

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 019 734**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2009 E 23214687 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2025 EP 4331604**

(54) Título: **Anticuerpos anti PD-L1 y su uso para potenciar la función de células T**

(30) Prioridad:

09.12.2008 US 121092 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.05.2025

(73) Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.00%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

(72) Inventor/es:

**IRVING, BRYAN;
CHEUNG, JEANNE;
CHIU, HENRY;
LEHAR, SOPHIE;
MAECKER, HEATHER;
MARIATHASAN, SANJEEV y
WU, YAN**

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 3 019 734 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti PD-L1 y su uso para potenciar la función de células T

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, a la función inmunitaria y a la potenciación de la función de células T, incluyendo la regulación positiva de respuestas inmunitarias mediadas por células y al tratamiento de trastornos disfuncionales de células T.

10 Antecedentes de la invención

La coestimulación o el suministro de dos señales distintas a las de las células T, es un modelo ampliamente aceptado de activación de linfocitos T en reposo por las células presentadoras de antígenos (APC, *antigen-presenting cells*). Lafferty *et al.*, Aust. J. Exp. Biol. Medicina. Sci. 53: 27-42 (1975). Este modelo permite además la discriminación entre tolerancia propia de no propia e inmunitaria. Bretscher *et al.*, Science 169: 1042-1094 (1970); Bretscher, P. A., P.N.A.S. USA 96: 185-190 (1999); Jenkins *et al.*, J. Exp. Medicina. 165: 302-319 (1987). La señal primaria, o señal específica de antígeno, se transduce a través del receptor de células T (TCR, *T-cell receptor*) después del reconocimiento del péptido antigenógeno exógeno presentado en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, *major histocompatibility-complex*). La segunda señal o señal coestimuladora se suministra a células T por moléculas coestimuladoras expresadas en células presentadoras de antígenos (APC), e induce que las células T promuevan la expansión clonal, secreción de citocinas y función efectora. Lenschow *et al.*, Ann. Rev. Immunol. 14: 233 (1996). En ausencia de coestimulación, las células T pueden hacerse refractarias a estimulación por antígenos, no generan una respuesta inmunitaria eficaz y pueden dar como resultado además agotamiento o tolerancia a antígenos exógenos.

El modelo de dos señales sencillo puede ser una sobresimplificación debido a que la fuerza de la señal del TCR tiene de hecho una influencia cuantitativa sobre la activación y diferenciación de las células T. Viola *et al.*, Science 273: 104-106 (1996); Sloan-Lancaster, Nature 363: 156-159 (1993). Además, la activación de células T puede producirse incluso en ausencia de señal coestimuladora si la fuerza de la señal del TCR es alta. Lo que es más importante, las células T reciben señales coestimuladoras secundarias tanto positivas como negativas. La regulación de dichas señales positivas y negativas es crítica para maximizar las respuestas inmunitarias protectoras del hospedador, manteniendo al mismo tiempo la tolerancia inmunitaria e impidiendo la autoinmunidad. Las señales secundarias negativas parecen ser necesarias para la inducción de tolerancia de células T, mientras que las señales positivas promueven la activación de células T. Aunque el modelo sencillo de dos señales sigue ofreciendo una explicación válida para los linfocitos indiferenciados, una respuesta inmunitaria del hospedador es un proceso dinámico, y también pueden proporcionarse señales coestimuladoras a las células T expuestas a antígeno.

40 El mecanismo de coestimulación es de interés terapéutico porque se ha mostrado que la manipulación de señales coestimuladoras proporciona un medio para potenciar o finalizar la respuesta inmunitaria basada en células. Recientemente, se ha descubierto que la disfunción de células T o la anergia se produce simultáneamente con una expresión inducida y sostenida del receptor inhibidor, polipéptido de muerte programada 1 (PD-1). Como resultado, la dirección terapéutica a PD-1 y otras moléculas que señalizan a través de interacciones con PD-1, tales como ligando de muerte programada 1 (PD-L1) y ligando de muerte programada 2 (PD-L2) son un área de gran interés. 45 Latchman *et al.*, Nature Immunol. 2: 261-268 (2001) habían descrito el ligando PD-L2 como un segundo ligando para PD-1. La expresión de PD-L1 se ha demostrado *in situ* en una amplia variedad de tumores sólidos; véase, por ejemplo, Dong *et al.*, Nat. Med. 8: 793-800 (2002). Estudios en modelos animales demuestran que la expresión de PD-L1 en tumores inhibe la activación de células T y la lisis de células tumorales; véase, por ejemplo, Hirano *et al.*, Cancer Res. 65: 1089-96 (2005). Barber *et. al.*, Nature 439:682-7 (2006) desvelaron que los anticuerpos que 50 bloqueaban la unión PD-1: PD-L1 producían respuestas potenciadas de las células T y una reducción de la carga vírica en un modelo de ratón.

55 La inhibición, entre otras cosas, de la señalización de PD-L1 se ha propuesto como un medio para potenciar la inmunidad de células T para el tratamiento del cáncer (por ejemplo, inmunidad tumoral) e infección, incluyendo infección tanto aguda como crónica (por ejemplo, persistente). En el documento WO 2007/005874 se desvelan determinados anticuerpos humanos anti-PD-L1 humano obtenidos utilizando un ratón KM. Se informa de que estos anticuerpos bloquean la interacción de PD-L1/PD-1 humanos *in vitro*. En el documento WO 2008/071447 se describe, entre otros cosas, nanocuerpos específicos para B7-H1 que se obtienen explorando bibliotecas. En el documento US2003/039653 se analizan métodos para potenciar la capacidad de respuesta de una célula T en mamíferos y propone receptores para B7-H1 o anticuerpos que se unen a B7-H1 para este fin. En el documento EP-A1 1537 878 se propone la inhibición de señales inmunosupresoras inducidas por PD-1, PD-1 o PD-L2 para tratar el cáncer e infecciones, con lo cual, entre otras cosas, se proponen anticuerpos contra PD-1, PD-1 o PD-L2 para este fin.

65 Sin embargo, dado que aún no se ha comercializado una estrategia terapéutica óptima dirigida a una diana de esta vía, existe una importante necesidad médica no cubierta.

Sumario de la invención

En el presente documento se describen anticuerpos anti PD-L1, incluyendo ácido nucleico que codifica y composiciones que contienen dichos anticuerpos, y para su uso para potenciar la función de células T para regular positivamente respuestas inmunitarias mediadas por células y para el tratamiento de trastornos disfuncionales de células T, incluyendo infección (por ejemplo, aguda y crónica) e inmunidad tumoral.

La invención se refiere a las reivindicaciones adjuntas.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo de longitud completa anti PD-L1 aislado, bloqueante, que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y una de cadena ligera, en el que:

(a) la cadena pesada comprende una HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en la que además:

- (i) la secuencia de HVR-H1 es GFTFSX₁SWIH (SEQ ID NO:1)
- (ii) la secuencia de HVR-H2 es AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG (SEQ ID NO:2);
- (iii) la secuencia de HVR-H3 es RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 3); y

(b) la cadena ligera comprende una HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, en la que además:

- (iv) la secuencia de HVR-L1 es RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A (SEQ ID NO:8);
- (v) la secuencia de HVR-L2 es SASX₉LX₁₀S (SEQ ID NO:9);
- (vi) la secuencia de HVR-L3 es QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T (SEQ ID NO:10);

en la que X₁= D, X₂=S y X₃ =T, X₄ =D, X₅ =V, X₆=S, X₇ =A y X₈ =V, X₉= F y X₁₀=Y, X₁₁ =Y, X₁₂= L ,X₁₃= Y, X₁₄ =H y X₁₅ = A, y que además comprende:

(c) secuencias marco conservadas de cadena pesada de región variable yuxtapuestas entre las HVR de acuerdo con la fórmula: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), y
 (d) secuencias marco conservadas de cadena ligera de región variable yuxtapuestas entre las HVR de acuerdo con la fórmula: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4).

en el que las secuencias marco conservadas de (c) y (d) derivan de secuencias marco conservadas consenso humanas, en el que la secuencia marco conservada de VH consenso es una secuencia marco conservada consenso del subgrupo III de Kabat y la secuencia marco conservada de VL consenso es una secuencia marco conservada consenso kappa I de Kabat.

La presente invención también se refiere a una composición que comprende dicho anticuerpo anti-PD-L1 aislado y bloqueante y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Por consiguiente, en la HVR-H1 del anticuerpo anti-PD-L1 reivindicado, X₁ es D; y en la HVR-H2 del anticuerpo anti-PD-L1 X₂ es S y X₃ es T. Además, en la HVR-L1 del anticuerpo anti-PD-L1 reivindicado, X₄ es D; X₅ es V; X₆ es S; X₇ es A y X₈ es V, en la HVR-L2 del anticuerpo anti-PD-L1 X₉ es F; X₁₀ es Y y en la HVR-L3 del anticuerpo anti-PD-L1 reivindicado X₁₁ es Y; X₁₂ es L; X₁₃ es Y; X₁₄ es H; X₁₅ es A. El anticuerpo anti-PD-L1 de la invención comprende además secuencias marco conservadas de cadena pesada de región yuxtapuestas entre las HVR de acuerdo con la fórmula: (HC-FR1)-(HVRH1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4). Las secuencias marco conservadas derivan de secuencias marco conservadas consenso humanas, en concreto, de secuencias marco conservadas consenso de VH del subgrupo III. Las secuencias marco conservadas consenso de VH del subgrupo III pueden ser las siguientes:

- HC-FR1 es EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:4)
- HC-FR2 es WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:5)
- HC-FR3 es RFTISADTSKNAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:6)
- HC-FR4 es WGQGTLTVSA (SEQ ID NO:7).

El anticuerpo anti-PD-L1 comprende secuencias marco conservadas de cadena ligera de región variable yuxtapuestas entre las HVR de acuerdo con la fórmula (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Las secuencias marco conservadas de cadena ligera derivan de secuencias marco conservadas consenso humanas y son secuencias marco conservadas consenso kappa I de VL. La secuencia marco conservada de cadena ligera puede ser la siguiente:

- LC-FR1 es DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:11)
- LC-FR2 es WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 12)
- LC-FR3 es GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 13)
- LC-FR4 es FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 14).

Por consiguiente, la región variable de cadena pesada comprende una o más secuencias marco conservadas yuxtapuestas entre las HVR como: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), y las regiones variables de cadena ligera comprenden una o más secuencias marco conservadas yuxtapuestas entre las HVR como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4).

5 El anticuerpo anti-PD-L1 comprende además una región constante de IgG1 humana. El anticuerpo puede tener función efectora reducida o mínima. La función efectora mínima puede resultar de una "mutación de Fc sin efecto" o aglucosilación. La mutación de Fc sin efecto puede ser una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

10 Un anticuerpo anti PD-L1 aislado de la invención puede comprender una secuencia de región variable de cadena pesada y una de cadena ligera, en la que:

15 (a) la secuencia de cadena pesada tiene la secuencia de cadena pesada:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWIS
PYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFYWG
QGTLVTVSA (SEQ ID NO:20),

(b) la secuencia de cadena ligera tiene la secuencia de cadena ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY SASF
LYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTSSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID
NO:21).

20 La invención también proporciona composiciones que comprenden el anticuerpo anti-PD-L1 aislado y bloqueante de la invención en combinación con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 En el presente documento también se describe un ácido nucleico aislado que codifica secuencias de región variable de cadena ligera o una de cadena pesada del anticuerpo anti PD-L1 de la invención.

30 El ácido nucleico puede comprender además un vector adecuado para la expresión del ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos anti PD-L1 aislados, bloqueantes de la invención. El vector puede comprender una célula hospedadora adecuada para la expresión del ácido nucleico. La célula hospedadora puede ser una célula eucariota o una célula procariota. La célula eucariota puede ser una célula de mamífero, tal como una célula de Ovario de Hámster Chino (CHO).

35 En el presente documento también se describe un proceso para preparar el anticuerpo anti PD-L1 de la invención, que comprende cultivar una célula hospedadora que contiene ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti PD-L1 de la presente invención en una forma adecuada para la expresión, en condiciones adecuadas para producir dicho anticuerpo o fragmento, y recuperar el anticuerpo.

40 En el presente documento también se describe una composición que comprende el anticuerpo anti PD-L1 de la invención y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se describe un artículo de fabricación que comprende un recipiente que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición desvelada en el presente documento y un prospecto que indica el uso para el tratamiento de un trastorno disfuncional de células T.

45 También se describe un artículo de fabricación que comprende cualquiera de las composiciones anti PD-L1 de la presente invención en combinación con al menos una molécula de BNCA. Las moléculas de BNCA pueden ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, un oligopéptido de BNCA, un ARNi de BNCA o una molécula pequeña de BNCA. La molécula coestimuladora negativa B7 puede seleccionarse del grupo que consiste en: CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, B7.1, B7-H3 y B7-H4.

50 El artículo de fabricación comprende las composiciones anti PD-L1 en combinación con un agente quimioterapéutico. El agente quimioterapéutico puede ser gemcitabina.

55 También se describe un artículo de fabricación que comprende cualquiera de los anticuerpos anti PD-L1 aislados, bloqueantes de la presente invención en combinación con uno o más agonistas de una molécula coestimuladora positiva. Una molécula coestimuladora positiva puede ser una molécula coestimuladora de la familia B7. La molécula coestimuladora positiva puede seleccionarse del grupo que consiste en: CD28, CD80, CD86, ICOS/ICOSL. La molécula coestimuladora positiva puede ser una molécula coestimuladora de la familia TNFR. La molécula

coestimuladora de TNFR puede seleccionarse del grupo que consiste en: OX40/OX40L, 4-1BB/4-1BBL, CD27/CD27L, CD30/CD30L y HVEM/LIGHT, y fragmentos, construcciones y anticuerpos agonistas de los mismos.

5 También se describe un artículo de fabricación que comprende los anticuerpos anti PD-L1 de la presente invención en combinación con uno o más antibióticos. El antibiótico puede seleccionarse del grupo que consiste en un agente antivírico, agente antibacteriano, agente antifúngico, agente antiprotozoario.

10 El agente antivírico puede seleccionarse del grupo que consiste en inhibidores de transcriptasa inversa, inhibidores de proteasa, inhibidores de integrasa, inhibidores de entrada o fusión, inhibidores de maduración, inhibidores de liberación vírica, potenciadores de la respuesta inmunitaria, potenciadores sinérgicos antivíricos, vacunas, agonistas hepáticos y terapias herbales. La combinación puede comprender una o más categorías de agentes antivíricos.

15 También se describe un artículo de fabricación que comprende los anticuerpos anti PD-L1 de la presente invención en combinación con una o más vacunas.

15 También se desvela un método para potenciar la función de células T que comprende administrar una cantidad eficaz de los anticuerpos o las composiciones anti PD-L1 de la presente invención. El anticuerpo o la composición anti PD-L1 puede hacer que las células T disfuncionales dejen de serlo.

20 También se desvela un método para tratar un trastorno disfuncional de células T que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos o las composiciones anti PD-L1 anteriormente descritos de la invención. El trastorno disfuncional de células T puede ser infección o inmunidad tumoral. La infección puede ser aguda o crónica. La infección crónica puede ser persistente, latente o lenta. La infección crónica puede resultar de un patógeno seleccionado del grupo que consiste en bacterias, virus, hongos y protozoos. El nivel de patógeno del hospedador puede reducirse. En un aspecto adicional más, el método comprende además el tratamiento con una vacuna. El método puede comprender además el tratamiento con un antibiótico. El patógeno puede ser una bacteria, y el método puede comprender además la administración de un agente antibacteriano. La bacteria puede seleccionarse del grupo que consiste en: *Mycobacterium* spp., *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Streptococcus* spp., *Haemophilus*, spp., *Neisseria* spp., *Klebsiella* spp., *Borrelia* spp., *Bacteroides Fragillis*, *Treponema* spp. y *Helicobacter pylori*. El patógeno puede ser un virus, y el método puede comprender además la administración de un agente antivírico. El virus puede seleccionarse del grupo que consiste en: hepatitis B, C, virus del herpes simple I, II, virus de la inmunodeficiencia humana I, II, citomegalovirus, virus de Epstein Barr, papilomavirus humano, virus linfotróficos T humanos, -I, -II, varicela zóster. El patógeno puede ser un hongo, y el método puede comprender además la administración de un agente antifúngico. El trastorno puede seleccionarse del grupo que consiste en: aspergilosis, blastomicosis, candidiasis albicans, coccidioidomicosis immitis, histoplasmosis, paracoccidioidomicosis, microsporidiosis. El patógeno puede ser un protozoo, y el método puede comprender además la administración de un agente antiprotozoario. El trastorno puede seleccionarse del grupo que consiste en: leishmaniosis, plasmodiosis (es decir, paludismo), criptosporidiosis, toxoplasmosis, tripanosomiasis e infecciones por helmintos, incluyendo las resultantes de trematodos (por ejemplo, esquistosomiasis), cestodos (por ejemplo, equinococcosis) y nematodos (por ejemplo, triquinosis, ascariasis, filariosis y estrongiloidiasis).

45 El trastorno disfuncional de células T puede ser inmunidad tumoral. El anticuerpo o la composición anti PD-L1 de la presente invención puede combinarse con un régimen de tratamiento que comprende además una terapia tradicional seleccionada del grupo que consiste en: radioterapia, quimioterapia, terapia dirigida, inmunoterapia, terapia hormonal, inhibición de la angiogénesis y cuidados paliativos. El tratamiento quimioterapéutico puede seleccionarse del grupo que consiste en: gencitabina, ciclofosfamida, doxorubicina, paclitaxel, cisplatino. La inmunidad tumoral puede resultar de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en: cáncer de mama, pulmón, colon, ovario, melanoma, vejiga, riñón, hígado, salivar, estómago, gliomas, tiroides, tímico, epitelial, de cabeza y cuello, gástrico y pancreático.

50 Breve descripción de los dibujos

55 La Figura 1 es una ilustración gráfica que representa la coestimulación de células T por la familia B7 de moléculas de superficie celular.

La Figura 2 es un esquema que muestra el diseño experimental del ensayo de estimulación de células T de PMEL/B16.

60 La Figura 3 es un gráfico de barras que muestra el efecto de anticuerpo (Ab) anti PD-L1 sobre la función de células T específica de antígeno, a través de una mayor producción de IFN-γ en células T CD8+ PMEL en respuesta al péptido melanocitario gp100 (glucoproteína 100). Tanto el porcentaje de células T CD8+ productoras de IFN-γ como sus niveles de producción de IFN-γ aumentan durante la estimulación en presencia del anticuerpo anti PD-L1.

65 La Figura 4 es un gráfico de barras que muestra el efecto del anticuerpo anti PD-L1 sobre la función de células T específicas de antígeno a través de una mayor producción de la proliferación de células T CD4+ específicas de

Ova por el anticuerpo anti PD-L1, YW243.55.S1, en una estimulación secundaria con células B A20 pulsadas con Ova/APC mPD-L1.

- 5 La Figura 5 es una serie de representaciones gráficas de la técnica FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*, clasificación de células activadas por fluorescencia) que muestra la potenciación de la proliferación de células T CD8 humanas por el anticuerpo anti PD-L1, YW243.55S1, en una reacción de linfocitos mixtos. También se muestra el porcentaje de células proliferantes medido por dilución de intensidad con colorante CFSE (éster de succinimidil-carboxifluoresceína).
- 10 La Figura 6 es un esquema del diseño experimental del tratamiento del LCMV (virus de la coriomeningitis linfocítica) crónico con la forma química del anticuerpo anti PD-L1, YW243.55S70. Las flechas indican el tiempo de las 6 dosis de anti PD-L1 que comenzaron 14 días después de la infección con 2×10^6 ufp de I Clon 13 del LCMV.
- 15 Las Figuras 7A y 7B son gráficos que muestran funciones efectoras de CD8 potenciadas en células ex vivo después del tratamiento *in vivo* de infección crónica por el LCMV por el anticuerpo anti PD-L1, YW243.55.S70. El bloqueo de PD-L1 por YW243.55.S70 aumentó la desgranulación de células T CD8+ (medido por el aumento en la superficie de CD107A) (Fig. 7A) y aumentó el porcentaje de células productoras de IFN-gamma en respuesta a péptido gp33 del LCMV (Fig. 7B). La frecuencia de células específicas para gp33 se revela mediante tinción con pentámeros de gp33 H2-Db.
- 20 Las Figuras 8A y 8B muestran la reducción en los títulos de LCMV en sangre y tejido en infección por LCMV crónica después del tratamiento *in vivo* con anticuerpo anti PD-L1. En la Figura 8A, se analizan títulos víricos de los diversos tejidos indicados los Días 21 y 28, una y dos semanas después del tratamiento con Ab, respectivamente. En la Figura 8B, se analizan los títulos víricos en suero los Días 0, 7, 14, 21 y 28, produciéndose inoculación de LCMV el día 0 y comenzando el tratamiento el día 14.
- 25 La Figura 9A muestra una reducción significativa de crecimiento tumoral de carcinoma de colon MC38.Ova como resultado de la aplicación de anticuerpo anti PD-L1 después del tratamiento terapéutico de tumores establecidos (el tratamiento comenzó el Día 14, cuando el tumor era de 250 mm^3). La Figura 9B es un histograma que muestra los niveles de superficie de expresión de PD-L1 en células MC38.Ova en cultivo tisular medido por citometría de flujo. Las células MC38.Ova no expresan PD-L2.
- 30 La Figura 10 es un gráfico que muestra el efecto del tratamiento de bloqueo de PD-L1 solo y en combinación con anti VEGF o Gemcitabina sobre el crecimiento de tumores MC38.Ova en ratones C57BL/6.
- 35 Las Figuras 11A-B son las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera, respectivamente, de 11 anticuerpos anti PD-L1 identificados por presentación en fagos. Las barras sombreadas muestran las CDR con diversas definiciones, mientras que las zonas encuadradas muestran el alcance de las HVR.

