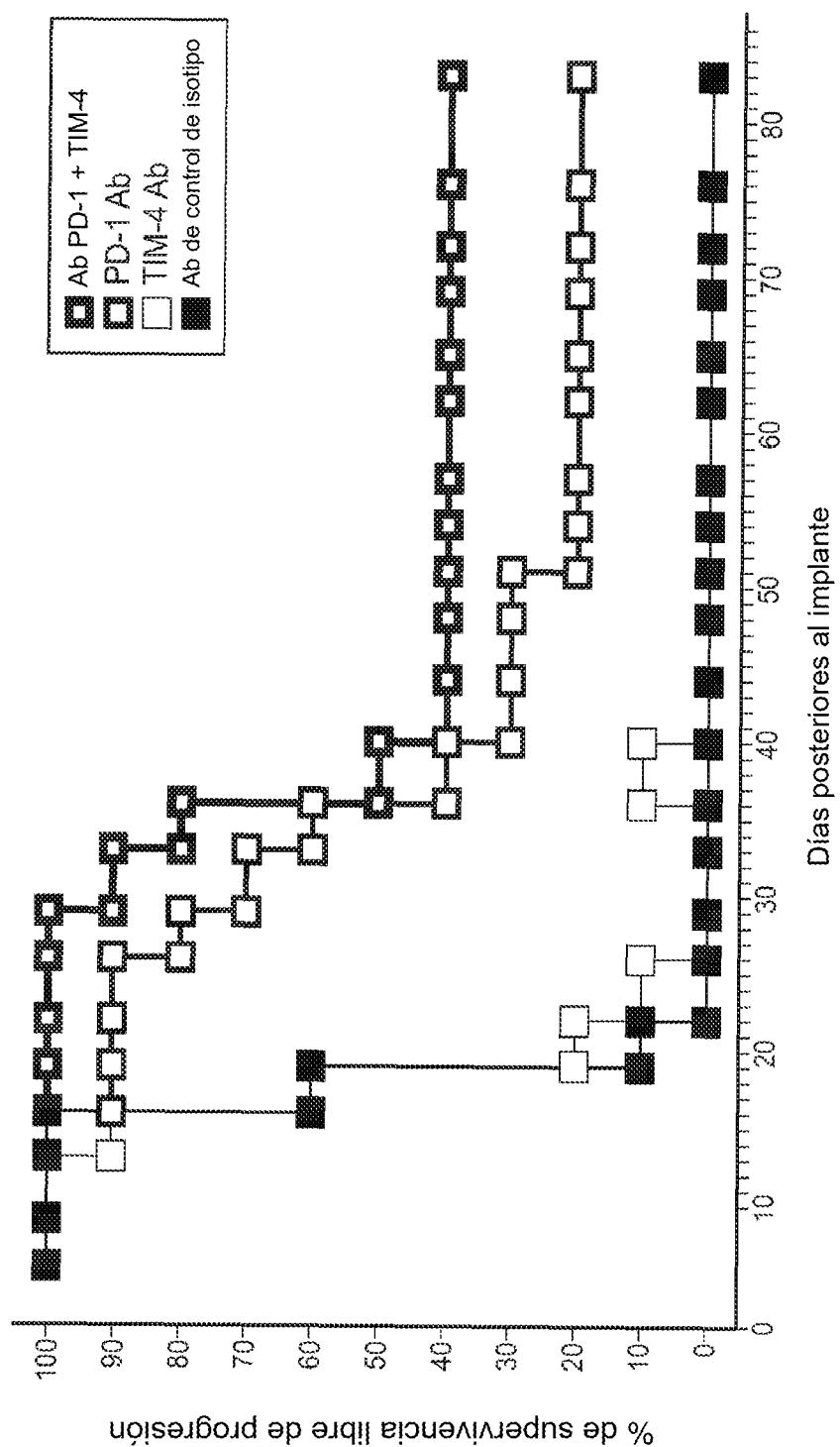
FIGURA 8

TGM 1438: Proporciones de supervivencia (n = 10 por grupo)
(Ratones sacrificados cuando la carga tumoral es >1500 mm³)



| Supervivencia media | mAb de control | anti PD-1 | anti TIM-4 | Combo anti PD-1 y anti TIM-4 |
|---------------------|----------------|-----------|------------|------------------------------|
| 26.5 | 30.5 | 28 | 28 | 37 |