40 Descripción detallada

Técnicas generales

- 45 La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook *et al.*, 1989); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed., 1987); Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel *et al.*, eds 1987, y actualizaciones periódicas); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis *et al.*, ed., 1994); A Practical Guide to Molecular Cloning (Perbal Bernard V., 1988); Phage Display: A Laboratory Manual (Barbas *et al.*, 2001).

55 I. Inmunidad del hospedador

A. Desarrollo y activación de linfocitos

- 60 Los dos tipos principales de linfocitos en seres humanos son los linfocitos T (derivados de timo) y los linfocitos B (derivados de médula ósea). Estas células derivan de células madre hematopoyéticas de la médula ósea y el hígado fetal que se han diferenciado en la ruta de desarrollo linfoide. La descendencia de estas células madre sigue rutas divergentes para madurar a linfocitos B o T. El desarrollo de linfocitos B humanos tiene lugar completamente dentro de la médula ósea. Por otro lado, las células T, se desarrollan desde precursores inmaduros que dejan la médula y viajan a través del torrente sanguíneo al timo, donde proliferan y se diferencian en linfocitos T maduros.

- 65 Los linfocitos maduros que surgen del timo o de la médula ósea están en un estado quiescente o "en reposo", es decir, son mitóticamente inactivos. Cuando se dispersan al torrente sanguíneo, estos linfocitos "indiferenciados" o

"vírgenes" viajan a diversos órganos linfoides secundarios o periféricos, tales como el bazo, los ganglios linfáticos o las amígdalas. La mayoría de los linfocitos vírgenes tienen una longevidad intrínsecamente corta y mueren después de algunos días tras dejar la médula ósea o el timo. Sin embargo, si dicha célula recibe señales que indican la presencia de un antígeno, pueden activarse y experimentar ciclos sucesivos de división celular. Algunas de las células descendientes resultantes revierten después al estado en reposo para convertirse en linfocitos de memoria, células B y T que están esencialmente sensibilizadas para el siguiente encuentro con el alérgeno estimulante. La otra descendencia de linfocitos vírgenes activados son células efectoras, que sobreviven solamente durante unos días, pero llevan a cabo actividades defensivas específicas.

- 5 10 La activación de linfocitos se refiere a una serie ordenada de acontecimientos por los que pasa un linfocito en reposo a medida que se estimula para dividirse y producir descendencia, algunos de los cuales se convierten en células efectoras. Una respuesta completa incluye tanto la inducción de proliferación celular (*mitogénesis*) como la expresión de funciones inmunológicas. Los linfocitos se activan cuando ligandos específicos se unen a receptores en sus superficies. Los ligandos son diferentes para las células T y B, pero los mecanismos fisiológicos intracelulares resultantes son similares.
- 15

20 25 Algunos antígenos por sí mismos exógenos pueden inducir la activación de linfocitos, especialmente antígenos poliméricos grandes que se entrecruzan con inmunoglobulinas de superficie en células B, u otras glucoproteínas en células T. Sin embargo, la mayoría de los antígenos no son poliméricos e incluso la unión directa con células B en grandes números no consigue da como resultado activación. Estos antígenos más comunes activan células B cuando se coestimulan con linfocitos T auxiliares activados cercanos. Dicha estimulación puede producirse a partir de linfocinas secretadas por la célula T, pero se transmite más eficazmente por contacto directo de la célula B con proteínas de superficie de célula T que interaccionan con ciertos receptores de superficie de células B para generar una señal secundaria.

- 25 30 B. Células T
- 30 Los linfocitos T no expresan inmunoglobulinas, sino que, en cambio, detectan la presencia de sustancias exógenas por medio de proteínas de superficie denominadas receptores de células T (TCR, *T-cell receptors*). Estos receptores reconocen antígenos por contacto directo o influyendo en la actividad de otras células inmunitarias. Junto con los macrófagos, las células T son el tipo celular primario implicado en la inmunidad mediada por células.

35 40 A diferencia de las células B, las células T pueden detectar sustancias exógenas solamente en contextos específicos. En particular, los linfocitos T reconocerán una proteína exógena solamente si primero se escinde en péptidos pequeños, que después se presentan en la superficie de una segunda célula hospedadora, denominada una célula presentadora de antígeno (APC). Muchos tipos de células hospedadoras pueden presentar antígenos en algunas condiciones pero ciertos tipos están adaptados más específicamente para este fin y son particularmente importantes en el control de la actividad de células T, incluyendo macrófagos y otras células B. La presentación de antígenos depende en parte de proteínas específicas, denominadas proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), en la superficie de las células presentadoras. Por lo tanto, para estimular la inmunidad mediada por células, deben presentarse péptidos exógenos a las células T en combinación con péptidos del MHC, y esta combinación debe ser reconocida por un receptor de células T.

45 55 Hay dos subconjuntos de células T significativos: linfocitos T citotóxicos (células T_c o CTL, *cytotoxic T lymphocytes*) y células T auxiliares (células T_H, *helper T cells*), que más o menos pueden identificarse basándose en la expresión en superficie celular del marcador CD8 y CD4. Las células T_c son importantes en la defensa vírica y pueden destruir virus directamente reconociendo ciertos péptidos víricos expresados en superficie celular. Las células T_H promueven la proliferación, maduración y función inmunológica de otros tipos celulares, por ejemplo, secreción de linfocinas para controlar las actividades de células B, macrófagos y células T citotóxicas. Los linfocitos T tanto vírgenes como de memoria permanecen habitualmente en el estado en reposo, y en este estado no muestran actividad auxiliar o citotóxica significativa. Cuando se activan, estas células experimentan varios ciclos de división mitótica para producir células descendientes. Algunas de estas células descendientes vuelven al estado en reposo como células de memoria, pero otras se convierten en células efectoras que expresan activamente actividad auxiliar o citotóxica. Estas células descendientes se asemejan a sus parentales: las células CD4+ solamente pueden producir descendencia CD4+, mientras que las células CD8+ producen solamente descendencia CD8+. Las células T efectoras expresan marcadores de superficie celular que no se expresan en células T en reposo, tales como CD25, CD28, CD29, CD40L, receptores de transferrina y proteínas del MHC de clase II. Cuando los estímulos activadores se retiran, la actividad citotóxica o auxiliar se reduce gradualmente durante un periodo de varios días a medida que las células efectoras mueren o vuelven al estado en reposo.

60 65 De forma similar a la activación de células B, las respuestas de linfocitos T a la mayoría de los antígenos, también requieren dos tipos de estímulos simultáneos. El primero es el antígeno, que si se presenta de forma apropiada por proteínas del MHC en una célula presentadora de antígenos, puede reconocerse y unirse con receptores de células T. Aunque este complejo de antígeno-MHC envía una señal al interior celular, es habitualmente insuficiente para dar como resultado activación de células T. La activación completa, tal como se produce con células T auxiliares, requiere coestimulación con otros ligandos específicos denominados coestimuladores que se expresan en la

superficie de la célula presentadora de antígenos. La activación de una célula T citotóxica, por otro lado, generalmente requiere IL-2, una citocina secretada por células T auxiliares activadas.

C. La respuesta inmunitaria

- 5 Las tres propiedades funcionales primarias del sistema inmunitario de mamífero que lo distinguen de las otras defensas del cuerpo incluyen: (1) especificidad - la capacidad para reconocer y responder o no responder individualmente entre un amplio número de moléculas diana, (2) diferenciación - la capacidad de determinar lo propio de lo ajeno para coexistir pacíficamente con todas las innumerables proteínas y otro material orgánico, pero 10 responder aun así vigorosamente contra material exógeno que se introduce en el cuerpo, y (3) memoria - la capacidad de moldearse por la experiencia de modo que los encuentros posteriores con un patógeno exógeno particular provoquen una respuesta más rápida y vigorosa que la producida en el encuentro inicial. Cuando una o más de estas funciones se frustran, se produce una condición patológica.
- 15 Se liberan continuamente linfocitos vírgenes de los órganos linfoideos primarios a la periferia, portando cada uno receptores de superficie que permiten la unión a antígeno. La unión a antígeno en células B está mediada a través de inmunoglobulinas unidas a superficie, mientras que en células T está mediada por receptores de células T. Cuando se activan linfocitos vírgenes, estos proliferan, produciendo células descendientes que pueden después experimentar ciclos adicionales de activación y proliferación. La velocidad e intensidad de respuesta a un antígeno dado se determina en gran medida por selección clonal: cuanto mayor sea la población de células descendientes o 20 clones específicos para un antígeno particular, mayor será el número de células que puede reconocer y participar en la respuesta inmunitaria. Cada respuesta inmunitaria es una secuencia compleja y regulada de forma intrincada de acontecimientos que implican varios tipos celulares. Se desencadena cuando un inmunógeno entra en el cuerpo y se encuentra con una clase especializada de células denominadas células presentadoras de antígenos (APC). Estas 25 APC capturan una cantidad mínima del inmunógeno y lo presentan en una forma que pueden reconocer los linfocitos T auxiliares específicos de antígeno. Las células T auxiliares pueden después activarse y, a su vez, promover la activación de otras clases de linfocitos, tales como células B o células T citotóxicas. Los linfocitos activados proliferan después y llevan a cabo sus funciones efectoras específicas. En cada estadio de este proceso, los linfocitos y las APC se comunican entre sí mediante contacto directo o secretando citocinas reguladoras.
- 30 Los antígenos exógenos que capture una APC experimentan una serie de alteraciones denominadas *procesamiento antigénico*. Dicho procesamiento, especialmente de inmunógenos proteicos implica la desnaturalización y digestiones proteolíticas parciales, de modo que el inmunógeno se escinde en péptidos cortos. Un número limitado de los péptidos resultantes se asocia después de forma no covalente con proteínas del MHC de clase II y se 35 transportan a la superficie de APC, un proceso conocido como *presentación de antígenos*. Un linfocito T auxiliar CD4+ que entra en contacto directo con una APC puede activarse, pero lo hará solamente si expresa una proteína receptora de células T que puede reconocer y unirse con el complejo de péptido-MHC particular presentado por la APC.
- 40 Las células T auxiliares (T_H) son los principales organizadores de la respuesta inmunitaria porque son necesarios para la activación de las otras dos células efectoras linfáticas: células T citotóxicas (T_c) y células plasmáticas secretoras de anticuerpos. La activación de T_H se produce pronto en una respuesta inmunitaria y requiere al menos dos señales. Una señal es proporcionada por la unión del receptor de antígenos de células T con el complejo de péptido antigénico-MHC en la superficie de la APC que se transmite a través del complejo proteico de CD3, mientras 45 que se piensa que la segunda señal coestimuladora a través de la APC resulta de la unión de una proteína transmisora de señal separada en la superficie de células T con un ligando específico en la APC. Una de dichas interacciones conocida es la proteína de células T CD28 y la familia de proteínas de la superficie de APC conocida como B7. Otros pares de proteínas de superficie también pueden mediar en la coestimulación. El proceso de coestimulación se describe en mayor detalle posteriormente. Se cree que los anticuerpos anti PD-L1 de la presente 50 invención potencian la coestimulación mediante antagonismo de una señal coestimuladora negativa proporcionada por señalización a través de PD-L1.
- Juntas, las dos señales inducen que la célula T auxiliar comience a secretar la interleucina 2 (IL-2) de citocinas y 55 también que comience a expresar receptores de IL-2 de alta afinidad específicos en su superficie. IL-2 es un factor mitógeno altamente potente para linfocitos T y es esencial para la respuesta proliferativa de células T activadas. El efecto de IL-2 en la célula de la que se secreta es un fenómeno conocido como efecto autocrino. Se ha mostrado además que incluso si una célula T ha recibido ambas señales, esta no proliferará si los receptores de IL-2 de su propia superficie están bloqueados. IL-2 también puede actuar en células inmediatamente cercanas, en el denominado efecto paracrino. Este efecto es especialmente importante para activar células T_c , que generalmente no 60 producen suficiente IL-2 para estimular su propia proliferación. Además de IL-2, las células T_H activadas secretan otras citocinas y promueven el crecimiento, la diferenciación y las funciones de células B, macrófagos y otros tipos celulares.
- 65 El contacto entre una APC y una célula T_H específica de antígeno tiene efecto también en la APC, de los cuales uno de los más importantes es la liberación de IL-1. Se cree que esta citocina actúa de una manera autocrina para aumentar la expresión en superficie de proteínas del MHC de clase II y de diversas moléculas de adhesión

reforzando de este modo la unión de la célula T_H y potenciando la presentación de antígenos. Al mismo tiempo, IL-1 actúa de una manera paracrina en la célula T_H para promover la secreción de IL-2 y la expresión de receptor de IL-2.

Durante la activación de células T_H de la manera previamente descrita, algunas células B también han interactuado con el inmunógeno a través de sus receptores de antígeno, que son formas unidas a membrana de los anticuerpos que secretarán posteriormente. A diferencia de las células T, las células B reconocen un inmunógeno en su forma libre, no procesada. La unión específica a antígeno proporciona un tipo de señal que puede conducir a la activación de células B. Un segundo tipo se proporciona por células T_H activadas, que expresan proteínas que ayudan a activar la célula B uniéndose con receptores distintos de inmunoglobulina en su superficie. Estas señales derivadas de T_H , que actúan en cualquier célula B independientemente de su especificidad de antígeno, se conocen como factores auxiliares. Estos factores auxiliares incluyen IL-2, IL-4 e IL-6. Sin embargo, la ayuda se consigue más eficazmente mediante contacto célula-célula, lo que permite que las proteínas en la superficie de células T contacten directamente con las de la célula B. La forma más eficaz de ayuda mediada por contacto se produce cuando una proteína denominada ligando CD40 (CD40L), que se expresa en células T_H solamente después de activarse, se une con una proteína denominada CD40 en células B. En un proceso conocido como *activación de testigo*, el contacto con una célula B activada puede ser incluso suficiente para activar células B en reposo incluso aunque sus inmunoglobulinas de superficie no han interactuado con el antígeno.

Los linfocitos T_c actúan para erradicar células que expresan antígenos exógenos en sus superficies, tales como células hospedadoras infectadas por virus. La mayoría de las células T_c expresan CD8 en lugar de CD4 y por lo tanto reconocen antígenos en asociación con proteínas del MHC de clase I en lugar de clase II. Cuando una célula somática se infecta por un virus, algunas proteínas víricas inmunogénicas pueden experimentar procesamiento dentro de la célula, y los péptidos resultantes pueden después aparecer como complejos en superficie con moléculas del MHC de clase I. Estos complejos de péptido-MHC pueden después reconocerse por el receptor de células T y un clon específico de antígeno, que proporciona una de las dos señales necesarias para la activación de células T_c . La primera señal sola induce receptores de IL-2 de alta afinidad en la célula T_c . La segunda señal es provista por IL-2 secretada de un linfocito T_H activado cercano. Al recibir ambas señales, la célula T_c activada adquiere actividad citotóxica, permitiendo destruir la célula a la que se une, así como cualquier otra célula que porte los mismos complejos de péptido-MHC de clase I. En algunos casos, la destrucción se produce porque el T_c libera toxinas específicas a la célula diana; en otros, el T_c induce que la célula diana se suicide por apoptosis. La célula T_c activada también prolifera, dando lugar a células T_c adicionales con la misma especificidad de antígeno.

D. Coestimulación por la superfamilia de inmunoglobulina:

1. B7.1/B7.2 - CD28/CTLA-4

Quizás la ruta coestimuladora de células T mejor caracterizada es la que señaliza a través de B7.1 (CD80)/B7.2 (CD86) - CD28/CTLA-4 (CD152). Esta ruta de señalización es crítica para la activación y tolerancia de células T. Karandikar *et al.*, J. Neuroimmunol. 89: 10-18 (1998); Oosterwegel *et al.*, Curr. Opin. Immunol. 11: 294-300 (1999); Salomon *et al.*, Annu. Rev. Immunol. 19: 225-252 (2001); Sansom, D. M., Immunol. 101: 169-177 (2000); Chambers *et al.*, Annu. Rev. Immunol. 19: 565-592 (2001).

B7.1 [Freeman *et al.*, J. Exp. Med. 174: 625-631 (1991); Freedman *et al.*, J. Immunol. 137: 3260-3267 (1987); Yokochi *et al.*, J. Immunol. 128: 823-827 (1982)] y B7.2 [Freeman *et al.*, Science 262: 909-911 (1993); Freeman *et al.*, J. Exp. Med. 178: 2185-2192 (1993); Azuma *et al.*, Nature 366: 76-79 (1993)] tienen especificidad doble por los dos receptores estimulantes CD-28 y CTLA-4. Aruffo *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 8573-8577 (1987); Gross *et al.*, J. Immunol. 144: 3201-3210 (1990). CD28 se expresa de forma constitutiva en la superficie de células T [Gross *et al.*, J. Immunol. 149: 380-388 (1992)], mientras que CTLA-4, el receptor de mayor afinidad, tiene expresión que se regula positivamente de forma rápida después de la activación de células T. Peach *et al.*, J. Exp. Med. 180: 2049-2058 (1994); Linsley *et al.*, J. Exp. Med. 176: 1595-1604 (1992); Kinsley *et al.*, Immunity 1: 793-801 (1994); Linsley *et al.*, Immunity 4: 535-543 (1996). La mayoría de las poblaciones de APC expresan B7.2 de forma constitutiva a bajos niveles, que se regula positivamente de forma rápida, mientras que B7.1 se expresa de forma inducible más tarde después de la activación. Freeman *et al.*, Science 262: 909-911 (1993); Hathcock *et al.*, J. Exp. Med. 180: 631-640 (1994). La expresión previa de B7.2 y los datos de supresión de ratones sugieren que B7.2 es la molécula coestimuladora más importante para iniciar las respuestas inmunitarias, pero por lo demás las dos moléculas tienen funciones en gran medida solapantes. McAdam *et al.*, Immuno. Rev. 165: 631-640 (1994).

CD28 interacciona con B7.1 y B7.2 para transmitir una señal que actúa de forma sinérgica con la señal del TCR para promover la activación de células T. Lenschow *et al.*, Annu. Rev. Immunol. 165: 233-258 (1996); Lanzavecchia *et al.*, Cell 96: 1-4 (1999). En ausencia de una señal del TCR, la señalización de CD28 no tiene importancia fisiológica. La señalización de CD28 regula el umbral para la activación de células T y reduce significativamente el número de interacciones del TCR que se requiere para la activación de células T. Viola *et al.*, Science 273: 104-106 (1996). La activación de CD28 sostiene respuestas de células T promoviendo la supervivencia de células T permitiendo de este modo que las citocinas inicien la expansión y diferenciación clonal de células T. Thompson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1333-1373 (1989); Lucas *et al.*, J. Immunol. 154: 5757-5768 (1995); Shahinian *et al.*, Science 261: 609-612 (1993); Sperling *et al.*, J. Immunol. 157: 3909-3917 (1996); Boise *et al.*, Immunity 3: 87-98 (1995). CD28 también

optimiza las respuestas de células T previamente activadas, promoviendo la producción de interleucina 2 (IL-2) y la supervivencia de células T. Aunque algunas respuestas son independientes de CD28, aún no está claro si esta es independencia de la coestimulación resultante de estímulos antigenicos fuertes, o resultado de dependencia de otras rutas coestimuladoras desconocidas.

- 5 La activación de CTLA-4 provoca una señal negativa, que inhibe la transducción de señal mediada por TCR y CD28. La interacción de CTLA-4 da como resultado la inhibición de síntesis de IL-2 y progresión a través del ciclo celular y terminación de las respuestas de células T. Walunas *et al.*, *Immunity* 1: 405-413 (1994); Walunas *et al.*, *J. Exp. Med.* 183: 2541-2550 (1996); Krummel *et al.*, *J. Exp. Med.* 182: 459-466 (1995); Brunner *et al.*, *J. Immunol.* 162: 5813-10 5820 (1999); Greenwald *et al.*, *Immunity* 14: 145-155 (2001). CTLA-4 desempeña un papel importante en la regulación de respuestas de células T, incluyendo *tolerancia de células T periférica*. Aunque no está claro cómo se coordina la señalización a través de CTLA-4 y CD28, algunas posibilidades incluyen la mayor unión con B7 en competición con CD28, mediante inducción de citocinas inmunosupresoras, antagonismo directo de señalización de CD28 y/o señalización mediada por TCR.
- 15 Como resultado, el antagonismo de CTLA-4 (por ejemplo, anticuerpos antagonistas anti CTLA) y/o acción agonista de B7.1/B7.2/CD28 puede ser útil para potenciar la respuesta inmunitaria en el tratamiento de infección (por ejemplo, aguda y crónica) e inmunidad tumoral.

20 2. Señalización de ICOS/ICOSL:

Otra ruta de interacción entre APC y células T se produce mediante ICOS (CD278) e ICOSL (B7-H2, CD275). La señalización de ICOS/ICOSL promueve la diferenciación de células T auxiliares y función efectora, y es particularmente importante para la producción de interleucina 10 (IL-10), pero desempeña un papel más modesto en la regulación de la expansión de células T y producción de IL-2, incluyendo células T reguladoras, tolerancia de células T y autoinmunidad.

A diferencia de CD28, ICOS no se expresa de forma constitutiva en células T indiferenciadas, pero se induce rápidamente en células T después de la interacción con el TCR. Hutloff *et al.*, *Nature* 397: 263-266 (1999); Yoshinaga *et al.*, *Nature* 402: 827-832 (1999); Beier *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 30: 3707-3717 (2000); Coyle *et al.*, *Immunity* 13: 95-105 (2000); Mages *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 30: 1040-1047 (2000); McAdam *et al.*, *J. Immunol.* 165: 5035-5040 (2000). Esto sugiere que ICOS proporciona una señal coestimuladora a células T activadas. Aunque la coestimulación por CD28 potencia la expresión de ICOS, y la expresión de ICOS se reduce en ausencia de B7.1 y B7.2, ICOS no depende completamente de señales de CD28. McAdam *et al.*, *J. Immunol.* 165: 5035-5040 (2000); Aicher *et al.*, *J. Immunol.* 164: 4689-4696 (2000); Kopf *et al.*, *J. Exp. Med.* 192: 53-61 (2000). ICOS está regulado positivamente en células T auxiliares tanto de tipo 1 como de tipo 2 (T_{H1} y T_{H2}) durante la fase inicial de diferenciación, pero los niveles permanecen altos en células T_{H2} y se reducen en células T_{H1} . El patrón de expresión de ICOS en células T en centros germinales. Beier *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 30: 3707-3717 (2000); Mages *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 30: 1040-1047 (2000), indica un papel para ICOS en la ayuda de células T para células B. Los estudios funcionales han confirmado esto, y se ha confirmado incluso la expresión de ICOS en células B de rata, aunque no en otras especies. Tezuka *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276: 335-345 (2000); McAdam *et al.*, *Nature* 409: 102-105 (2001); Dong *et al.*, *Nature* 409: 97-101 (2001); Dong *et al.*, *J. Immunol.* 166: 3659-3662 (2001); Tafuri *et al.*, *Nature* 409: 105-109 (2001).

45 Un papel para la señalización de ICOS/ICOSL parece ser para regular la producción de citocinas (por ejemplo, IL-4, IL-13) mediante células T activadas recientemente así como efectoras. Hutloff *et al.*, *Nature* 397: 263-266 (1999); Coyle *et al.*, *Immunity* 13: 95-105 (2000); Dong *et al.*, *Nature* 409: 97-101 (2001). En estudios de enfermedad alérgica de las vías respiratorias, la función efectora de T_{H2} , pero no la diferenciación de T_{H2} , se proporciona por el bloqueo de ICOS. Tesciuba *et al.*, *J. Immunol.* 167: 1996-2003 (2001). La producción de citocinas tanto T_{H1} como T_{H2} puede suprimirse por la proteína de fusión de ICOS-Ig tras la reactivación *in vitro*, lo que es indicativo de que ICOS también puede regular la función efectora de T_{H1} . Kopf *et al.*, *J. Exp. Medicina*. 192: 53-61 (2000).

Otro papel potencial para ICOS se refiere al mantenimiento de respuestas de T_{H1} . En un modelo experimental de encefalomielitis autoinmunitaria (EAE) para esclerosis múltiple, una enfermedad de T_{H1} mediada por células T CD4+ específicas de mielina, muestra que el resultado del bloqueo de ICOS podría ser distinto cuando la coestimulación se bloquee durante la sensibilización de células T, después durante la fase efectora de EAE. Dong *et al.*, *Nature* 409: 97-101 (2001); Rottman *et al.*, *Nature Immunol.* 2: 605-611 (2001); Sporci *et al.*, *Clin. Immunol.* 100: 277-288 (2001). La EAE inducida por glucoproteína de oligodendrocito de mielina (MOG) está agravada en gran medida en ratones con supresión de ICOS^{-/-}, con producción aumentada de IFN-γ en comparación con tipo silvestre. De forma similar, el bloqueo de ICOS durante la inducción de EAE, agravó la enfermedad dando también como resultado producción de IFN-γ aumentada. Por lo tanto, el bloqueo de ICOS durante la sensibilización conduce a polarización de T_{H1} de la respuesta. Resulta interesante que la sensibilización de células T transgénicas para TCR específicas de mielina *in vitro* en presencia de ICOS-Ig inhibió su capacidad para inducir EAE, en claro contraste con los resultados de bloqueo de ICOS-Ig observado *in vivo*. Sporci *et al.*, mencionado anteriormente. La diferencia para los resultados opuestos *in vitro* e *in vivo* aún no está clara, pero podría reflejar un papel para ICOS en células T reguladoras productoras de IL-10, así como células T efectoras durante el bloqueo de ICOS *in vivo*. La coestimulación a través

de IL-10 es muy eficaz en la potenciación de la producción de IL-10 y es más eficaz que la coestimulación mediante CD28. Hutloff *et al.*, mencionado anteriormente. El bucle regulador de IL-10, IL-12 es crítico para regular EAE debido a que los ratones IL-10^{-/-}, pero no los IL4^{-/-} desarrollan EAE agravada. Segal *et al.*, J. Exp. Medicina. 187: 537 - 546 (1998).

Otro papel potencial más para ICOS es en la potenciación de respuestas humorales de células B dependientes de células T. Los ratones ICOS^{-/-} e ICOSL^{-/-} han mostrado que se requiere ICOS para respuestas de células B dependientes de células T. Hutloff *et al.*, Nature 397:263-66 (1999); Chapoval *et al.*, Nat. Immunol. 2:269-74 (2001); Coyle *et al.*, Immunity 13: 95-105 (2000); McAdam *et al.*, Nature 409: 102-5 (2001); Tafuri *et al.*, Nature 409: 105-9 (2001); Suh *et al.*, Nat. Immunol. 4: 899-906 (2003). Los ratones ICOS^{-/-} también muestran centros germinales reducidos en respuesta a inmunización primaria, defectos profundos en la formación del centro germinal en respuesta a exposición secundaria, y defectos en el cambio de clase de IgG. El papel de ICOS en la interacción de células T:B se validó adicionalmente por la identificación de la pérdida homocigota de ICOS en células T en pacientes con enfermedad de inmunodeficiencia variable común de aparición en adultos. Grimbacher *et al.*, Nat. Immunol. 4: 261-68 (2003).

Como resultado, el agonismo de ICOS/ICOSL (por ejemplo, anticuerpos anti ICOS agonistas, ligando de ICOS/ICOSL soluble) puede ser útil para potenciar la respuesta inmunitaria en el tratamiento de infección (por ejemplo, aguda y crónica) y/o inmunidad tumoral.

3. Ruta de PD-1

Se proporciona una señal coestimuladora negativa importante que regula la activación de células T por receptor de muerte programada 1 (PD-1) (CD279), y sus compañeros de unión a ligando PD-L1 (B7-H1, CD274) y PD-L2 (B7-DC, CD273). El papel regulador negativo de PD-1 se reveló por nuligénicos de PD-1 (*Pdcd1*^{-/-}), que son propensos a autoinmunidad. Nishimura *et al.*, Immunity 11: 141-51 (1999); Nishimura *et al.*, Science 291: 319-22 (2001). PD-1 está relacionado con CD28 y CTLA-4, pero carece de la cisteína próxima a membrana que permite homodimerización. El dominio citoplasmático de PD-1 contiene un motivo de inhibición de inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM, V/IxYxxL/V). PD-1 solamente se une con PD-L1 y PD-L2. Freeman *et al.*, J. Exp. Medicina. 192: 1-9 (2000); Dong *et al.*, Nature Med. 5: 1365-136 9 (1999); Latchman *et al.*, Nature Immunol. 2: 261-268 (2001); Tseng *et al.*, J. Exp. Medicina. 193: 839-846 (2001).

PD-1 puede expresarse en células T, células B, células T citolíticas naturales, monocitos activados y células dendríticas (CD). PD-1 se expresa por células T CD4⁺ y CD8⁺, células B y células mieloides humanas activadas, pero no por no estimuladas. Esto se diferencia de la expresión más restringida de CD28 y CTLA-4. Nishimura *et al.*, Int. Immunol. 8: 773-80 (1996); Boettler *et al.*, J. Virol. 80: 3532-40 (2006). Hay al menos 4 variantes de PD-1 que se han clonado a partir de células T humanas activadas, incluyendo transcritos que carecen de (i) exón 2, (ii) exón 3, (iii) exones 2 y 3 o (iv) exones 2 a 4. Nielsen *et al.*, Cell. Immunol. 235: 109-16 (2005). Con la excepción de PD-1Δex3, todas las variantes se expresan en niveles similares como PD-1 de longitud completa en células mononucleares de sangre periférica en reposo (PBMC). La expresión de todas las variantes se induce significativamente tras la activación de células T humanas con anti CD3 y anti CD28. Las variantes de PD-1 Δex3 carecen de un dominio transmembrana, y se asemejan a CTLA-4 soluble, que desempeña un papel importante en la autoinmunidad. Ueda *et al.*, Nature 423: 506-11 (2003). Esta variante está enriquecida en el fluido sinovial y los sueros de pacientes con artritis reumatoide. Wan *et al.*, J. Immunol. 177: 8844-50 (2006).

Los dos ligandos de PD-1 difieren en sus patrones de expresión. PD-L1 se expresa de forma constitutiva en células T y B de ratones, CD, macrófagos, células madre mesenquimales y mastocitos derivados de médula ósea. Yamazaki *et al.*, J. Immunol. 169: 5538-45 (2002). PD-L1 se expresa en una amplia serie de células no hematopoyéticas (por ejemplo, córnea, pulmón, epitelio vascular, células no parenquimatosas del hígado, células madre mesenquimales, islotes pancreáticos, sincitiotrofoblastos placentarios, queratinocitos, etc.) [Keir *et al.*, Annu. Rev. Immunol. 26: 677-704 (2008)], y está regulado positivamente en varios tipos celulares después de la activación. Los interferones (IFN) tanto de tipo I como de tipo II regulan positivamente PD-L1. Eppihimer *et al.*, Microcirculation 9: 133-45 (2002); Schreiner *et al.*, J. Neuroimmunol. 155: 172-82 (2004). La expresión de PD-L1 en líneas celulares se reduce cuando se inhiben MyD88, TRAF6 y MEK. Liu *et al.*, Blood 110: 296-304 (2007). JAK2 también se ha implicado en la inducción de PD-L1. Lee *et al.*, FEBS Lett. 580: 755-62 (2006); Liu *et al.*, Blood 110: 296-304 (2007). La pérdida o inhibición de homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), una fosfatasa celular que modificaba la señalización de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y Akt, aumentó la expresión de PD-L1 postranscripcional en cánceres. Parsa *et al.*, Nat. Medicina. 13: 84-88 (2007).

La expresión de PD-L2 está más restringida que la de PD-L1. PD-L2 se expresa de forma inducible en CD, macrófagos y mastocitos derivados de médula ósea. PD-L2 también se expresa en aproximadamente la mitad a dos tercios de células B1 peritoneales en reposo, pero no en células B2 convencionales. Zhong *et al.*, Eur. J. Immunol. 37: 2405-10 (2007). Las células B1 PD-L2+ se unen con fosfatidilcolina y pueden ser importantes para respuestas inmunitarias innatas contra抗genos bacterianos. La inducción de PD-L2 por IFN-γ depende parcialmente de NF-κB. Liang *et al.*, Eur. J. Immunol. 33: 2706-16 (2003). PD-L2 también puede inducirse en monocitos y macrófagos por GM-CF, IL-4 e IFN-γ. Yamazaki *et al.*, J. Immunol. 169: 5538-45 (2002); Loke *et al.*, PNAS 100: 5336-41 (2003).

La señalización de PD-1 tiene normalmente un mayor efecto en la producción de citocinas que en la proliferación celular, con efectos significativos en la producción de IFN- γ , TNF- α e IL-2. La señalización inhibidora mediada por PD-1 también depende de la fuerza de la señalización del TCR, con mayor inhibición suministrada a bajos niveles de estimulación del TCR. Esta reducción puede superarse por la coestimulación mediante CD28 [Freeman *et al.*, J. Exp. Medicina. 192: 1027-34 (2000)] o la presencia de IL-2 [Carter *et al.*, Eur. J. Immunol. 32: 634-43 (2002)].

Cada vez hay más pruebas de que la señalización a través de PD-L1 y PD-L2 puede ser bidireccional. Es decir, además de modificar la señalización del TCR o del BCR, la señalización también puede suministrarse de vuelta a las células que expresan PD-L1 y PD-L2. Aunque no se descubrió que el tratamiento de células dendríticas con un anticuerpo anti PD-L2 humano de forma natural aislado de un paciente con macroglobulinemia de Waldenstrom regulara positivamente las moléculas coestimuladoras MHC II o B7, dichas células sí producían mayor cantidad de citocinas proinflamatorias, particularmente TNF- α e IL-6 y proliferación de células T estimuladas. Nguyen *et al.*, J. Exp. Medicina. 196: 1393-98 (2002). El tratamiento de ratones con este anticuerpo también (1) potenció la resistencia a melanoma b16 trasplantado e indujo rápidamente CTL específico de tumores. Radhakrishnan *et al.*, J. Immunol. 170: 1830-38 (2003); Radhakrishnan *et al.*, Cancer Res. 64: 4965-72 (2004); Heckman *et al.*, Eur. J. Immunol. 37: 1827-35 (2007); (2) bloqueó el desarrollo de enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias en un modelo de ratón de asma alérgico. Radhakrishnan *et al.*, J. Immunol. 173: 1360-65 (2004); Radhakrishnan *et al.*, J. Allergy Clin. Immunol. 116: 668-74 (2005).

Pruebas adicionales de señalización inversa a células dendríticas ("CD") han surgido en estudios de CD derivadas de médula ósea cultivadas con PD-1 soluble (dominio EC de PD-1 fusionado con la región constante de Ig - "s-PD-1"). Kuipers *et al.*, Eur. J. Immunol. 36: 2472-82 (2006). Este sPD-1 inhibió la activación de CD y aumentó la producción de IL-10, de una manera reversible mediante la administración de anti PD-1.

Adicionalmente, varios estudios muestran un receptor para PD-L1 o PD-L2 que es independiente de PD-1. B7.1 ya se ha identificado como un compañero de unión para PD-L1. Butte *et al.*, Immunity 27: 111-22 (2007). Los estudios de reticulación química sugieren que PD-L1 y B7.1 pueden interaccionar a través de sus dominios de tipo IgV. Las interacciones de B7.1:PD-L1 pueden inducir una señal inhibidora en células T. El ligamiento de PD-L1 en células T CD4+ por B7.1 o ligamiento de B7.1 en células T CD4+ por PD-L1 suministra una señal inhibidora. Las células T que carecen de CD28 y CTLA-4 muestran proliferación y la producción de citocinas reducidas cuando se estimulan mediante perlas recubiertas con anti CD3 más B7.1. En células T que carecían de todos los receptores para B7.1 (es decir, CD28, CTLA-4 y PD-L1), la proliferación de células T y la producción de citocinas ya no estaban inhibidas por perlas recubiertas con anti CD3 más B7.1. Esto indica que B7.1 actúa específicamente a través de PD-L1 en la célula T en ausencia de CD28 y CTLA-4. De forma similar, las células T que carecen de PD-1 mostraron proliferación y producción de citocinas reducidas cuando se estimularon en presencia de perlas recubiertas de PD-L1 más anti CD3, lo que demuestra el efecto inhibidor del ligamiento de PD-L1 en B7.1 en células T. Cuando las células T carecían de todos los receptores conocidos para PD-L1 (es decir, sin PD-1 y B7.1), la proliferación de células T ya no estaba alterada por perlas recubiertas con PD-L1 más anti CD3. Por lo tanto, PD-L1 puede ejercer un efecto inhibidor en células T mediante B7.1 o PD-1.

La interacción directa entre B7.1 y PD-L1 sugiere que el entendimiento actual de la coestimulación es incompleto, y subraya la importancia de la expresión de estas moléculas en células T. Los estudios de células T PD-L1^{-/-} indican que PD-L1 en células T puede regular negativamente la producción de citocinas de células T. Latchman *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 10691-96 (2004). Debido a que tanto PD-L1 como B7.1 se expresan en células T, células B, CD y macrófagos, existe el potencial de interacciones direccionales entre B7.1 y PD-L1 en estos tipos celulares. Adicionalmente, PD-L1 en células no hematopoyéticas puede interaccionar con B7.1, así como PD-1 en células T, lo que plantea la cuestión de si PD-L1 está implicado en su regulación. Una posible explicación para el efecto inhibidor de la interacción de B7.1:PD-L1 es que PD-L1 de células T puede inmovilizar o segregar APC B7.1 de la interacción con CD28.

Como resultado, el antagonismo de la señalización a través de PD-L1, incluyendo el bloqueo de la interacción de PD-L1 con PD-1, B7.1 o ambos, evitando de este modo que PD-L1 envíe una señal coestimuladora negativa a células T y otras células presentadoras de antígenos probablemente potencien la inmunidad en respuesta a infección (por ejemplo, aguda y crónica) e inmunidad tumoral. Además, los anticuerpos anti PD-L1 de la presente invención, pueden combinarse con antagonistas de otros componentes de la señalización de PD-1:PD-L1, por ejemplo, anticuerpos antagonistas anti PD-1 y anti PD-L2.

4. B7-H3

También se proporcionan señales coestimuladoras a través de B7-H3 (B7RP-2, CD276, PRO352), que se expresa ampliamente en tejidos linfoides y no linfoides. Chapoval *et al.*, Nat. Immunol. 2: 269-74 (2001). En seres humanos, B7-H3 tiene una variante tanto 41g como una 21g, siendo la forma 41g predominante, mientras que la variante 21g predomina en el ratón. Sun *et al.*, J. Immunol. 168: 6294-97 (2002); Steinberger *et al.*, J. Immunol. 172: 2352-59 (2004); Ling *et al.*, Genomics 82: 365-77 (2003).

Estudios recientes han mostrado que B7-H3 es tanto un estimulante como un inhibidor de respuestas de células T. Se proporcionan pruebas de la activación estimulante por lo siguiente: (1) en combinación con anti CD3, las fusiones de B7-H3/Ig coestimularon la proliferación de células T CD4+ y CD8+ y estimularon la actividad lítica de IFN-γ y CD8, Chapoval *et al.*, Nat. Immunol. 2: 269-74 (2001); y (2) la inyección de plásmido de expresión de B7-H3 en tumores de un modelo de linfoma EL-4 dio como resultado regresión completa del 50 % de los tumores, lo que era dependiente de células T CD8+ y células NK. Sin embargo, varios estudios recientes han mostrado un papel inhibidor para esta molécula. Los nulgénicos APC B7-H3^{-/-} muestran un aumento doble de la proliferación de células T alorreactivas en una respuesta de MLR. La activación de células T CD4 por anti CD3 y anti CD28 se inhibió en HLA-DR2 transfectado con una de las formas de B7-H3. Ling *et al.*, Genomics 82: 365-77 (2003). El resultado fue proliferación y producción de IFN-γ, TNF-α, IL-10 y GM-CSF reducidas. La reconsideración de estos estudios podría residir en la existencia de dos receptores para B7-H3 con funciones opuestas, de forma similar a cómo CD28 y CTLA-4 regulan la señalización a través de B7.1 y B7.2.

Como resultado, el bloqueo de la señalización de B7-H3 puede contribuir a potenciar la respuesta inmunitaria contra la infección e inmunidad tumoral cuando se combina con los anticuerpos anti PD-L1 de la invención.

5. B7-H4

La incorporación más reciente a la familia B7 es B7-H4 (B7x, B7-S1, B7-H.5, VTCN1, PRO1291) que es un regulador negativo de las respuestas de células T. Zang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (18), 10388-10392 (2003); Watanabe *et al.*, Nat. Immunol. 4 (7), 670-679 (2003); Prasad, *et al.*, Immunity 18 (6), 863-873 (2003); Sica *et al.*, Immunity 18 (6), 849-861 (2003). B7-H4 tanto humano como de ratón se expresa ampliamente en órganos tanto linfoides (bazo y timo) como no linfoides (incluyendo pulmón, hígado, testículo, ovario, placenta, músculo esquelético, páncreas e intestino delgado). B7-H4 no se detecta en tejidos humanos normales por IHC o regulación de B7-H4 a nivel traduccional. La IHC muestra que B7-H4 se expresa a altos niveles en tumores de pulmón y ováricos, y el análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real indica que B7-H4 de ratón también se expresa a altos niveles en líneas celulares de carcinoma de próstata, pulmón y colon. B7-H4 se une a un receptor aún desconocido en células T activadas, pero no en las indiferenciadas que es distinto del receptor de CTLA-4, ICOS, PD-1 y del receptor de B7-H3. Aunque inicialmente se informó que BTLA era el ligando para B7-H4, la unión indicada de fusiones de B7-H4/Ig a células de tipo silvestre, pero no a BTLA^{-/-} concluye que HVEM, y no BTLA es el único ligando para B7-H4. Sedy *et al.*, Nat. Immunol. 6: 90-98 (2004).