FIGURA 9B



MC38-223 (Eficacia de TIM4 + PD-1) - Volumen tumoral

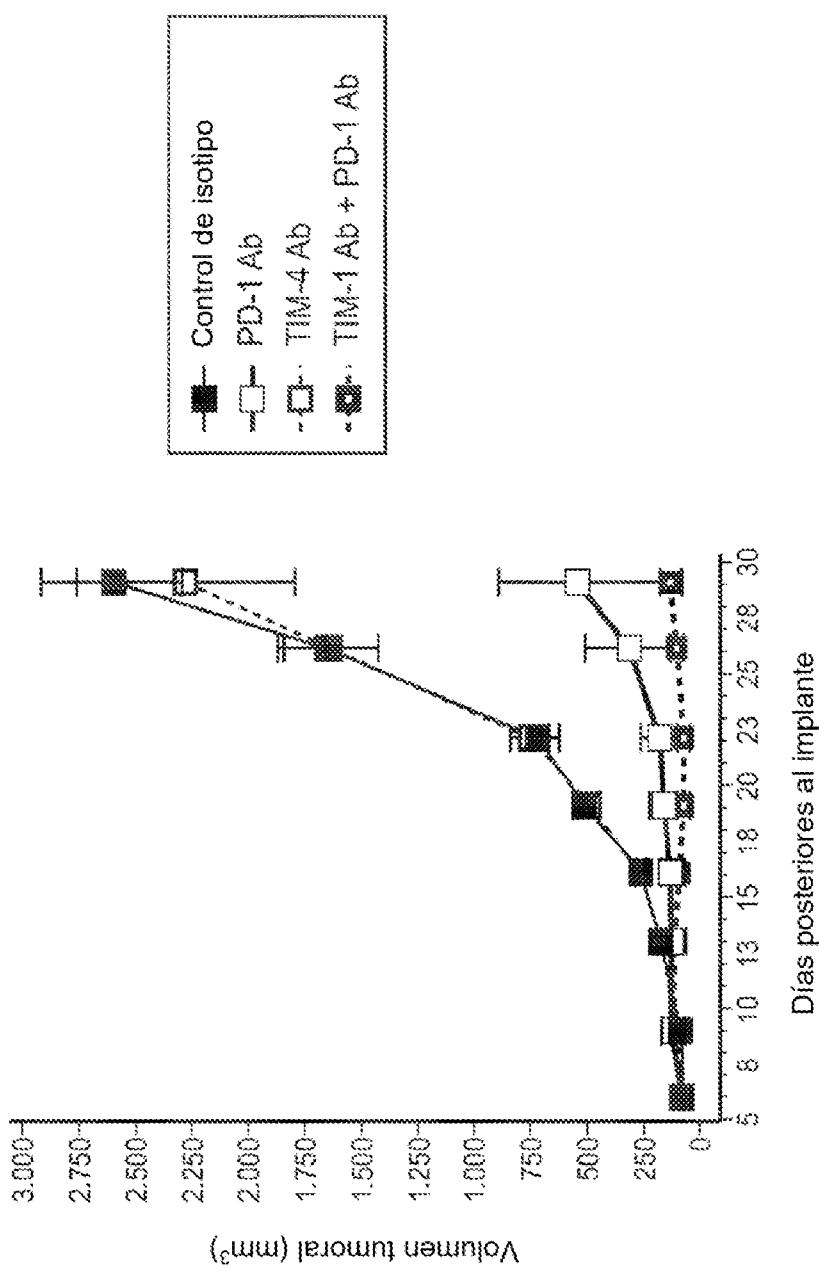


FIGURA 11

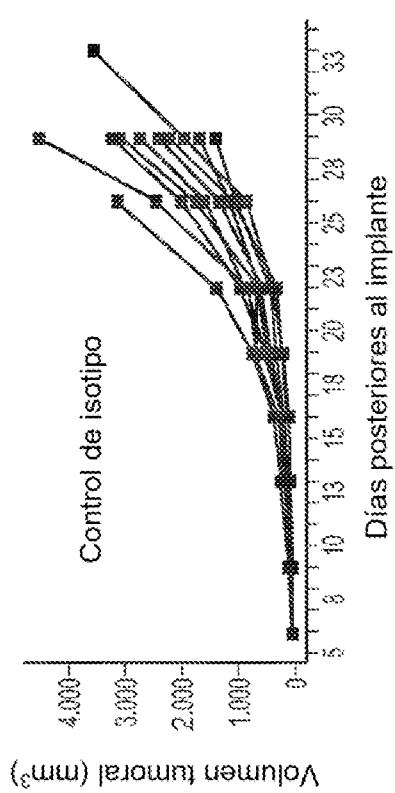


FIGURA 12A

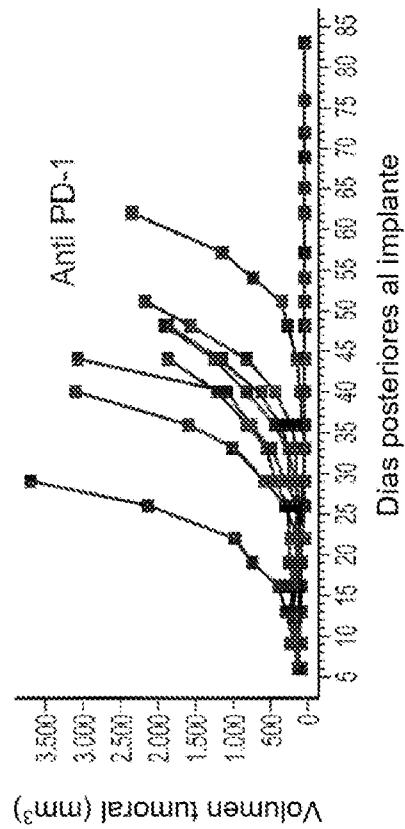


FIGURA 12B

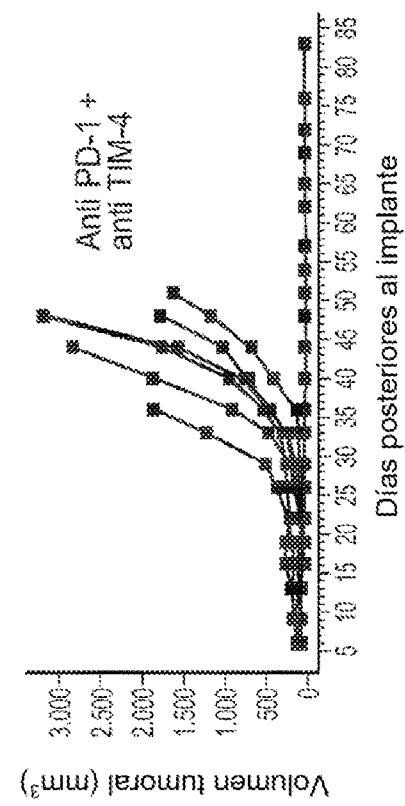


FIGURA 12C