Los estudios con transfectantes de B7-H4 y fusiones de B7-H4/Ig inmovilizadas demuestran que B7-H4 suministra una señal que inhibe la proliferación de células T CD4+ y CD8+ mediada por TCR, progresión del ciclo celular en la fase G0/G1 y producción de IL-2. Sica *et al.*, Immunity 18: 849-61 (2003); Zang *et al.*, PNAS 100: 10388-92 (2003); Prasad *et al.*, Immunity 18: 863-73 (2003). La coestimulación de B7.1 no puede superar la inhibición inducida por B7-H4/Ig. El bloqueo del anticuerpo anti B7-H4 aumentó la proliferación de células T y producción de IL-2 *in vitro*. La administración *in vivo* de anticuerpo anti B7-H4 proporcional a la administración de hemocianina de lapa californiana (KLH) en adyuvante completo de Freund (CFA) condujo a un aumento limitado de la producción de anticuerpo IgM anti KLH y un aumento doble o triple de la proliferación de células T y producción de IL-2 tras reestimulación *in vitro* con KLH, lo que sugiere una mayor sensibilización de células T *in vivo* en presencia de anti B7-H4. El anticuerpo de bloqueo anti B7-H4 aceleró notablemente la aparición y gravedad de EAE en células T CD4+ y CD8+ aumentadas y macrófagos CD11b+ en el cerebro de un modelo de ratón autoinmunitario tratado con anti B7-H4. Los datos experimentales combinados disponibles para B7-H4 sugieren que puede regular negativamente respuestas inmunitarias en tejidos periféricos y desempeñar un papel en la regulación de la tolerancia a células T. La expresión de B7-H4 también puede desempeñar un papel en la evasión de respuestas inmunitarias del huésped en inmunidad tumoral. Choi *et al.*, J. Immunol. 171: 4650-54 (2003). Como resultado, el antagonismo de B7-H4 puede ser útil para potenciar respuesta inmunitaria a infección e inmunidad tumoral cuando se combina con los anticuerpos anti PD-L1 de la invención.

50 6. BTLA:

El miembro de la familia B7 BTLA (CD272, BTLA-1) es funcionalmente similar a PD-1 y CTLA. Inicialmente identificado como un marcador selectivo para células Th1, BTLA se expresa solamente en linfocitos. De forma similar a CTLA-4, ICOS y PD-1, BTLA se induce en células T durante la activación. Sin embargo, a diferencia de ICOS, que permanece elevado en células Th2, pero está regulado negativamente en células Th1, BTLA permanece expresado en células Th1, pero no células Th2. De forma similar a PD-1, BTLA también se expresa en células B. Gavrieli *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comun. 312: 1236-43 (2003). Sin embargo, BTLA se expresa en células B tanto en reposo como activadas, mientras que PD-1 está regulado positivamente en células B activadas. BTLA tiene dos motivos ITIM.

BTLA ejerce efectos inhibidores en linfocitos tanto B como T. Watanabe *et al.*, Nat. Immunol. 4: 670-79 (2003). Las células B BTLA^{-/-} muestran una respuesta moderada a anti IgM, pero una respuesta aumentada a anti CD3 *in vitro*. Las células Th1 BTLA^{-/-} polarizadas muestran un aumento aproximadamente doble de la proliferación en respuesta a exposición a antígeno, *in vitro*. *In vivo*, los ratones BTLA^{-/-} muestran un aumento triple en las respuestas de anticuerpos específicos de hanteno y susceptibilidad potenciada a EAE. El fenotipo de los ratones BTLA^{-/-} se

asemeja al fenotipo de los ratones PD-1^{-/-}, que muestran susceptibilidad aumentada a autoinmunidad, pero fenotipos más sutiles que los ratones CTLA-4^{-/-}. Sin embargo, dado su papel como un regulador negativo, el bloqueo de BTLA puede demostrar ser útil para potenciar la respuesta inmunitaria en infección e inmunidad antitumoral cuando se combinan con los anticuerpos anti PD-L1 de la invención.

5 Resulta interesante que se ha mostrado recientemente que el miembro de la superfamilia Ig BTLA también interacciona con el miembro de la familia TNFR HVEM. Sedy *et al.*, *Nat. Immunol.* 6: 90-98 (2005); Gonzalez *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 1116-1121 (2005). HVEM se revisa posteriormente en Coestimuladoras de la Familia TNFR.

10 E. Coestimuladoras de la Familia TNFR

1. OX40/OX40L (CD134)

15 Los ratones deficientes en OX40 (CD134, TXPG1L, TNFRSF4) y OX40L (CD134L, CD252, GP34, TNFSF4, TXGP1) tienen respuestas de células T CD4+ primarias a antígenos proteicos tanto víricos como comunes y en reacciones de sensibilidad por contacto. Chen *et al.*, *Immunity* 11: 689-6 98 (1999); Kopf *et al.*, *Immunity* 11: 699-708 (1999); Murata *et al.*, *J. Exp. Medicina* 191: 365-374 (2000); Gramaglia *et al.*, *J. Immunol.* 165: 3043-3050 (2000). Se generan frecuencias menores de células T efectoras específicas de antígeno tarde en la respuesta primaria y se desarrollan menos células T de memoria. Gramaglia *et al.*, mencionado anteriormente. A diferencia de células T deficientes en CD27, la proliferación temprana no está alterada en poblaciones de células T CD4+ indiferencias que son deficientes en OX40. Sin embargo, se producen proliferación reducida y muerte celular apoptótica notable 4-5 días después de la activación, con el resultado de que sobreviven pocas células T a largo plazo. Rogers *et al.*, *Immunity* 15: 445-455 (2001). Con células T CD8+ deficientes en OX40, la división celular inicial no se ve afectada, pero la acumulación de células efectoras primarias se ve notablemente reducida 3-6 días después del encuentro con el antígeno. Croft *et al.*, *Nat. Immunol.* 3: 609-620 (2003).

20 La expresión transgénica de OX40L por células dendríticas o células T aumentó el número de células T CD4+ sensibles a antígeno y produce síntomas de tipo autoinmunitario que se asocian con activación de células T aberrante. Brocker *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 29: 1610-1616 (1999); Murata *et al.*, *J. Immunol.* 169: 4628-4636 (2002). Después de la inmunización, la inyección de anticuerpos anti OX40 agonistas da como resultado la acumulación de un mayor número de células T CD4+ sensibles a antígeno en el pico de la respuesta primaria, y una potenciación conjunta en el número de células T de memoria que se generan. Gramaglia *et al.*, mencionado anteriormente, Bansai-Pakala *et al.*, *Nature Med.* 7: 907-912 (2001), Maxwell *et al.*, *J. Immunol.* 164: 107-112 (2000); Weatherill *et al.*, *Cell. Immunol.* 209: 63-75 (2001). Se produce acumulación potenciada de CTL efectores primarios cuando los ratones sensibilizados para antígeno se tratan con anticuerpo agonista específico para OX40. De Smedt *et al.*, *J. Immunol.* 168: 661-670 (2002).

25 Se cree que OX40 proporciona una señal de acción tardía que permite la supervivencia de células efectoras de nueva generación en el pico de la respuesta inmunitaria primaria. También hay buenas pruebas de que OX40 actúa corriente abajo de CD28, además de expresión aumentada de OX40 mediada por señales CD28, el análisis funcional de la deficiencia de CD28 frente a la deficiencia de OX40 ha mostrado que las respuestas de células T primarias tempranas están notablemente alteradas en ausencia de señales CD28, pero solamente se alteran respuestas tardías en ausencia de señales OX40. Rogers *et al.*, *Immunity* 15: 445-455 (2001); Bertram *et al.*, *J. Immunol.* 168: 3777-3785 (2002).

30 45 Como resultado, es probable que la activación de OX40/OX40L, tal como mediante la aplicación de anticuerpos agonistas puede ser útil cuando se combina con los anticuerpos anti PD-L1 de la invención para tratar trastornos disfuncionales de células T.

50 2. 4-1BB (CD137)/4-1BBL,

55 De forma similar a OX40/OX40L, las células T que son deficientes en 4-1BB (CD137, TNFRSF9) y 4-1BBL (TNFSF9), muestran menos células T CD8+ sensibles a antígenos que se acumulan en respuestas primarias cuando 4-1BBL está ausente y se desarrollan menos células T de memoria. DeBenedette *et al.*, *J. Immunol.* 163: 4833-4841 (1999); Tan *et al.*, *J. Immunol.* 163: 4859-4868 (1999); Tan *et al.*, *J. Immunol.* 164: 2320-2325 (2000). Además, el bloqueo de 4-1BBL no altera la respuesta proliferativa inicial de células T CD8+, pero suprime la acumulación de CTL efectores en el pico de la respuesta primaria después de 3-6 días, debido a la apoptosis de células que se han dividido varias veces. Cooper *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 32: 521-529 (2002). Los anticuerpos agonistas anti 4-1BB y APC transfectadas con anti 4-1BBL también han producido resultados similares: las respuestas de CTL y células T CD4+ aumentan notablemente *in vivo*. Melero *et al.*, *Nature Med.* 3: 682-685 (1997); Melero *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 28: 1116-1121 (1998); Takahashi *et al.*, *J. Immunol.* 162: 5037-5040 (1999); Guinn *et al.*, *J. Immunol.* 162: 5003-5010 (1999); Halstead *et al.*, *Nature Immunol.* 3: 536-541 (2002); Takahashi *et al.*, *Immunol. Letón.* 76: 183-181 (2001); Bansal-Pakala *et al.*, *J. Immunol.* 169: 5005-5009 (2002). El anticuerpo específico de 4-1BB no altera la respuesta proliferativa inicial, lo que apoya las conclusiones de los experimentos de bloqueo de 4-1BBL y apunta a la actividad tardía de 4-1BB para proporcionar señales de supervivencia celular.

Como OX40, se cree que 4-1BB proporciona una señal de acción tardía que permite la supervivencia de células efectoras de nueva generación en el pico de la respuesta inmunitaria primaria. También hay buenas pruebas de que 4-1BB actúa más tarde que CD28, además de la expresión aumentada de OX40 y 4-1BB mediada por señales CD28, el análisis funcional de deficiencia de CD28 frente a la deficiencia de 4-1BB ha mostrado que las respuestas de células T primarias tempranas están notablemente alteradas en ausencia de señales CD28, pero solamente las respuestas tardías están alteradas en ausencia de señales OX40. Rogers *et al.*, *Immunity* 15: 445-455 (2001); Bertram *et al.*, *J. Immunol.* 168: 3777-3785 (2002).

El anticuerpo agonista anti CD137 puede inducir regresión tumoral en cáncer en el que CTL CD8+ desempeña un papel central. Melero *et al.*, *Nat. Medicina*. 3: 682-5 (1997); Hirano *et al.*, *Cancer Res.* 65 (3): 1089-96 (2005). La expresión constitutiva e inducible de PD-L1 confiere resistencia a dichos tumores, que es reversible tras el bloqueo de PD-L1. Hirano *et al.*

Como resultado, es probable que la activación de 4-1BB/4-BBL, tal como mediante la aplicación de anticuerpos agonistas, particularmente en combinación con antagonistas de PD-L1 (por ejemplo, anticuerpo anti PD-L1) puede ser útil para tratar trastornos disfuncionales de células T.

3. CD27/CD27L (CD70)

La importancia de la señalización de CD27 (TNFRSF7, S152) y CD27L (CD70, TNFSF7) en los estadios iniciales de una respuesta de células T se ha demostrado en estudios de bloqueo *in vitro*, en los que se alteraron las interacciones de CD27/CD70. Oshima *et al.*, *Int. Immunol.* 10: 517-526 (1998); Agematsu *et al.*, *J. Immunol.* 153: 1421-1429 (1994); Hintzen *et al.*, *J. Immunol.* 154: 2612-2623 (1995). Las células T que carecen de CD27 se dividen inicialmente de forma normal, pero después proliferan poco 3 o más días después de la activación. Hendriks *et al.*, *Nature Immunol.* 1: 433-440 (2000). Esto indica que CD27 participa en la promoción de la expansión inicial de la población de células T indiferenciadas, ya sea mediante supresión temprana de la muerte de las células T o actuando sobre el ciclo celular para permitir una división sostenga 2-3 días después de la activación. Esto se refuerza por estudios *in vivo* de ratones deficientes en CD27, en los que se desarrollan números menores de respuestas específicas de antígeno (días 4-8) y menos células T de memoria durante 3 o más semanas. Hendriks *et al.*, mencionado anteriormente. La expresión de CD27 está regulada positivamente temprano después de la activación de células T, lo que sugiere que suministra principalmente señales que mantienen la proliferación temprana, antes del pico de la respuesta efectora.

Como resultado, es probable que la activación de CD27/CD27L, incluyendo mediante la aplicación de anticuerpos agonistas, particularmente en combinación con los anticuerpos anti PD-L1 descritos en el presente documento, pueda ser útil para tratar trastornos disfuncionales de células T.

4. CD30/CD30L (CD153)

La señalización de CD30 (TNFRSF8, Ki-1) y CD30L (CD153, TNFSF8) es coestimuladora para varias funciones de células T *in vitro*. Del Prete *et al.*, *J. Exp. Medicina*. 182: 1655-1661 (1995), Bowen *et al.*, *J. Immunol.* 156: 442-449 (1995). Los reactivos de bloqueo para CD30L suprimieron el desarrollo de células Th2 y potenciaron el desarrollo de células Th1 *in vitro*. Esta actividad está de acuerdo con los datos que muestran que CD30 se expresa preferentemente por células Th2 y células Tc2 citotóxicas de tipo 2. Del Prete *et al.*, mencionado anteriormente, Nakamura *et al.*, *J. Immunol.* 158: 2090-2098 (1996). CD30 se expresa 3-4 días después de la activación de células T indiferenciadas en respuestas primarias no polarizadas. Nakamura *et al.*, mencionados anteriormente, indican que su papel no se restringe a respuestas dominadas por citocinas de tipo 2.

Aunque los mecanismos exactos de la señalización de CD30/CD30L no están claros, se ha sugerido que podrían ser similares a OX40 y 4-1BB. Cuando se transfieren células T CD8+ específicas de antígeno transferidas de forma adoptiva a ratones deficientes en CD30L, estas no se acumulan en grandes números en el pico de una respuesta primaria, y se desarrollan menos células T de memoria. Como resultado, CD30 podría proporcionar también señales de proliferación y/o supervivencia para permitir la generación de altos números de células T específicas de antígeno en el pico de respuestas primarias.

Como resultado, es probable que la activación de CD27/CD27L, incluyendo mediante la aplicación de anticuerpos agonistas, particularmente en combinación con los anticuerpos anti PD-L1 descritos en el presente documento, pueda ser útil para tratar trastornos disfuncionales de células T.

5. HVEM/LIGHT

El efecto de HVEM (HVEA, ATAR, LIGHTR, TNFRSF14, PRO509) y LIGHT (CD258, HVEML, TR2, TNFSF14, PRO726) en la coestimulación de células T está complicado por 1) la capacidad de LIGHT para unirse también con el receptor de linfotoxina β (LT β R) y 2) HVEM para unirse con LT α soluble. Por lo tanto, cualquier estudio sobre el efecto de HVEM/LIGHT debería tener en cuenta también el efecto de otros compañeros de unión para este sistema de señalización. El bloqueo de LIGHT puede inhibir la proliferación de células T temprana y la secreción de citocinas

en reacciones mixtas de linfocitos (MLR, *mixed-lymphocyte reactions*) alogénicos. Tamada *et al.*, J. Immunol. 164: 4105-4110 (2000), Kwon *et al.*, J. Biol. Chem. 272: 14272-14276 (1997); Harrop *et al.*, J. Immunol. 161: 1786-1794 (1998); Tamada *et al.*, Nature Med. 6: 283-289 (2000). La producción de citocinas proinflamatorias se suprime cuando se bloquea LIGHT en aloinjertos de corazón con MHC desapareado. Ye *et al.*, J. Exp. Medicina. 195: 795-800 (2002). Además, se rechazan injertos de piel alogénicos con cinética retardada en receptores que son deficientes tanto para LIGHT como para CD28. Scheu *et al.*, J. Exp. Medicina. 195: 1613-1624 (2002). Se sugiere que el rechazo de injerto retardado podría indicar una supresión temprana de la expansión clonal de células T o la producción de citocinas. Esta conclusión está reforzada por (i) estudios *in vitro* que muestran que los esplenocitos deficientes en LIGHT que responden a aloantígeno tienen producción reducida de citocinas tanto TH1 como TH2 y generación débil de actividad de linfocitos T citotóxicos (CTL) [Sheu *et al.*, mencionados anteriormente] y (ii) estudios *in vivo* que muestran que el bloqueo de LIGHT reduce la generación de CTL alorreactivos. Tamada *et al.*, Nature Med. 6: 283-289 (2000).

Como resultado, el HVEM/LIGHT, tal como mediante la aplicación de anticuerpos agonistas, particularmente en combinación con los anticuerpos anti PD-L1 descritos en el presente documento, puede ser útil para tratar trastornos disfuncionales de células T.

II. Definiciones

Un “alérgeno” o “inmunógeno” es cualquier molécula que puede desencadenar una respuesta inmunitaria. Como se usa en el presente documento, el término abarca la molécula antigénica en sí misma, o su fuente tal como grano de polen, caspa animal, veneno de insectos o producto alimentario. Este se diferencia del término *antígeno*, que se refiere a una molécula que puede reconocerse específicamente por una inmunoglobulina o receptor de células T. Cualquier sustancia exógena capaz de inducir una respuesta inmunitaria es un alérgeno potencial. Se sabe que muchos productos químicos diferentes de origen tanto natural como sintético son alergénicos. Los productos químicos orgánicos naturales complejos, especialmente proteínas, tienen probabilidades de provocar alergia mediada por anticuerpos, mientras que los compuestos orgánicos sencillos, compuestos químicos inorgánicos y metales causan más preferentemente alergia mediada por células T. En algunos casos, el mismo alérgeno puede ser responsable de más de un tipo de alergia. La exposición al alérgeno puede ser mediante inhalación, inyección o contacto cutáneo.

“Disfunción” en el contexto de la disfunción inmunitaria, se refiere a un estado de sensibilidad inmunitaria reducida a estimulación antigénica. El término incluye los elementos comunes de agotamiento y/o anergia en los que puede producirse reconocimiento de antígenos, pero la respuesta inmunitaria consiguiente es ineficaz para controlar la infección o el crecimiento tumoral.

“Tolerancia” o “tolerancia inmunológica” es el fracaso del sistema inmunitario para generar una respuesta inmunitaria defensiva a un antígeno particular. La tolerancia puede ser natural o propia, en la que el cuerpo no ataca sus propias proteínas y antígenos, o puede inducirse, resultando de la manipulación del sistema inmunitario. Se produce *tolerancia central* durante el desarrollo de linfocitos y actúa en el timo y la médula ósea. Durante este proceso, los linfocitos T y B que reconocen antígenos propios se suprime antes de desarrollarse a células completamente inmunocompetentes. Este proceso es más activo durante el desarrollo fetal, pero continúa durante toda la vida a medida que se generan linfocitos inmaduros. La *tolerancia de células T periféricas* se refiere a una insensibilidad funcional a autoantígenos que están presentes en tejidos periféricos, y se produce después de que células T y B maduren y entren en la periferia. Estos procesos incluyen la supresión de células autorreactivas por células T “reguladoras” y la generación de hiposensibilidad (anergia) en linfocitos que encuentran antígenos en ausencia de señales coestimuladoras que acompañan a inflamación. “Tolerancia inducida” o “adquirida” se refiere a la adaptación del sistema inmunitario a antígenos externos caracterizados por ausencia de reactividad específica de los tejidos linfoideos a un antígeno dado que en otras circunstancias probablemente induciría inmunidad mediada por células o humorales. En adultos, la tolerancia puede inducirse clínicamente por administración repetida de dosis muy grandes de antígeno, o de dosis pequeñas que están por debajo del umbral requerido para la estimulación de una respuesta inmunitaria, tal como mediante administración intravenosa o sublingual de antígenos solubles. La inmunosupresión también facilita la inducción de tolerancia. La degradación de la autotolerancia puede conducir a *autoinmunidad*.

“Potenciación de la función de células T” significa inducir, provocar o estimular que una célula T tenga una función biológica sostenida o amplificada, o renovar o reactivar células T agotadas o inactivas. Los ejemplos de potenciación de la función de células T incluyen: secreción aumentada de interferón y de células T CD8+, proliferación aumentada, sensibilidad a antígenos aumentada (por ejemplo, eliminación vírica o patógena) en relación con dichos niveles antes de la intervención. El nivel de potenciación puede ser de al menos el 50 %, como alternativa 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 120 %, 150 %, 200 %. Un experto en la materia conoce cómo medir esta potenciación.

Un “trastorno disfuncional de células T” es un trastorno o una afección de células T caracterizado por sensibilidad reducida a estimulación antigénica. Un trastorno disfuncional de células T puede ser un trastorno que se asocia específicamente con señalización aumentada inapropiada mediante PD-1. El trastorno disfuncional de células T puede ser uno en el que las células T sean anérgicas o tengan una capacidad reducida para secretar citocinas, proliferar o ejecutar la actividad citolítica. En un aspecto específico, la sensibilidad reducida da como resultado

control ineficaz de un patógeno o tumor que expresa un inmunógeno. Los ejemplos de trastornos disfuncionales de células T caracterizados por disfunción de células T incluyen infección aguda no resuelta, infección crónica e inmunidad tumoral.

- 5 La “*infección crónica*” se refiere a una infección en la que un agente infeccioso (por ejemplo, patógenos tales como virus, bacterias, parásitos protozoarios, hongos o similares) tiene inducida una respuesta inmunitaria en el hospedador infectado, pero no se ha eliminado o apartado de ese hospedador como durante una *infección aguda*. Las infecciones crónicas pueden ser *persistentes*, *latentes* o *lentas*. Aunque las infecciones agudas se resuelven normalmente por el sistema inmunitario en un periodo de algunos días o semanas (por ejemplo, gripe), las *infecciones persistentes* pueden persistir a un nivel relativamente bajo durante meses, años, décadas o toda la vida (por ejemplo, Hepatitis B). Por el contrario, una *infección latente* se caracteriza por un periodo largo de actividad asintomática puntuado por un periodo de infección de alto grado rápidamente creciente y niveles de patógenos elevados (por ejemplo, herpes simple). Finalmente, una infección lenta es una caracterizada por un aumento gradual y continuo de síntomas de enfermedad, tal como un periodo largo de incubación seguido de un ciclo clínico prolongado y progresivo que comienza después de la aparición de los síntomas clínicos. A diferencia de las infecciones latentes y persistentes, la infección lenta puede no comenzar con un periodo agudo de multiplicación vírica (por ejemplo, infección por picornavirus, visnavirus, tembladera, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob). Los agentes infecciosos ilustrativos capaces de inducir una infección crónica incluyen virus (por ejemplo, citomegalovirus, virus de Epstein Barr, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus del herpes simple, tipos I y II, virus de la inmunodeficiencia humana, tipos 1 y 2, papilomavirus humano, virus linfotrópico T humano, tipos 1 y 2, virus de la varicela zóster y similares), bacterias (por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria* spp., *Klebsiella pneumonia*, *Streptococcus pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Borrelia* spp., *Helicobacter pylori* y similares), parásitos protozoarios (por ejemplo, *Leishmania* spp., *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma* spp., *Toxoplasma* spp., *Trypanosoma* spp., *Taenia carssiceps* y similares) y hongos (por ejemplo, *Aspergillus* spp., *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Pneumocystis carinii* y similares). Los agentes infecciosos adicionales incluyen priones o proteínas plegadas erróneamente que afectan al cerebro o a la estructura neuronal propagando adicionalmente el plegamiento erróneo de las proteínas en estos tejidos, lo que da como resultado la formación de placas amiloides que provocan la muerte celular, daño tisular y con el tiempo la muerte. Los ejemplos de enfermedades resultantes de infección por priones incluyen: enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y sus variedades, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), insomnio familiar letal (sFI), kuru, tembladera, encefalopatía espongiforme bovina (EEB) en vacas (también conocida como enfermedad “de las vacas locas”) y diversas otras formas animales de encefalopatía [por ejemplo, encefalopatía del visón transmisible (TME), caquexia crónica (CWD) en ciervo de cola blanca, alce y ciervo mulo, encefalopatía espongiforme felina, encefalopatía ungulada exótica (EUE) en niala, Oryx y gran kudú, encefalopatía espongiforme del aveSTRUZ].
- 35 La “*inmunidad tumoral*” se refiere al proceso en el que los tumores evitan el reconocimiento inmunitario y su eliminación. Por lo tanto, como concepto terapéutico, la inmunidad tumoral se “trata” cuando se atenúa dicha evasión, y los tumores son reconocidos y atacados por el sistema inmunitario. Los ejemplos de reconocimiento de tumores incluyen unión a tumor, encogimiento del tumor y eliminación de tumor.
- 40 Un “*antagonista coestimulador B7 negativo*” (“BNCA”, *B7-negative costimulatory antagonist*) es un agente que reduce, bloquea, inhibe, anula o interfiere con, la señal coestimuladora negativa mediada por o a través de proteínas de la superficie celular expresadas en linfocitos T mediada por un miembro de la familia B7. En un aspecto, un BNCA puede solo, o en combinación con los anticuerpos anti PD-1 de la invención, hacer que una célula T disfuncional deje de serlo. En otro aspecto, un BNCA puede ser un agente que inhibe la síntesis de ácidos nucleicos o proteínas, la expresión, la señalización y/o el procesamiento posterior a la expresión de una molécula coestimuladora B7 negativa. En otro aspecto más, un BNCA es un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, oligopeptido de BNCA, ARNi de BNCA o molécula pequeña de BNCA que reduce, bloquea, inhibe, anula o interfiere con, la transducción de señal por una molécula coestimuladora B7 negativa. Las moléculas coestimuladoras B7 negativas ilustrativas incluyen: CTLA-4, PD-L1, PD-1, B7.1 (expresado en células T), PD-L2, B7-H3 y B7-H4.
- 45 Un *agonista coestimuladora positivo* es una molécula que aumenta, potencia, mejora o facilita una señal coestimuladora mediada por o a través de proteínas de superficie celular expresadas en linfocitos T. En un aspecto, una molécula coestimuladora positiva puede ser un dominio extracelular, una construcción soluble o un anticuerpo agonista que activa una ruta coestimuladora positiva. Las moléculas coestimuladoras positivas ilustrativas incluyen las moléculas de la superfamilia B7, por ejemplo, B7.1, B7.2, CD28 e ICOS/ICOSL. Los ejemplos adicionales incluyen las moléculas coestimuladoras de la familia TNFR, por ejemplo, OX40/OX40L, 41-BB/41-BBL, CD27/CD27L, CD30/CD30L y HVEM/LIGHT.
- 55 50 Una “*molécula pequeña*” o “*molécula orgánica pequeña*” es una que tiene un peso molecular por debajo de aproximadamente 500 Dalton.
- 55 Una “*ARN de interferencia*”, “*ARNi*” es ARN de 10 a 50 nucleótidos de longitud que reduce la expresión de un gen diana, en el que partes de la cadena son suficientemente complementarias (por ejemplo, que tienen al menos 80 % de identidad con el gen diana). El método de interferencia de ARN se refiere a la supresión específica de diana de la expresión génica (es decir, “silenciamiento génico”), que se produce en un nivel postranscripcional (por ejemplo,

traducción), e incluye todos los mecanismos postranscripcionales y transcripcionales de inhibición mediada por ARN de la expresión génica, tales como los descritos en P.D. Zamore, *Science* 296: 1265 (2002) y Hannan y Rossi, *Nature* 431: 371-378 (2004). Como se usa en el presente documento, ARNi puede estar en forma de ARN de interferencia pequeño (ARNip), ARN en horquilla corto (ARNhp) y/o micro ARN (miARN). Dichas moléculas de ARNi son con frecuencia complejos de ARN bicatenarios que pueden expresarse en forma de cadenas de ARN complementarias o parcialmente complementarias separadas. En la técnica se conocen bien métodos para diseñar complejos de ARN bicatenarios. Por ejemplo, en Sandy *et al.*, *BioTechniques* 39: 215-224 (2005) puede encontrarse información acerca del diseño y la síntesis adecuados de ARNhP y ARNip.

- 5 10 Un "ARN de *interferencia pequeño*" o ARNip es un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc) de 10 a 50 nucleótidos de longitud que reduce la expresión de un gen diana, en el que partes de la primera cadena son suficientemente complementarias (por ejemplo, que tienen al menos 80 % de identidad con el gen diana). Los ARNip se diseñan específicamente para impedir la respuesta antivírica caracterizada por síntesis de interferón elevada, inhibición de síntesis proteica no específica y degradación de ARN que da como resultado con frecuencia suicidio o muerte de la célula asociado con el uso de ARNi en células de mamífero. Paddison *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (3): 1443-8. (2002).

15 20 El término "horquilla" se refiere a una estructura de ARN en bucle de 7-20 nucleótidos. Un "ARN en horquilla corto" o ARNhP es un ARN monocatenario de 10 a 50 nucleótidos de longitud caracterizado por una vuelta en horquilla que reduce la expresión de un gen diana, en el que partes de la cadena de ARN son suficientemente complementarias (por ejemplo, que tienen al menos 80 % de identidad con el gen diana). La expresión "tallo-bucle" se refiere a un emparejamiento entre dos regiones del mismo par de bases molecular para formar una doble hélice que termina en un bucle no emparejado corto, dando una estructura en forma de piruleta.

- 25 30 Un "micro ARN" o "miARN" (previamente conocido como ARNtp) es un ARN monocatenario de aproximadamente 10 a 70 nucleótidos de longitud que se transcribe inicialmente como pre miARN caracterizado por una estructura de "tallo-bucle", que posteriormente se procesa en miARN maduro después de procesamiento adicional a través del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC).

35 35 Un "ARN de *interferencia de BNCA*" o "ARNi de BNCA" se une, preferentemente de forma específica, con un ácido nucleico de BNCA y reduce su expresión. Esto significa que la expresión de la molécula coestimuladora B7 negativa es menor con el ARNi de BNCA presente en comparación con la expresión de la molécula coestimuladora B7 negativa en un control en el que no está presente ARNi de BNCA. El ARNi de BNCA puede identificarse y sintetizarse usando métodos conocidos (Shi Y., *Trends in Genetics* 19 (1): 9-12 (2003), documentos WO2003056012, WO2003064621, WO2001/075164, WO2002/044321).

40 40 Un "oligopéptido de BNCA" es un oligopéptido que se une, preferentemente de forma específica, con un polipéptido coestimuladora B7 negativo, incluyendo un receptor, ligando o componente de señalización, respectivamente, como se describe en el presente documento. Dichos oligopéptidos pueden sintetizarse químicamente usando metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o pueden prepararse y purificarse usando tecnología recombinante. Dichos oligopéptidos son habitualmente de al menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 aminoácidos de longitud o más. Dichos oligopéptidos pueden identificarse sin experimentación indebida usando técnicas bien conocidas. A este respecto, se observa que las técnicas para explorar bibliotecas de oligopéptidos con respecto a oligopéptidos que sean capaces de unirse específicamente con una diana polipeptídica se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos n.º 5.556.762, 5.750.373, 4.708.871, 4.833.092, 5.403.484, 5.571.689, 5.663.143, la Publicación de PCT n.º WO 84/03506 y WO84/03564, Geysen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 3998-4002 (1984), Geysen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 178-182 (1985), Geysen *et al.*, en *Synthetic Peptides as Antigens*, 130-149 (1986); Geysen *et al.*, *J. Immunol. Meth.*, 102: 259-274 (1987); Schoofs *et al.*, *J. Immunol.*, 140: 611-616 (1988), Cwirla, S. E. *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6378 (1990); Lowman, H. B. *et al.* *Biochemistry*, 30: 10832 (1991); Clackson, T. *et al.* *Nature*, 352: 624 (1991); Marks, J. D. *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991); Kang, A. S. *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 8363 (1991), y Smith, G. P., *Current Opin. Biotechnol.*, 2:668 (1991).

55 60 Una "molécula pequeña de BNCA antagonista" o "molécula pequeña de BNCA" es una molécula orgánica distinta de un oligopéptido o anticuerpo como se define en el presente documento que inhibe, preferentemente de forma específica, un polipéptido coestimuladora B7 negativo. Dicha inhibición de señalización coestimuladora B7 negativa preferentemente hace a una célula T disfuncional sensible a la estimulación antigenica. Pueden identificarse moléculas pequeñas de BNCA ilustrativas y sintetizarse químicamente usando una metodología conocida (véase, por ejemplo, Publicaciones de PCT n.º WO2000/00823 y WO2000/39585). Dichas moléculas pequeñas de BNCA tienen habitualmente un tamaño de menos de aproximadamente 2000 Dalton, como alternativa de menos de aproximadamente 1500, 750, 500, 250 o 200 Dalton, son capaces de unirse, preferentemente de forma específica, con un polipéptido estimulante B7 negativo como se describe en el presente documento, y pueden identificarse sin experimentación indebida usando técnicas bien conocidas. A este respecto, debe observarse que se conocen bien en este campo técnicas para explorar bibliotecas de moléculas orgánicas con respecto a moléculas que sean

capaces de unirse con una diana polipeptídica (véase, por ejemplo, Publicaciones de PCT n.º WO00/00823 y WO00/39585).

El término "antibiótico" incluye cualquier molécula que inhiba o anule específicamente el crecimiento de microorganismos, tales como virus, bacterias, hongos o protozoos, pero no es letal para el hospedador al intervalo de concentración y dosificación administrado. Como se usa en el presente documento, el término *antibiótico* incluye agente antibacteriano, agente antivírico, agente antifúngico y agente antiprotozoario. En un aspecto específico, un antibiótico no es tóxico para el hospedador a los intervalos de concentración y dosificación administrados. Los *antibióticos antibacterianos* o *antibacterianos* pueden clasificarse en general como bactericidas (es decir, ocasionan directamente la muerte) o bacteriostáticos (es decir, impiden la división). Los antibióticos antibactericidas pueden subclasicarse adicionalmente como de espectro estrecho (es decir, solamente afectan a una clase pequeña de subconjunto de bacterias, por ejemplo, gram negativos, etc.) o de amplio espectro (es decir, afecta a una clase amplia). Los ejemplos de antibióticos incluyen: (i) aminoglucósidos, por ejemplo amicacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, estreptomicina, tobramicina, paromicina, (ii) ansamicinas, por ejemplo, geldanamicina, herbimicina, (iii) carbacefemos, por ejemplo, loracarbef, (iv) carbapenemos, por ejemplo, ertapenem, doripenem, inipenem/cilastatina, meropenem, (v) cefalosporinas (primera generación), por ejemplo, cefadroxilo, cefazolina, cefalotina, cefalexina, (vi) cefalosporinas (segunda generación), por ejemplo cefaclor, cefamandol, cefoxitina, cefprozilo, cefuroxima, (vi) cefalosporinas (tercera generación), por ejemplo, cefixima, cefdinir, cefditoren, cefoperazona, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima, ceftibuteno, ceftrizoxima, ceftriaxona, (vii) cefalosporinas (cuarta generación), por ejemplo, cefepima, (viii) cefalosporinas (quinta generación), por ejemplo, ceftobiprol, (ix) glicopéptidos, por ejemplo, teicoplanina, vancomicina, (x) macrólidos, por ejemplo, axitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina, troleandomicina, telitromicina, espectinomicina, (xi) monobactamos, por ejemplo, axtreonam, (xii) penicilinas, por ejemplo amoxicilina, ampicilina, axlocilina, carbenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, mezlocilina, meticilina, nafcilina, oxacilina, penicilina, peperacilina, ticarcilina, (xiii) polipéptidos antibióticos, por ejemplo, bacitracina, colistina, polimixina B, (xiv) quinolonas, por ejemplo, ciprofloxacina, enoxacina, gatifloxacina, levofloxacina, lemefloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, orfloxacina, trovafloxacina, (xv) sulfonamidas, por ejemplo, mafenida, prontosil, sulfacetamida, sulfametizol, sulfanilamida, sulfasalazina, sulfisoxazol, trimetoprim, trimetoprim-sulfametoxzol (TMP-SMX), (xvi) tetraciclinas, por ejemplo, demeclociclina, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina y (xvii) otros tales como arspenamina, cloranfenicol, clindamicina, lincomicina, etambutol, fosfomicina, ácido fusídico, furazolidona, isoniazida, linezolida, metronidazol, mupirocina, nitrofurantoína, platsensimicina, pirazinamida, quinupristina/dalfopristina, rifampina/rifampicina o tinidazol.

La expresión "agente antivírico" incluye cualquier molécula que inhiba o anule el crecimiento, la morbilidad y/o la supervivencia de virus. Esto incluye fármacos antirretrovíricos tales como (1) **inhibidores de transcriptasa inversa** incluyendo por ejemplo: (a) *inhibidores de transcriptasa inversa de análogos de nucleósidos* (NRTI) (por ejemplo, aciclovir/acyclovir (ZOVIRAX®, ZOVIR®), cidofovir, azidotimidina/zidovudina (AZT, RETROVIR®), didanosina (ddI, VIDEX®, zalcitabina (ddC, HIVID®); estavudina (d4T, ZERIT®, lamivudina (3TC, EPIVIR®); abacavir (ZIAGEN®); emtricitabina (EMTRIVA®); brivudina (HELPIN®); entecavir (BARACLUDE®); idoxuridina; viramidina (taribavirina de Valeant Pharmaceuticals), inhibidor de polimerasa de análogos de nucleósido citidina PCI-6130 y variantes de profármacos (por ejemplo, R7128) de Pharmasset/Roche; inhibidor de análogos de nucleósidos de Merck/Isis Pharmaceuticals-MK-0608, (b) *inhibidores de transcriptasa inversa de análogos de nucleótidos* (NtRTI) (por ejemplo, tenofovir (VIRE-AD®); adefovir (PREVEON®, HEPSEVA®); fomivirsen (VITRAVENE®); (c) *inhibidores de transcriptasa inversa distintos de nucleósidos* (NNRTI), efavirenz (SUSTIVA®, STOCRIN®); nevirapina (VIRAMUNE®), delavirdina (RESCRIPTOR®), etravirina (INTELENCE®), lovirida; inhibidor no nucleosídico de ARN polimerasa dependiente de ARN de VHC de ViroChem Pharma-VCH-759, inhibidor no nucleosídico del inhibidor de la polimerasa del VHC de Pfizer-PF-868554; y (d) *inhibidores de polimerasa*, incluyendo: ARN polimerasa dependiente de ARN del virus de la hepatitis C de Boehringer Ingelheim-BILB-1941, inhibidor de ARN polimerasa de Roche-R1626; ACH-0137171 un inhibidor de replicasa de Achillion Pharmaceuticals, R7128-inhibidor de polimerasa de Roche/Pharmasset, ABT-333 y ABT-072-inhibidores de polimerasa de Abbott, BI 207127-inhibidor de polimerasa de Boehringer Ingelheim, PSI-7851-inhibidor de polimerasa de Pharmasset, ANA598-inhibidor de polimerasa de Anadys Pharmaceuticals, MK-3281-inhibidor de polimerasa de Merck, IDX184-inhibidor de polimerasa de Idenix, GSK 625433-inhibidor de polimerasa de Glaxo Smith Kline, INX-189-inhibidor de polimerasa de Inhibitex, NM283-inhibidor de polimerasa de Idenix, HCV796-inhibidor de polimerasa de Wyeth, GL60667 y GS9190-inhibidores de polimerasa de Gilead, inhibidor de polimerasa PF-00868554 0 de Pfizer, VCH759, VCH916, VX222 y VX759-inhibidores de polimerasa de Virochem, IDX184 e IDX375-inhibidores de polimerasa de Idenix, BMS650032-inhibidor de polimerasa de Bristol Myers Squibb; (2) **inhibidores de proteasa** incluyendo por ejemplo: saquinavir (FOROVASE®/INVIRASE®), ritonavir (NORVIR®), indinavir (CRIXIVAN®), nelfinavir (VIRACEPT®), amprenavir (AGENERASE®), lopinavir (KALETRA®), atazanavir (REYATAZ®), fosamprenavir (LEXIVA®), tipranavir (APTIVUS®), darunavir (PREZISTA®), telaprevir (VX-950); los inhibidores de proteasa del VHC de segunda generación de Vertex Pharmaceuticals-VX-500 y VX-813; el inhibidor de proteasa NS3/4A de Intermune/Roche-ITMN-191/R-7227, boceprevir, el inhibidor de proteasa de Schering-Plough -SCH 503034, el inhibidor de proteasa NS3/4A del VHC de Medivir/Tibotec-TMC435/TMC435350, el inhibidor de proteasa de ACH-1625 de Achillion Pharmaceuticals, ACH-806-inhibidor de proteasa de Achillion/Gilead, BI201335 and BILN 2061-inhibidores de proteasa de Boehringer Ingelheim, SCH 900518/SP900518 (narlaprevir)-inhibidor de proteasa de Schering-Plough, MK-7009-inhibidor de proteasa de Merck, BMS-650032, BMS-790052 and BMS-791325-inhibidores de proteasa de Bristol Myer Squibb,

R7227-inhibidor de proteasa de Roche, PHX1766-inhibidor de proteasa de Phenomix, AVL-181-inhibidor de proteasa de Avila Therapeutics, biliverdina, CTS-1027-inhibidor de proteasa de Roche Biosciences, VX985-inhibidor de proteasa de Vertex, VCH-759 y VCH-917 -inhibidores de proteasa de Virochem/Vertex, IDX-136 y 316-inhibidores de proteasa de Idenix, ABT-450-inhibidor de proteasa de Abbott, VBY 376-inhibidor de proteasa de Virobay; (3) **inhibidores de integrasa** incluyendo por ejemplo: raltegravir (ISENT-RESS[®]), elvitegravir; (4) terapias combinadas de inhibidores de análogos de nucleótidos/análogos de nucleósidos, atripla (tenofovir + embricitabina + efavirenz), combivir (lamivudína + zidovudina), (5) **inhibidores de entrada o fusión** incluyendo por ejemplo: maraviroc, enfuvirtida, docosanol, anticuerpo anti CD4, anticuerpo anti gp120, anticuerpo anti CCR5, antagonistas de NS5a del VHC: (a) A-831, A-689 y AZD 2836 de Arrow Therapeutics, (b) BMS-790052 y BMS-824393 de Bristol Myers Squibb, (c) GSK-625433 de Glaxo Smith Kline, (d) antagonistas de NS4a ACH-1095; (5) **inhibidores de la maduración** incluyendo por ejemplo: bevirimat y vivecon; (6) **inhibidores de liberación vírica** incluyendo por ejemplo: zanamivir (RELENZA[®]), oseltamivir (TAMIFLU[®]), arbidol; (7) **potenciadores de la respuesta inmunitaria**, incluyendo por ejemplo interferón- α (por ejemplo, BLX-883 y BLX 883 CR de Biolex Therapeutics, belerofon de Nautilus Biotech, IFN- α de acción larga, IFN- α SR de LG Life Sciences, IFN- α 2b CR de acción larga e IFN- α 2b XL de Flamel Technologies, IFN- α pegilado (por ejemplo, PEG-IFN- α -2a, PEGASYS[®], PEG-IFN- α -2b, PEGINTRON[®]), proteína de fusión de albúmina de suero Humano-IFN- α 2b (ALBUFERON[®]); interferón β , incluyendo IFN- β -1b (BETASERON[®]), interferón γ , interferón λ , interferón λ pegilado (por ejemplo, PEG-rIL-29 de ZymoGenetics/Novo Nordisk), interferón ω /interferón de leucocitos II (por ejemplo, Intarcia Therapeutics), agonistas de receptor de tipo toll 7 incluyendo imiquimod, isatoribina y variantes profarmacológicas de los mismos (por ejemplo, ANA-975 y ANA-971) de Anadys Pharmaceuticals, oglufanida (IM862, L-Glu-L-Trp-OH) y variantes lípido o glucosil conjugadas de los mismos de Implicit Bioscience, NOV-205 (por ejemplo, Molixan[®]-un antivírico peptídico de Novelos Therapeutics, Inc.), el antivírico EHC18 de Enzo Biochem, gamma-D-glutamil-L-triptófano (por ejemplo, SCV-07, SciClone Pharmaceuticals/Verta), aloferón (por ejemplo, aloferón-1-HGVSGHGQHGVBHG, aloferón-2-GVSGHGQHGVBHG), CPG 10101-un agonista de TLR-9 de Coley Pharmaceuticals/Actilon; (8) **potenciadores sinérgicos antivíricos**, es decir, pocas o ninguna propiedades antivíricas solas, pero que potencian el efecto de otros antivíricos, por ejemplo, cloroquina, zumo de pomelo, hidroxiurea, leflunomida, ácido micofenólico, resveratrol, ritonavir; así como otros fármacos antivíricos tales como amantadina, edoxudina, famciclovir (FAMVIR[®]), penciclovir, fascarnet, fosfonet, ganciclovir (CYTOVENE[®], CYMEVENE[®], VITRASERT[®]), gardsil, ibacicatina, imunovir, moroxidina, nexavir, peramivir, pleconaril, podofilotoxina, ribavirina, rimantadina, trifluridina, trizivir, tromantadina, truvada, valaciclovir, valganciclovir, vidarabina y potenciadores de interferón tales como EMZ702 de Transition Therapeutics, dclorhidrato de histamina (por ejemplo, Ceplene[®] + IFN- α); y (9) **antivíricos diversos o no clasificados** tales como: KPE-02003002 (Artenimol) de Kemin Pharmaceuticals, mitoquinona un agonista antioxidante de coenzima Q10 de Antipodean Pharmaceuticals, inhibidores de alfa-glucosidasa I (por ejemplo, MX-3253- celgosivir de Migenix Pharmaceuticals, castanospermina, antagonistas de glucocorticoides (por ejemplo, inhibidores de IRES del VHC, mifepristona, VGX-410C de VGX Pharmaceuticals), agonistas hepáticos (por ejemplo, PYN17 de Phynova Pharmaceuticals), agentes antivíricos derivados de terapias herbales tradicionales, por ejemplo, PYN18 de Phynova Pharmaceuticals, inhibidores de caspasa (por ejemplo, LB-84451-de LG Life Sciences, emricasan-PF-03491390/IDN-6556 de Pfizer), análogos de ciclosporina que inhiben la replicación vírica evitando la unión con ciclofilina A (por ejemplo, SDZ NIM 911 de Novartis, Debio-025 de Debiopharm).

40 La expresión “*agente antifúngico*” incluye cualquier molécula que inhiba o anule el crecimiento, la morbilidad y/o la supervivencia de hongos. Esto incluye por ejemplo, (1) antifúngicos de polieno tales como natamina, rimocidina, filipina, nistatina, anfotericina B, candicina; (2) imidazoles tales como miconazol, ketoconazol (LOTRIMIN[®]), econazol, bifonazol, butoconazol, fenticonazol, isoconazol, oxiconazol, sertaconazol (ERTACZO[®]), sulconazol, tioconazol, (3) triazoles tales como fluconazol, itraconazol, isavuconazol, raviuconazol posaconazol, voriconazol, terconazol; (4) alilaminas tales como terbinafina (LAMISIL[®]), amorolfina, naftifina (Naftin[®]), butenafina (LOTRIMIN ULTRA[®]); (5) equinocandinas, tales como anidulafungina, caspofungina, micafungina y otras sustancias con propiedades antifúngicas tales como ácido benzoico, ciclopix, flucitosina, griseofulvina, violeta genciana, haloprogina, tolnaftato (TINACTIN[®], DESENEX[®], AFTATE[®]), ácido undecilénico, aceite del árbol del té-ISO 4730 (Aceite de Melaleuca, tipo Terpinen-4-ol) aceite de citronela, hierba limón, aceite de naranja, aceite de palmarosa, pachulí, mirto limón, aceite de semilla de neem, aceite de coco.

55 La expresión “*agente antiprotozoario*” o “*agente antiprotozoos*” incluye cualquier molécula que inhiba o anule el crecimiento, la morbilidad y/o la supervivencia de los organismos protozoarios. Los agentes antiprotozoarios ilustrativos incluyen (1) *agentes antipalúdicos*, por ejemplo, quinina, quinimax, quinidina, quinimax, cloroquina (ARALEN[®]), hidroxicloroquina (PLAQUENIL[®]), amodiaquina, pirimetamina (DARAPRIM[®]), sulfadoxina, proguanilo, mefloquina (LARIAM[®]), halofantrina, primaquina, artemesinina y sus derivados (por ejemplo, artemeter, artensunato, dihidroartemisinina, arteéter), clindamicina y combinaciones de los mismos; (2) inhibidores de proteasa, y los fármacos benzidaol, buparvacuona, carbarsona, cloquinol, disulfiram, eflomitina, emetina, furazolidona, antimonato de meglumina, melarsoprol, metronidazol (FLAGYL[®]), miltefosina, nifurtimox, nitazoxanida, omidazol, sulfato de paromomicina, pentamidina, pirimetamina (DARAPRIM[®]), secnidazol, tinidazol.

60 El término “*vacuna*” como se usa en el presente documento incluye cualquier inmunógeno no patógeno que, cuando se inocula en un hospedador, induce inmunidad protectora contra un patógeno específico. Las vacunas pueden tomar muchas formas. Las vacunas pueden ser organismos completos que comparten antígenos importantes con el patógeno, pero no son patógenos en sí mismos (por ejemplo, viruela de la vaca). Las vacunas también pueden

5 prepararse a partir de muertos (por ejemplo, vacuna de la polio de Salk) o atenuados (con pérdida de capacidad para producir enfermedad, por ejemplo, vacuna de la polio de Sabin). Las vacunas también pueden prepararse a partir de macromoléculas purificadas aisladas del organismo patógeno. Por ejemplo, las *vacunas toxoides* (por ejemplo, del tétanos y de la difteria) que contienen la forma inactiva de toxina bacteriana soluble, dan como resultado la producción de anticuerpos anti toxinas, pero no inmunidad a las bacterias intactas. Las *vacunas subunitarias* (por ejemplo, de la Hepatitis B) contienen solamente una única proteína inmunogénica aislada del patógeno de interés. Las *vacunas conjugadas de haptenos* unen con ciertos epítopos de carbohidratos o polipeptídicos aislados del patógeno de interés a vehículos inmunogénicos, tales como toxoide del tétanos. Estas estrategias esencialmente usan los epítopos como haptenos para inducir la producción de anticuerpos, que después 10 reconocen el mismo epítopo en el patógeno nativo. Sin embargo, para tener máxima eficacia, dichas vacunas deben incorporar epítopos de células tanto B como T, y los epítopos de células T deben elegirse para asegurar que puedan ser reconocidos, presentados y respondidos por los sistemas inmunitarios de los individuos hospedadores.

15 Las *vacunas de ADN* aprovechan la capacidad de las células hospedadoras para captar y expresar ADN que codifica proteínas patógenas que se inyectan por vía intramuscular.

20 Los ejemplos de vacunas antiviricas que pueden usarse en combinación con los anticuerpos anti PD-L1 para los métodos descritos en el presente documento incluyen: vacuna del VHC (virasoma) de Pevion Biotech., TG4040 (MVA-VHC de Transgene viron diseñado para potenciar la respuesta inmunitaria celular (los linfocitos T citotóxicos CD4+ y CD8+) contra NS3, NS4 y NS5B, CHRONVAC®, una vacuna de ADN de NS3/4a con codones optimizados de Inovio Biomedical, vacunas de VHC/CpG de Novartis, GI-5005, una vacuna del VHC de Globeimmune, IC41, una mezcla de péptidos sintéticos que tienen epítopos de T CD4 y CD8 del VHC en combinación con poli-L-arginina de Intercell.

25 Las respuestas del hospedador a inmunógenos pueden potenciarse si se administran como una mezcla con *adyuvantes*. Los adyuvantes inmunitarios actúan de una o más de las siguientes maneras: (1) prolongando la conservación del inmunógeno, (2) aumentando el tamaño efectivo del inmunógeno (y de este modo promoviendo la fagocitosis y la presentación a macrófagos), (3) estimulando el flujo de entrada de macrófago u otras células inmunitarias al sitio de inyección, o (4) promoviendo la producción de citocinas locales y otras actividades 30 inmunológicas. Los adyuvantes ilustrativos incluyen: adyuvante completo de Freund (CFA), sales de aluminio y proteínas derivadas de micobacterias tales como di- o tripéptidos de muramilo.

35 El término anticuerpo incluye anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos de longitud completa que tienen una región Fc de inmunoglobulina), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos y moléculas monocatenarias, así como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')₂ y Fv). El término "*inmunoglobulina*" (Ig) se usa indistintamente con "anticuerpo" en el presente documento.

40 La unidad básica del anticuerpo de 4 cadenas es una glucoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Un anticuerpo IgM consiste en 5 de las unidades heterotetraméricas básicas junto con un polipéptido adicional denominado una cadena J, y contiene 10 sitios de unión a antígeno, mientras que los anticuerpos IgA comprenden de 2 a 5 de las unidades de 4 cadenas básicas que pueden polimerizar para formar ensamblajes polivalentes en combinación con la cadena J. En el caso de IgG, la unidad de 4 cadenas es en general de aproximadamente 150.000 dalton. Cada cadena L se une con una cadena H 45 por un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H se unen entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L también tiene enlaces disulfuro intracatenarios separados regularmente. Cada cadena H tiene en el extremo aminoterminal, un dominio variable (V_H) seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios C_H para μ y los isotipos. Cada cadena L tiene en el extremo aminoterminal un dominio variable (V_L) seguido de un dominio constante en su otro extremo. El V_L se alinea con el V_H y el C_L se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_H1). Se cree que restos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada. El emparejamiento de un V_H y un V_L entre sí forma un único sitio de unión a antígeno. Para la estructura y las propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase, por ejemplo, Basic and Clinical Immunology, 8^a Edición, Daniel P. Sties, Abba I. Terr y Tristram G. Parsolv (eds), Appleton y Lange, Norwalk, CT, 55 1994, página 71 y Capítulo 6. La cadena L de cualquier especie de vertebrado puede asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (CH), las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas designadas α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las clases γ y α se dividen adicionalmente en subclases basándose en diferencias relativamente menores en la secuencia de CH y la función, por ejemplo, los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

60 65 Un anticuerpo "*aislado*" es uno que se ha identificado, separado y/o recuperado de un componente de su ambiente de producción (por ejemplo, natural o recombinante). Preferentemente, el polipéptido aislado está libre de asociación con todos los otros componentes de su ambiente de producción. Los componentes contaminantes de su ambiente

de producción, tales como los resultantes de células transfectadas recombinantes, son materiales que normalmente interferirían con los usos de investigación, diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. El polipéptido puede purificarse: (1) hasta más del 95 % en peso de anticuerpo como se determina, por ejemplo, mediante el método de Lowry, y en algunas realizaciones, hasta más del 99 % en peso; (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria o (3) hasta su homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Habitualmente, sin embargo, se preparará un polipéptido o anticuerpo aislado por al menos una etapa de purificación.

La "región variable" o el "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios amino-terminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera pueden denominarse "VH" y "VL", respectivamente. Estos dominios son en general las partes más variables del anticuerpo (en relación con otros anticuerpos de la misma clase) y contienen los sitios de unión al antígeno.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertos segmentos de los dominios variables difieren extensivamente en su secuencia entre anticuerpos. El dominio V media en la unión a antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente entre la longitud completa de los dominios variables. En su lugar, se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables (HVR) en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de dominios variables se denominan las regiones marco conservadas (FR). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina beta, conectada por tres HVR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura en lámina beta. Las HVR de cada cadena se mantienen juntas en proximidad estrecha por las regiones FR y, con las HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígenos de anticuerpos (véase Kabat *et al.*, Sequences of Immunological Interest, Quinta Edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión del anticuerpo a un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural y/o modificaciones postraduccionales (por ejemplo, isomerizaciones, amidaciones) que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque los sintetiza el cultivo de hibridoma, no contaminado por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica como el carácter del anticuerpo que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiera producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por una diversidad de técnicas, incluyendo, por ejemplo, el método de hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature, 256: 495-97 (1975), Hongro *et al.*, Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al.*, Anticorps: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^a ed., 1988), Hammerling *et al.*, en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.^o 4.816.567), tecnologías de presentación en fagos (véase, por ejemplo, Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Sidhu *et al.*, J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132 (2004)), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o de tipo humano en animales que tengan partes de o todos los loci de inmunoglobulina humana o genes que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, documentos WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, Year in Immunol. 7: 33 (1993); Patentes de Estados Unidos n.^o 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; Marks *et al.*, Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995).

La expresión "anticuerpo desnudo" se refiere a un anticuerpo que no está conjugado con un resto citotóxico o radiomarcador.

Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" o "anticuerpo completo" se usan indistintamente para hacer referencia a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, a diferencia de un fragmento de anticuerpo. Específicamente los anticuerpos completos incluyen los que tienen cadenas pesadas y ligeras que incluyen una región Fc. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa

(por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos. En algunos casos, el anticuerpo intacto puede tener una o más funciones efectoras.

- 5 Un "fragmento de anticuerpo" comprende una parte de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión a antígeno y/o la variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (véase Patente de Estados Unidos 5.641.870, Ejemplo 2, Zapata *et al.*, Protein Eng. 8 (10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpos monocatenarios y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. La digestión con papaína de anticuerpos produjo dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab" y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad para cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L completa junto con el dominio de región variable de la cadena H (V_H), y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_{H1}). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión a antígeno, es decir, tiene un único sitio de unión a antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo produce un único fragmento F(ab')₂ grande que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab con enlaces disulfuro que tienen diferente actividad de unión a antígeno y aún es capaz de reticular con el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por tener algunos restos adicionales en el extremo carboxilo del dominio C_{H1} que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en el que el resto o los restos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- El fragmento Fc comprende las partes carboxilo terminales de ambas cadenas H mantenidas unidas por disulfuros. Las funciones efectoras de anticuerpos se determinan por secuencias en la región Fc, reconociéndose también dicha región por receptores Fc (FcR) hallados en ciertos tipos de células.
- "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y unión a antígeno completo. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio de región variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha, no covalente. A partir del plegamiento de estos dos dominios surgen seis bucles hipervariables (3 bucles de cada una de la cadena H y L) que contribuyen a los restos de aminoácidos para unión a antígeno y confieren al anticuerpo especificidad de unión a antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres HVR específicos para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse con el antígeno, aunque a una afinidad menor que el sitio de unión completo.
- "Fv monocatenario" también abreviado como "sFv" o "sFv" son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados en una única cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido de sFv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L lo que permite que el sFv forme la estructura deseada para unión a antígeno. Para una revisión del sFv, véase Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269 - 315 (1994).
- Los "fragmentos funcionales" de los anticuerpos de la invención comprenden una parte de un anticuerpo intacto, que incluyen en general la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto o la región Fc de un anticuerpo que conserva la capacidad de unión a FcR o ha modificado la capacidad de unión a FcR. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen anticuerpo lineal, moléculas de anticuerpos monocatenarias y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.
- Los términos "diacuerpos" se refieren a fragmentos de anticuerpos pequeños preparados construyendo fragmentos sFv (véase párrafo anterior) con enlazadores cortos (de aproximadamente 5-10 restos) entre los dominios V_H y V_L de modo que se consiga emparejamiento intercatenario pero no intracatenario de los dominios V, dando como resultado de este modo un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv "de cruce" en los que los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. Los diacuerpos se describen en mayor detalle, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 93/11161; Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6444 (1993).
- Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o las cadenas son idénticas u homólogas a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567, Morrison *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos PRIMATIZED® en los que la región de unión a antígeno del anticuerpo deriva de un anticuerpo producido, por ejemplo, inmunizando macacos con un antígeno de interés. Como se usa en el presente documento "anticuerpo humanizado" se usa como un subconjunto de "anticuerpos quiméricos".

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivadas de inmunoglobulina no humana. Un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los restos de un HVR (definido posteriormente en el presente documento) del receptor se reemplazan por restos de una HVR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseada. En algunos casos, los restos marco conservados ("FR") de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones pueden realizarse para refinar adicionalmente el rendimiento de los anticuerpos, tales como afinidad de unión. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y, normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una secuencia de inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana, aunque las regiones FR pueden incluir una o más sustituciones de restos FR individuales que mejoran el rendimiento del anticuerpo, tal como afinidad de unión, isomerización, inmunogenicidad, etc. El número de estas sustituciones de aminoácidos en la FR son normalmente no más de 6 en la cadena H, y en la cadena L, no más de 3. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase, por ejemplo, Jones *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992). Véase también, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1: 105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23: 1035-1038 (1995); Hurle y Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994); y Patentes de Estados Unidos n.º 6.982.321 y 7.087.409.

Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo que posee una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos como se desvelan en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprenda restos de unión a antígeno no humanos. Pueden producirse anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en este campo, incluyendo bibliotecas de presentación en fagos. Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581 (1991). También están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos métodos descritos en Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, página 77 (1985); Boerner *et al.*, J. Immunol., 147 (1): 86-95 (1991). Véase también van Dijk y van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368-74 (2001). Pueden prepararse anticuerpos humanos administrando el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a exposición antigénica, pero cuyos loci endógenos se han desactivado, por ejemplo, xenoratones inmunitados (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos n.º 6.075.181 y 6.150.584 con respecto a tecnología XENOMOUSE™). Véase también, por ejemplo, Li *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 3557-3562 (2006) con respecto a anticuerpos humanos generados mediante una tecnología de hibridoma de células B humanas.

La expresión "región hipervariable", "HVR" o "HV" cuando se usa en el presente documento se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son de secuencia hipervariable y/o forman bucles estructuralmente definidos. En general, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3), y tres en el VL (L1, L2, L3). En anticuerpos nativos, H3 y L3 presentan la mayor diversidad de las seis HVR, y se cree que H3 en particular desempeña un papel único para conferir especificidad fina a los anticuerpos. Véase, por ejemplo, Xu *et al.*, Immunity 13: 37-45 (2000); Johnson y Wu, in Methods in Molecular Biology 248: 1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). De hecho, los anticuerpos de camélidos de origen natural que consisten en una cadena pesada solamente son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera. Véase, por ejemplo, Hamers-Casterman *et al.*, Nature 363: 446-448 (1993); Sheriff *et al.*, Nature Struct. Biol. 3: 733-736 (1996).

Varias delineaciones de HVR están en uso y están abarcadas en el presente documento. Las regiones determinantes de complementariedad de Kabat (CDR) se basan en la variabilidad de secuencia y son las más habitualmente usadas (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere en su lugar a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). Las HVR de AbM representan un compromiso entre las HVR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se usan por el software de modelización de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las HVR "de contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los restos de cada una de estas HVR se indican a continuación.

	Bucle Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B (Numeración de Kabat)	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
H1	H31-H35 (Numeración de Chothia)	H26-H35	H26-H32	H30-H35
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

5 Las HVR pueden comprender "HVR extendidas" de la siguiente manera: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 o 89-96 (L3) en el VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 o 95-102 (H3) en el VH. Los restos de dominio variable se numeran de acuerdo con Kabat *et al.*, mencionados anteriormente, para cada una de estas definiciones.

10 La expresión "numeración de restos de dominio variable como en Kabat" o "numeración de posición de aminoácidos como en Kabat" y variaciones de las mismas, se refieren al sistema de numeración usado para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, mencionados anteriormente. Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos o más aminoácidos correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un inserto de un único aminoácido (resto 52a de acuerdo con Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo restos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del resto de FR de cadena pesada 82. La numeración de Kabat de restos puede determinarse para un anticuerpo dado por alineamiento en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada por Kabat "convencional".

15

20 Los restos de "marco conservado" o "FR" son los restos de dominio variable distintos de los restos HVR como se definen en el presente documento.

25 Un "marco conservado consenso humano" o "marco conservado humano aceptor" es un marco conservado que representa los restos de aminoácidos más habituales en una selección de secuencias marco conservadas de VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). En los ejemplos para el VL, el subgrupo puede ser subgrupo kappa I, kappa II, kappa III o kappa IV como en Kabat *et al.*, mencionados anteriormente. Adicionalmente, para el VH, el subgrupo puede ser subgrupo I, subgrupo II o subgrupo III como en Kabat *et al.*, mencionados anteriormente. Como alternativa, un marco conservado consenso humano puede derivar del anterior en restos particulares, tal como cuando un resto del marco conservado humano se selecciona basándose en su homología con el marco conservado donador alineando la secuencia de marco conservado donador con una colección de diversas secuencias de marco conservado humano. Un marco conservado humano aceptor "derivado de" un marco conservado de inmunoglobulina humano o un marco conservado consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos del mismo o puede contener cambios de secuencia de aminoácidos preexistentes. El número de cambios de aminoácidos preexistentes puede ser de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos.

30

35

40

45

50

40

45

50

Una "modificación de aminoácidos" en una posición específica, por ejemplo de la región Fc, se refiere a la sustitución o supresión del resto especificado, o la inserción de al menos un resto de aminoácido adyacente al resto

especificado. La inserción "adyacente" a un resto especificado significa inserción a una distancia de uno o dos restos del mismo. La inserción puede ser N terminal o C terminal con respecto al resto especificado. La modificación de aminoácidos preferida en el presente documento es una sustitución.

- 5 Un anticuerpo "*de afinidad madurada*" es uno con una o más alteraciones en una o más HVR del mismo que da como resultado una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esa alteración o esas alteraciones. Un anticuerpo de afinidad madurada puede tener afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Se producen anticuerpos de afinidad madurada por procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, Marks *et al.*, Bio/Technology 10: 779-783 (1992) describen la maduración de afinidad por redistribución de dominio VH y VL. Se describe mutagénesis aleatoria de restos de HVR y/o marco conservado en, por ejemplo: Barbas *et al.* Proc Natl. Acad. Sci. USA 91: 3809-3813 (1994); Schier *et al.* Gene 169: 147-155 (1995); Yelton *et al.* J. Immunol. 155: 1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, J. Immunol. 154(7): 3310-9 (1995); y Hawkins *et al.*, J. Mol. Biol. 226: 889-896 (1992).
- 10 15 Como se usa en el presente documento, la expresión "se une específicamente con" o es "*específico de*" se refiere a interacciones medibles y reproducibles tales como unión entre una diana y un anticuerpo, que es determinante de la presencia de la diana en presencia de una población heterogénea de moléculas incluyendo moléculas biológicas. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente con una diana (que puede ser un epítopo) es un anticuerpo que se une con esta diana con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración que como se une con otras dianas. El grado de unión de un anticuerpo con una diana no relacionada puede ser menor de aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo con la diana como se mide, por ejemplo, por un radioinmunoensayo (RIA). En ciertas realizaciones, un anticuerpo que se une específicamente con una diana tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{nM}$, $\leq 10 \text{nM}$, $\leq 1 \text{nM}$ o $\leq 0,1 \text{nM}$. En ciertas realizaciones, un anticuerpo se une específicamente con un epítopo en una proteína que está conservada entre la proteína de diferentes especies. En otra realización, la unión específica puede incluir, pero no requiere, unión exclusiva.
- 20 25
- 30 35 Un anticuerpo "*de bloqueo*" o un anticuerpo "*antagonista*" es uno que inhibe o reduce una actividad biológica del antígeno con el que se une. En algunas realizaciones, los anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno. Los anticuerpos anti PD-L1 de la invención bloquean la señalización a través de PD-1 para restaurar una respuesta funcional por células T de un estado disfuncional a la estimulación por antígeno.
- 40 45 Un anticuerpo "*agonista*" o activador es uno que potencia o inicia la señalización por el antígeno con el que se une. En algunas realizaciones, los anticuerpos agonistas provocan o activan la señalización sin presencia del ligando natural.
- 50 55 La expresión "*fase sólida*" describe una matriz no acuosa a la que puede adherirse el anticuerpo de la presente invención. Los ejemplos de fases sólidas abarcados en el presente documento incluyen las formadas parcial o completamente por vidrio (por ejemplo, vidrio de tamaño de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. Dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Esta expresión también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tales como las descritas en la Patente de Estados Unidos n.º 4.275.149.
- 60 65 Las "*funciones efectoras de anticuerpos*" se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo, y varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente de complemento; unión a receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptores de células B); y activación de células B. La función efectora de anticuerpos "*reducida o minimizada*" significa la que se reduce en al menos 50 % (como alternativa 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %) con respecto al anticuerpo de tipo silvestre o no modificado. La determinación de función efectora de anticuerpo es fácilmente determinable y medible por un experto habitual en la técnica. Las funciones efectoras del anticuerpo de unión al complemento, citotoxicidad dependiente del complemento y citotoxicidad dependiente de anticuerpos pueden verse afectadas. La función efectora puede eliminarse mediante una mutación en la región constante que eliminó la glucosilación, por ejemplo, "mutación sin efecto". La mutación sin efecto puede ser una mutación N297A o DANA (D265A + N297A) en la región CH2. Shields *et al.*, J. Biol. Chem. 276 (9): 6591-6604 (2001). Como alternativa, mutaciones adicionales que dan como resultado una función efectora reducida o eliminada incluyen: K322A y L234A/L235A (LALA). Como alternativa, la función efectora puede reducirse o eliminarse mediante técnicas de producción, tales como expresión en células hospedadoras que no glucosilan (por ejemplo, *E. coli*) o en las que se produce un patrón de glucosilación alterado que es ineficaz o menos eficaz en la promoción de la función efectora (por ejemplo, Shinkawa *et al.*, J. Biol. Chem. 278 (5): 3466-3473 (2003)).
- 70 75 La "*citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo*" o ADCC se refiere a una forma de citotoxicidad en la que Ig secretada unida a receptores de Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, células citolíticas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permiten que estas células citotóxicas se unan

específicamente con una célula diana portadora de antígenos y posteriormente destruyen la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" las células citotóxicas y se requieren para destrucción de la célula diana por este mecanismo. Las células primarias para mediar en ADCC, células NK, expresan Fc γ RIII solamente, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión de Fc en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la Patente de Estados Unidos n.^o 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células citolíticas naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes *et al.*, PNAS USA 95: 652-656 (1998).

A no ser que se indique de otro modo en el presente documento, la numeración de los restos en una cadena pesada de inmunoglobulina es la del índice de EU como en Kabat *et al.*, mencionado anteriormente. El "índice de EU como en Kabat" se refiere a la numeración de restos del anticuerpo IgG1 EU humano.

La expresión "*región Fc*" en el presente documento se usa para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina podrían variar, se define habitualmente que la región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde un resto de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxilo terminal de la misma. La lisina C terminal (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración de EU) de la región Fc puede retirarse, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o modificando técnicamente de forma recombinante el ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. En consecuencia, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los restos K447 retirados, poblaciones de anticuerpos sin restos K447 retirados y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el resto K447.

El "*receptor de Fc*" o "*FcR*" describe un receptor que se une con la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une con un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII, incluyendo variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativo de estos receptores, los receptores Fc γ RII incluyen Fc γ RIIA (un "receptor activador") y Fc γ RIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activador Fc γ RIIA contiene un motivo de activación de inmunorreceptores basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor Fc γ RIIB contiene un motivo de inhibición de inmunorreceptores basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplasmático. (Véase M. Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997)). Se revisan FcR en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991); Capel *et al.*, Immunomethods 4: 25-34 (1994); y de Haas *et al.*, J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están abarcados por el término "FcR" en el presente documento.

La expresión "*receptor de Fc*" o "*FcR*" también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternos al feto. Guyer *et al.*, J. Immunol. 117: 587 (1976) y Kim *et al.*, J. Immunol. 24: 249 (1994). Se conocen métodos para medir la unión con FcRn (véase, por ejemplo, Ghetie y Ward, Immunol. Today 18: (12): 592-8 (1997); Ghetie *et al.*, Nature Biotechnology 15 (7): 637-40 (1997); Hinton *et al.*, J. Biol. Chem. 279 (8): 6213-6 (2004); documento WO 2004/92219 (Hinton *et al.*). La unión con FcRn *in vivo* y semivida en suero de polipéptidos de unión de alta afinidad con FcRn humanos pueden ensayarse, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates a los que se administran los polipéptidos que tienen una región Fc variante. El documento WO 2004/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpos que mejoraron o redujeron la unión con FcR. Véase también, por ejemplo, Shields *et al.*, J. Biol. Chem. 9 (2): 6591-6604 (2001).

Las "células efectoras" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. En un aspecto, las células efectoras expresan al menos Fc γ RIII y realizan función efectora de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median en ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células citolíticas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa, por ejemplo, sangre. Las células efectoras son generalmente linfocitos asociados con la fase efectora, y actúan para producir citocinas (células T auxiliares), destruyen células infectadas con patógenos (células T citotóxicas) o secretar anticuerpos (células B diferenciadas).

La "*citotoxicidad dependiente del complemento*" o "*CDC*" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación de la ruta del complemento clásica se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) con anticuerpos (de la subclase apropiada) que se unen con su antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol. Métodos 202: 163 (1996). Se describen variantes de anticuerpos con secuencias de aminoácidos de región Fc alteradas y capacidad de unión a C1q aumentada o reducida en la patente de Estados Unidos n.^o 6.194.551B1 y documento WO99/51642. Véase, además, Idusogie *et al.* J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

El sitio de N-glucosilación en IgG está en Asn297 en el dominio CH2. La presente invención también proporciona composiciones de un anticuerpo humanizado, de unión a antígeno, que tiene una región Fc con función efectora reducida o sin función efectora. Una manera de conseguir esto es una sustitución A297N, que se ha mostrado previamente que anula la unión al complemento y función efectora ("mutante de Fc sin efector") en un anticuerpo anti CD20. Idusogie *et al.*, mencionado anteriormente. Como resultado de esta mutación, la producción de anticuerpos anti PD-L1 de la presente invención que contienen esta mutación de Fc en células de mamífero tales como CHO, no tendrá ninguna glucosilación lo que a su vez da como resultado una función efectora reducida o mínima. Como alternativa, la función efectora de anticuerpos puede eliminarse sin sustitución de CH2 mediante la expresión en células que no son de mamífero tales como *E. coli*.

La "afinidad de unión" se refiere en general a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A no ser que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, la "afinidad de unión" se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede representarse en general por la constante de disociación (K_d). La afinidad puede medirse por métodos habituales conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad se unen en general con el antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen con el antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos más tiempo. Se conocen en la técnica una diversidad de métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede usarse para fines de la presente invención. A continuación se describen realizaciones ilustrativas y ejemplares específicas para medir la afinidad de unión.

En una realización, la " K_d " o el "valor de K_d " de acuerdo con la presente invención, se mide mediante un radioinmunoensayo (RIA) de unión a antígeno realizado con la versión Fab del anticuerpo y la molécula de antígeno como se describe por el siguiente ensayo que mide la afinidad de unión en solución de Fab por el antígeno equilibrando Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (^{125}I) en presencia de una serie de titulación de antígeno no marcado, capturando después el antígeno con una placa recubierta con anticuerpo anti Fab (Chen, *et al.*, (1999) J. Mol Biol 293: 865-881). Para establecer condiciones para el ensayo, las placas de microtitulación (Dynex) se recubren durante una noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato sódico 50 mM (pH 9,6) y posteriormente se bloquean con albúmina de suero bovino 2 % (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc n.º 269620), se mezcla [^{125}I]-antígeno 100 pM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés (coherente con la evaluación de un anticuerpo anti VEGF, Fab-12, en Presta *et al.*, (1997) Cancer Res. 57: 4593-4599). El Fab de interés se incuba después durante una noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo más largo (por ejemplo, 65 horas) para asegurar que se alcance el equilibrio. A continuación, las mezclas se transfieren a la placa de captura para su incubación a temperatura ambiente durante una hora. Después la solución se retira y la placa se lava ocho veces con Tween-20 0,1 % en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden 150 µl/pocillo de agente de centelleo (MicroScint-20; Packard), y las placas se recuentan en un contador gamma Topcount (Packard) durante diez minutos. Se eligen las concentraciones de cada Fab que proporcionan menos de o igual a 20 % de la unión máxima para su uso en ensayos de unión competitiva.

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

Una "velocidad de asociación" o " k_{on} " de acuerdo con la presente invención también puede determinarse como se ha descrito anteriormente usando un sistema BIACORE®-2000 o un sistema BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con microplacas CM5 con antígeno inmovilizado a aproximadamente 10 unidades de

5 respuesta (UR). Brevemente, se activan microplacas biosensoras de dextrano carboximetilado (CM5, BIACore Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (ECD) y N-hidroxisuccinimida (NHS) siguiendo las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato sódico 10 mM, pH 4,8, en 5 mg/ml (\approx 0,2 mM) antes de la inyección a un caudal de 5 ml/min. Para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de 10 proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se añade etanolamina 1 M para bloquear los grupos que 15 no han reaccionado. Para mediciones de cinética, se inyectan diluciones en serie dobles de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 0,05 % (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 μ l/min. Las velocidades de 20 asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) se calculan usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno 25 sencillo (Software de Evaluación BIACore versión 3.2) ajustando simultáneamente el sensograma de asociación y 30 disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calculó como la relación k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, 35 Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293: 865-881. Sin embargo, si la velocidad de asociación supera 10^6 M⁻¹ S⁻¹ por el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad de asociación se determina preferentemente usando una técnica de interrupción de fluorescencia que mide el aumento o la reducción de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm, emisión = 340 nm, pase de banda 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de 40 antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

20 La expresión "sustancialmente reducido" o "sustancialmente diferente", como se usa en el presente documento, indica un grado suficientemente alto de diferencia entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado con una molécula y el otro asociado con una molécula de referencia/comparadora) de modo que un experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores es estadísticamente significativa dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores K_d). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, mayor de aproximadamente 10 %, mayor de aproximadamente 20 %, mayor de aproximadamente 25 30 %, mayor de aproximadamente 40 % y/o mayor de aproximadamente 50 % en función del valor de la molécula de referencia/comparadora.

30 La expresión "sustancialmente similar" o "sustancialmente igual", como se usa en el presente documento, indica un grado de similitud suficientemente alto entre dos valores numéricos (por ejemplo, uno asociado con un anticuerpo de la invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparador), de modo que un experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores tiene poca o ninguna importancia biológica y/o estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores K_d). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, menor de aproximadamente 50 %, menor de aproximadamente 40 %, menor de 35 aproximadamente 30 %, menor de aproximadamente 20 % y/o menor de aproximadamente 10 % en función del valor de referencia/comparador.

40 El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" y la "homología" con respecto a una secuencia peptídica, polipeptídica o de anticuerpo se definen como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia peptídica o polipeptídica específica, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el porcentaje de identidad de secuencia máxima, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. Puede conseguirse alineamiento para fines de determinación del porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de diversas maneras que están dentro de la experiencia de la técnica, por ejemplo, usando software informático disponible públicamente tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o MEGALIGN™ (DNASTAR). Los 45 expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el alineamiento máximo sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para fines del presente documento, sin embargo, se generan valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, creado por Genentech, Inc. El código fuente de ALIGN-2 se ha registrado con documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de 50 los Estados Unidos, Washington DC, 20559, donde se ha registrado con el número de registro de derechos de autor de Estados Unidos TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían.

55 En situaciones en las que se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A con, con respecto a, o frente a, una secuencia de aminoácidos dada B (que, como alternativa, puede denominarse secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con, con respecto a, o frente a, una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula de la siguiente manera:

$$100 \text{ por la fracción } X/Y$$

60 donde X es el número de restos de aminoácidos que se puntúan como coincidencias idénticas con el programa de 65 alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento de ese programa de A y B, y donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no sea igual a la

longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A.

5 A no ser que se indique específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se ha descrito en el párrafo anterior usando el programa informático ALIGN-2.

10 Una molécula de ácido nucleico "aislada" que codifica los anticuerpos del presente documento es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que se asocia habitualmente en el ambiente en el que se produjo. Preferentemente, el ácido nucleico aislado está libre de asociación con todos los componentes asociados con el ambiente de producción. Las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican los polipéptidos y anticuerpos del presente documento están en una forma distinta de la forma o situación en la que se encuentran en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico aisladas por lo tanto se distinguen del ácido nucleico que codifica los polipéptidos y anticuerpos del presente documento existentes de forma natural en células.

15 La expresión "*secuencias de control*" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo hospedador particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosomas. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

20 25 El ácido nucleico está "*unido operativamente*" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o un líder secretor se une operativamente con ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente con una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosomas está unido operativamente con una secuencia codificante si está situado de tal forma que facilite la traducción. En general, "*unido operativamente*" significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. Se consigue enlace por ligamiento en sitios de restricción convenientes. Si no existen dichos sitios, los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos se usan de acuerdo con la práctica convencional.

30 35 La expresión "*marcado con epítopo*" cuando se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido químérico que comprende un polipéptido o anticuerpo descrito en el presente documento fusionado con un "polipéptido marcador". El polipéptido marcador tiene suficientes restos para proporcionar un epítopo contra el que puede prepararse un anticuerpo, pero es suficientemente corto como para que no interfiera con la actividad del polipéptido con el que se fusiona. El polipéptido marcador preferentemente también es bastante único de modo que el anticuerpo no reacciona sustancialmente de forma cruzada con otros epitopos. Los polipéptidos marcadores adecuados tienen en general al menos seis restos de aminoácidos y habitualmente entre aproximadamente 8 y 50 restos de aminoácidos (preferentemente, entre aproximadamente 10 y 20 restos de aminoácidos).

40 45 Como se usa en el presente documento, el término "*inmunoadhesina*" designa moléculas de tipo anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesión") con las funciones efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta del sitio de reconocimiento y unión a antígenos de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga") y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina normalmente es una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia de dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina puede obtenerse de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2 (incluyendo IgG2A e IgG2B), IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM. Las fusiones de Ig preferentemente incluyen la sustitución de un dominio de un polipéptido o un anticuerpo descrito en el presente documento en lugar de al menos una región variable dentro de una molécula de Ig. La fusión de inmunoglobulina puede incluir las regiones bisagra, CH2 y CH3, o las regiones bisagra, CH1, CH2 y CH3 de una molécula IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulina véase también Patente de Estados Unidos n.º 5.428.130 expedida el 27 de junio de 1995. Por ejemplo, las inmunoadhesinas útiles como segundos medicamentos útiles para terapia de combinación en el presente documento incluyen polipéptidos que comprenden las partes extracelular o de unión a PD-1 de PD-L1 o PD-L2, o viceversa, fusionados con un dominio constante de una secuencia de inmunoglobulina.

50 55 60 Una "proteína de fusión" y un "polipéptido de fusión" se refieren a un polipéptido que tiene dos partes unidas covalentemente entre sí, donde cada una de las partes es un polipéptido que tiene una propiedad diferente. La propiedad puede ser una propiedad biológica, tal como actividad *in vitro* o *in vivo*. La propiedad puede ser una propiedad química o física sencilla, tal como unión con una molécula diana, catálisis de una reacción, etc. Las dos partes pueden unirse directamente por un único enlace peptídico o mediante un enlazador peptídico estarán en fase de lectura entre sí.

- Una formulación "estable" es una en la que la proteína de la misma esencialmente conserva su estabilidad física y química y su integridad tras el almacenamiento. Diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad de proteínas están disponibles en este campo y se revisan en Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Nueva York, Pubs. (1991) y Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993).
- 5 La estabilidad puede medirse a una temperatura seleccionada durante un periodo de tiempo seleccionado. Para exploración rápida, la formulación puede mantenerse a 40 °C durante 2 semanas a 1 mes, momento en el cual se mide la estabilidad. Cuando la formulación se va a almacenar a 2-8 °C, generalmente la formulación debería ser estable a 30 °C o 40 °C durante al menos 1 mes y/o estable a 2-8 °C durante al menos 2 años. Cuando la formulación se va a almacenar a 30 °C, en general la formulación debería ser estable durante al menos 2 años a 30 °C y/o estable a 40 °C durante al menos 6 meses. Por ejemplo, el grado de agregación durante el almacenamiento puede usarse como un indicador de la estabilidad proteica. Por lo tanto, una formulación "estable" puede ser una en la que está presente menos de aproximadamente 10 % y preferentemente menos de aproximadamente 5 % de la proteína como un agregado en la formulación. Durante el almacenamiento de la formulación puede determinarse cualquier aumento en la formación de agregados.
- 10 15 Una formulación "reconstituida" es una que se ha preparado disolviendo una proteína liofilizada o una formulación de anticuerpo en un diluyente de modo que la proteína se disperse a través del mismo. La formulación reconstituida es adecuada para administración (por ejemplo administración subcutánea) a un paciente para tratar con la proteína de interés y puede ser una que sea adecuada para administración parenteral o intravenosa.
- 20 25 Una formulación "isotónica" es una que tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas tendrán en general una presión osmótica de aproximadamente 250 a 350 mOsm. El término "hipotónico" describe una formulación con una presión osmótica por debajo de la de la sangre humana. De forma correspondiente, el término "hipertónico" se usa para describir una formulación con una presión osmótica por encima de la de la sangre humana. La isotonicidad puede medirse usando una presión de vapor u osmómetro de tipo congelación, por ejemplo. Las formulaciones del presente documento son hipertónicas como resultado de la adición de sal y/o tampón.
- 30 35 40 Los "vehículos" como se usa en el presente documento incluyen vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o el mamífero que se expone a ellos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Con frecuencia el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución de pH tamponado acuosa. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.
- 45 Un "prospecto" se refiere a instrucciones habitualmente incluidas en envases comerciales de medicamentos que contienen información acerca de las indicaciones, el uso, la dosificación, la administración, las contraindicaciones, otros medicamentos para combinar con el producto envasado y/o advertencias con respecto al uso de dichos medicamentos, etc.
- 50 55 60 65 Un "ácido farmacéuticamente aceptable" incluye ácidos inorgánicos y orgánicos que son no tóxicos a la concentración y en el modo en el que se formulan. Por ejemplo, los ácidos inorgánicos adecuados incluyen clorhídrico, perclórico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, sulfúrico, sulfónico, sulfínico, sulfanílico, fosfórico, carbónico, etc. Los ácidos orgánicos adecuados incluyen alquilo de cadena sencilla y ramificada, aromáticos, cíclicos, cicloalifáticos, arilalifáticos, heterocíclicos, saturados, insaturados, mono, di- y tri-carboxílicos, incluyendo por ejemplo, fórmico, acético, 2-hidroxiacético, trifluoroacético, fenilacético, trimetilacético, *t*-butil acético, antranílico, propanoico, 2-hidroxipropanoico, 2-oxopropanoico, propandioico, ciclopentano-propiónico, ciclopentano propiónico, 3-fenilpropiónico, butanoico, butandioico, benzoico, 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, 2-acetoxibenzoico, ascórbico, cinámico, lauril sulfúrico, esteárico, mucónico, mandélico, succínico, embónico, fumárico, málico, maleico, hidroximaleico, malónico, láctico, cítrico, tartárico, glicólico, glicónico, glucónico, pirúvico, glioxálico, oxálico, mesílico, succínico, salicílico, ftálico, palmoico, palmeico, tiociánico, metanosulfónico, etanosulfónico, 1,2-etanodisulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, bencenosulfónico, 4-clorobencenosulfónico, naftaleno-2-sulfónico, *p*-toluenosulfónico, canforsulfónico, 4-metilbicielo [2.2.2]-oct-2-en-1-carboxílico, glucoheptónico, 4,4'-metilen-bis-3-(hidroxi-2-en-l-carboxílico), hidroxinaftoico.
- Las "bases farmacéuticamente aceptables" incluyen bases inorgánicas y orgánicas que no son tóxicas a la concentración y en el modo en que se formulan. Por ejemplo, las bases adecuadas incluyen las formadas a partir de metales formadores de bases inorgánicas tales como litio, sodio, potasio, magnesio, calcio, amonio, hierro, cinc, cobre, manganeso, aluminio, N-metilglucamina, morfolina, piperidina y bases no tóxicas orgánicas incluyendo, aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, [por ejemplo, N(R')₄⁺ (donde R' es de forma independiente H o alquilo C₁₋₄, por ejemplo, amonio, Tris)], por ejemplo, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dietilaminoetanol,

5 trimetamina, diciclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaina, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, resinas de poliamina y similares. Son bases no tóxicas orgánicas particularmente preferidas isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetamina, diciclohexilamina, colina y cafeína. Los ácidos y bases farmacéuticamente aceptables adicionales que pueden utilizarse con la presente invención incluyen los que derivan de los aminoácidos, por ejemplo, histidina, glicina, fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y asparagina.

10 Los tampones y sales "farmacéuticamente aceptables" incluyen los derivados de sales de adición tanto de ácidos como de bases de los ácidos y bases indicados anteriormente. Los tampones y/o las sales específicos incluyen histidina, succinato y acetato.

15 Un "azúcar farmacéuticamente aceptable" es una molécula que, cuando se combina con una proteína de interés, impide o reduce significativamente la inestabilidad química y/o física de la proteína tras su almacenamiento. Cuando se pretende que la formulación se liofilice y después se reconstituya, los "azúcares farmacéuticamente aceptables" también pueden conocerse como un "lioprotector". Los azúcares ilustrativos y sus alcoholes de azúcares correspondientes incluyen: un aminoácido tal como glutamato monosódico o histidina; una metilamina tal como betaina; una sal liotrópica tal como sulfato de magnesio; un poliol tal como alcoholes de azúcares trihídricos o de mayor peso molecular, por ejemplo glicerina, dextrano, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol; propilenglicol; polietilenglicol; PLURONICS®, y combinaciones de los mismos. Los lioprotectores ilustrativos adicionales incluyen glicerina y gelatina, y los azúcares melibiosa, melezitosa, rafinosa, manotriosa y estaquiosa. Los ejemplos de azúcares reductores incluyen glucosa, maltosa, lactosa, maltulosa, isomaltulosa y lactulosa. Los ejemplos de azúcares no reductores incluyen glucósidos no reductores de compuestos de polihidroxi seleccionados de alcoholes de azúcares y otros polialcoholes de cadena sencilla. Son alcoholes de azúcares preferidos monoglucósidos, especialmente los compuestos obtenidos por reducción de disacáridos tales como lactosa, maltosa, lactulosa y maltulosa. El grupo lateral glicosídico puede ser glucosídico o galactosídico. Son ejemplos adicionales de alcoholes de azúcares glucitol, maltitol, lactitol e isomaltulosa. Los azúcares farmacéuticamente aceptables preferidos son los azúcares no reductores trehalosa o sacarosa. Se añaden azúcares farmacéuticamente aceptables a la formulación en una "cantidad protectora" (por ejemplo prelio filización) lo que significa que la proteína conserva esencialmente su estabilidad física y química y su integridad durante el almacenamiento (por ejemplo, después de reconstitución y almacenamiento).

30 35 El "diluyente" de interés en el presente documento es uno que es farmacéuticamente aceptable (seguro y no tóxico para administración a un ser humano) y es útil para la preparación de una formulación líquida, tal como una formulación reconstituida después de liofilización. Los diluyentes ilustrativos incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWFI), una solución de pH tamponado (por ejemplo solución salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa. Los diluyentes pueden incluir soluciones acuosas de sales y/o tampones.

40 Un "conservante" es un compuesto que puede añadirse a las formulaciones del presente documento para reducir la actividad bactericida. La adición de un conservante puede facilitar, por ejemplo, la producción de una formulación multiuso (de múltiples dosis). Los ejemplos de conservantes potenciales incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en los que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga), y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos tales como fenol, alcohol butílico y bencílico, alquilparabenos tales como metil o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol. El conservante más preferido en el presente documento es alcohol bencílico.

50 55 "Tratamiento" se refiere a una intervención clínica diseñada para alterar el ciclo natural del individuo o la célula que se trate, y puede realizarse bien para profilaxis o bien durante el transcurso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen impedir la aparición o reaparición de la enfermedad, impedir la metástasis, reducir la tasa de progresión de la enfermedad, aliviar o paliar la patología, y remisión o pronóstico mejorado. Los anticuerpos de la invención pueden usarse para retrasar el desarrollo de una enfermedad o de un trastorno. Un sujeto se "trata" con éxito, por ejemplo, usando los anticuerpos anti-PD-L1 apoptóticos de la invención si se mitigan uno o más síntomas asociados con un trastorno disfuncional de células T.

60 Una "cantidad eficaz" se refiere a al menos una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para conseguir el efecto deseado o indicado, incluyendo un resultado terapéutico o profiláctico. Por ejemplo, una cantidad eficaz de los anticuerpos anti PD-L1 de la presente invención es al menos la concentración mínima que da como resultado la inhibición de señalización de PD-1, bien mediante PD-1 en células T o B7.1 en otras APC o ambos.

65 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es al menos la concentración mínima requerida para efectuar una mejora o prevención medible de un trastorno particular. Una cantidad terapéuticamente eficaz en el presente documento puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, la edad, el sexo y el peso del paciente, y la capacidad del anticuerpo para inducir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo se compensa por los efectos terapéuticamente

beneficiosos. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos anti PD-L1 de la presente invención es al menos la concentración mínima que da como resultado la inhibición de al menos un síntoma de un *trastorno disfuncional de células T*.

- 5 Una “*cantidad profilácticamente eficaz*” se refiere a una cantidad eficaz, a las dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Por ejemplo, una cantidad profilácticamente eficaz de los anticuerpos anti PD-L1 de la presente invención es al menos la concentración mínima que evita o atenúa el desarrollo de al menos un síntoma de un *trastorno disfuncional de células T*.
- 10 La administración “*crónica*” se refiere a la administración del medicamento o los medicamentos en un modo continuo en lugar de agudo, para mantener el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un periodo de tiempo prolongado. La administración “*intermitente*” es tratamiento que no se realiza de forma consecutiva sin interrupción, sino que es de naturaleza cíclica.
- 15 “*Mamífero*” para fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos o mascotas tales como perros, caballos, conejos, vacas, cerdos, hámsteres, gerbos, ratones, hurones, ratas, gatos, etc. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.
- 20 La expresión “*formulación farmacéutica*” se refiere a una preparación que está en forma tal que permita que la actividad biológica del principio activo sea eficaz, y que no contiene ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al que se administraría la formulación. Dichas formulaciones son estériles.
- 25 Una formulación “*estéril*” es aséptica o está libre de todos los microorganismos vivos y sus esporas.
- 30 El término “*aproximadamente*” como se usa en el presente documento se refiere a intervalo de error habitual para el valor respectivo conocido fácilmente por el experto en este campo técnico.
- 35 Un “*trastorno autoinmunitario*” es una enfermedad o un trastorno que surge de y se dirige contra los propios tejidos u órganos de un individuo o una cosegregación o manifestación del mismo o una afección resultante del mismo. Las enfermedades autoinmunitarias pueden ser una enfermedad específica de órgano (es decir, la respuesta inmunitaria se dirige específicamente contra un sistema de órganos tal como el sistema endocrino, el sistema hematopoyético, la piel, el sistema cardiopulmonar, los sistemas gastrointestinal y hepático, el sistema renal, el tiroides, los oídos, el sistema neuromuscular, el sistema nervioso central, etc.) o una enfermedad sistémica que puede afectar a múltiples sistemas orgánicos (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR), polimiositis, etc.). Enfermedades preferidas de estas incluyen trastornos reumatológicos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, AR, síndrome de Sjögren, esclerodermia, lupus tal como LES y nefritis lúpica, polimiositis-dermatomiositis, crioglobulinemia, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos y artritis psoriásica), trastornos autoinmunitarios gastrointestinales y hepáticos (tales como, por ejemplo, enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), gastritis autoinmunitaria y anemia perniciosa, hepatitis autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria y enfermedad celíaca), vasculitis (tal como, por ejemplo, vasculitis ANCA negativa y vasculitis asociada a ANCA, incluyendo vasculitis de Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener y poliangitis microscópica), trastornos neurológicos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, esclerosis múltiple, síndrome de mioclono opsoclono, miastenia grave, neuromielitis óptica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y polineuropatías autoinmunitarias), trastornos renales (tales como, por ejemplo, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture y enfermedad de Berger), trastornos dermatológicos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, psoriasis, urticaria, ronchas, pénfigo vulgar, penfigoide ampolloso y lupus eritematoso cutáneo), trastornos hematológicos (tales como, por ejemplo, púrpura trombocitopénica, púrpura trombocitopénica trombótica, púrpura posterior a la transfusión y anemia hemolítica autoinmunitaria), aterosclerosis, uveítis, enfermedades autoinmunitarias de la audición (tales como, por ejemplo, enfermedad del oído interno y pérdida de audición), enfermedad de Behcet, síndrome de Raynaud, trasplante de órganos y trastornos endocrinos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias relacionadas con la diabetes tales como diabetes mellitus insulinodependiente (DMID), enfermedad de Addison y enfermedad autoinmunitaria del tiroides (por ejemplo, enfermedad de Graves y tiroiditis)). Estas enfermedades más preferidas incluyen, por ejemplo, AR, colitis ulcerosa, vasculitis asociada a ANCA, lupus, esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren, enfermedad de Graves, DMID, anemia perniciosa, tiroiditis y glomerulonefritis.
- 50 La expresión “*agente citotóxico*” como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o provoca la destrucción de células. La expresión incluye isótopos radiactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radiactivos de Lu), y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.
- 55 Un “*agente quimioterapéutico*” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®); alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocuona, meturedopa y

uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetiloammina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilmcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; pemetrexed; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilílico; tenipósido; criptofincinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; TLK-286; CDP323, un inhibidor de integrina alfa 4 oral; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenepterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotomustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina gamma1 y calicheamicina omegal1 (véase, por ejemplo, Nicolaou et al., Angew. Chem. Int. Ed., 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enediina de cromoproteínas relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolina-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, inyección de liposoma de doxorrubicina HCl (DOXIL®) y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubricina; antimetabolitos tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pterofterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina e imatinib (un derivado de 2-fenilaminopirimidina), así como otros inhibidores de c-Kit; anti adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; desfofamina; demecolcina; diazicuona; el fornitinina; acetato de eliptinio; etoglúcidio; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; ionidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazina; complejo de polisacárido de PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espriegermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotriethylamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; pipobromán; gacitosina, arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulación de nanopartículas modificadas técnicamente con albúmina de paclitaxel (ABRAXANE™) y doxetaxel (TAXOTERE®), clorambucilo, 6-tioguanina; mercaptopurina, metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatin; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatin (ELOXATINT™) combinado con 5-FU y leucovovina. Un agente quimioterapéutico particularmente preferido útil en combinación con los anticuerpos anti PD-L1 de la invención, especialmente en el tratamiento de inmunidad tumoral es gemcitabina.

También se incluyen en la presente definición agentes antihormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer, y están con frecuencia en forma de tratamiento sistémico, o de cuerpo completo. Pueden ser hormonas en sí mismos. Los ejemplos incluyen antiestrógenos y moduladores del receptor de estrógenos selectivos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno (EVISTA®), droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON®); antiprogesteronas; reguladores negativos del receptor de estrógeno (ERD); antagonistas de receptor de estrógenos tales como fulvestrant (FASLODEX®); agentes que actúan para suprimir o detener el funcionamiento de los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) tales como acetato de leuprolide (LUPRON® y ELIGARD®), acetato de goserelina, acetato de buserelina y triptereolina; antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol (MEGASE®), exemestano (AROMASIN®), formestan, fadrozol, vorozol (RIVISOR®), letrozol (FEMARA®) y anastrozol (ARIMIDEX®). Además, dicha definición de agentes quimioterapéuticos incluye bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETÀ®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®) o risedronato (ACTONEL®); así como troxacicatina (un análogo de nucleósido citosina 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en la proliferación de células aberrantes, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales

como vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; inhibidor de topoisomerasa 1 (por ejemplo, LURTOTECAN®); un antiestrógeno tal como fulvestrant; un inhibidor de kit, tal como imatinib o EXEL-0862 (un inhibidor de tirosina quinasa); inhibidor de EGFR tal como erlotinib o cetuximab; un inhibidor anti VEGF tal como bevacizumab; irinotecán; RmRH (por ejemplo, ABARELIX®); lapatinib y ditosilato de lapatinib (un inhibidor de moléculas pequeñas de tirosina quinasa doble ErbB-2 y EGFR también conocido como GW572016); 17AAG (derivado de geldanamicina que es un veneno de proteína de choque térmico (Hsp) 90) y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

10 Un "agente inhibidor del crecimiento" se refiere a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula, dependiendo dicho crecimiento de la activación del receptor bien *in vitro* o bien *in vivo*. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento incluye uno que reduce significativamente el porcentaje de células dependientes de receptor en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes que inducen detención en G1 y detención en fase M. Los bloqueadores de fase M clásicos incluyen las vincas y los alcaloides de la vinca (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de topoisomerasa II tales como doxorrubicina, epirrubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen en G1 también se extienden a detención en fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse información adicional en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami *et al.* (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos antineoplásicos derivados ambos del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb).

15 20 25 30 35 40

El término "citocina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan en otra célula como mediadores intercelulares. Son ejemplos de dichas citocinas linfocinas, monocinas; interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15 ... IL-35, incluyendo PROLEUKIN® rIL-2; un factor de necrosis tumoral tal como TNF- α o TNF- β ; y otros factores polipeptídicos incluyendo LIF y ligando kit (KL), aunque el término "interleucina" se ha convertido esencialmente en un sinónimo de citocina. Como se usa en el presente documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa, incluyendo entidades de moléculas pequeñas producidas sintéticamente y derivados y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Las citocinas pueden clasificarse en la localización próxima de la diana pretendida, en la que *autocrina* se refiere a la acción en la misma célula de la que se secreta, *paracrina* se refiere a acción restringida a las cercanías inmediatas a donde se secreta la citocina y *endocrina* se refiere a la acción en regiones distantes del cuerpo. Las citocinas inmunitarias también pueden clasificarse por si potencian una respuesta de tipo I (por ejemplo, IFN- γ , TGF- β , etc.), lo que favorece la inmunidad celular o una respuesta de tipo II (IL-4, IL-10, IL-13, etc.), lo que favorece la inmunidad de anticuerpos o humoral. Las citocinas inmunitarias pueden desempeñar papeles en la coestimulación, maduración, proliferación, activación, inflamación, crecimiento, diferenciación, producción y secreción de citocinas, supervivencia de diversas células inmunitarias.

El término "hormona" se refiere a hormonas polipeptídicas, que son secretadas en general por órganos glandulares con conductos. Se incluyen entre las hormonas, por ejemplo, hormona del crecimiento tal como hormona del crecimiento humana, hormona del crecimiento humana N-metionilo y hormona del crecimiento bovina; hormona paratiroides; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; estradiol; terapia de reemplazo hormonal; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitiostano o testolactona; prorrelaxina; hormonas glucoproteicas tales como hormona folículo estimulante (FSH), hormona estimulante del tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); prolactina, lactógeno placentario, péptido asociado con gonadotropina de ratón, hormona liberadora de gonadotropina; inhibina; activina; sustancia inhibidora muleriana; y trombopoyetina. Como se usa en el presente documento, el término hormona incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de la hormona de secuencia nativa, incluyendo entidades de moléculas pequeñas producidas de forma sintética y derivados y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

III. Modos para llevar a cabo la invención

A. Humanización usando presentación en fagos

Las variantes con injertos de región hipervariable descritas en el presente documento se generaron por mutagénesis de Kunkel de ácido nucleico que codifica las secuencias aceptoras humanas, usando un oligonucleótido separado para cada región hipervariable. Kunkel *et al.*, Methods Enzymol. 154: 367-382 (1987). Pueden introducirse cambios apropiados dentro de la región marco conservada y/o hipervariable usando técnicas rutinarias, para corregir y restablecer interacciones de región hipervariable-antígeno apropiadas.

La presentación en fagos (o fagémidos) (también denominada en el presente documento presentación en fagos) puede usarse como un método conveniente y rápido para generar y explorar muchos anticuerpos variantes

potenciales diferentes en una biblioteca generada por selección aleatoria de secuencias. Sin embargo, están disponibles para los expertos en la materia otros métodos para preparar y explorar anticuerpos alterados.

- 5 La presentación en fagos (fagémidos) también denominada en el presente documento presentación en fagos en algunos contextos) puede usarse como un método conveniente y rápido para generar y explorar muchos anticuerpos variantes potenciales diferentes en una biblioteca generada por selección aleatoria de secuencia. Sin embargo, están disponibles para los expertos en la materia otros métodos para preparar y explorar anticuerpos alterados.
- 10 La tecnología de presentación en fagos (fagémidos) ha proporcionado una herramienta potente para generar y seleccionar nuevas proteínas que se unen con un ligando, tal como un antígeno. El uso de las técnicas de presentación en fagos (fagémidos) permite la generación de grandes bibliotecas de variantes proteicas que pueden clasificarse rápidamente con respecto a las secuencias que se unen con una molécula diana con alta afinidad. Los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos variantes se fusionan en general con una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de cubierta vírica, tal como la proteína del gen III o la proteína del gen VIII. Se han desarrollado sistemas de presentación en fagémidos monovalentes en los que la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína o el polipéptido se fusiona con una secuencia de ácido nucleico que codifica una parte de la proteína del gen III. (Bass, S., Proteins, 8: 309 (1990), Lowman y Wells, Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 3: 205 (1991)). En un sistema de presentación en fagémidos monovalentes, la fusión génica se expresa a niveles bajos y las proteínas de gen III de tipo silvestre también se expresan de modo que se conserve la infecciosidad de las partículas. Se han desvelado en muchas patentes métodos para generar bibliotecas peptídicas y explorar esas bibliotecas (por ejemplo Patente de Estados Unidos n.º 5.723.286, Patente de Estados Unidos n.º 5.432.088, Patente de Estados Unidos n.º 5.580.717, Patente de Estados Unidos n.º 5.427.908 y Patente de Estados Unidos n.º 5.498.530).
- 15 25 Se han preparado bibliotecas de anticuerpos o polipéptidos de unión a antígeno de varias maneras incluyendo mediante la alteración de un único gen por inserción de secuencias de ADN aleatorias o clonando una familia de genes relacionados. Se han descrito métodos para presentar anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno usando presentación en fagos (fagémidos) en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.750.373, 5.733.743, 5.837.242, 5.969.108, 6.172.197, 5.580.717 y 5.658.727. La biblioteca se explora después con respecto a expresión de anticuerpos o proteínas de unión a antígeno con las características deseadas.
- 30 35 40 Están bien establecidos en la técnica métodos para sustituir un aminoácido elegido en el ácido nucleico molde, algunos de los cuales se describen en el presente documento. Por ejemplo, los restos de región hipervariable pueden sustituirse usando el método de Kunkel. Véase, por ejemplo, Kunkel *et al.*, Methods Enzymol. 154: 367-382 (1987).
- La secuencia de oligonucleótidos incluye uno o más de los conjuntos de codones diseñados para alterar los restos de región hipervariable. Un conjunto de codones es un conjunto de secuencias de tripletes de nucleótidos diferentes usadas para codificar aminoácidos variantes deseados. Los conjuntos de codones pueden representarse usando símbolos para designar nucleótidos particulares o mezclas equimolares de nucleótidos como se muestra posteriormente de acuerdo con el código de la IUB (*International Union of Biochemistry*).

CÓDIGOS IUB

G (Guanina)	Y (C o T)	H (A o C o T)
A (Adenina)	M (A o C)	B (C o G o T)
T (Timina)	K (G o T)	V (A o C o G)
C (Citosina)	S (C o G)	D (A o G o T)
R (A o G)	W (A o T)	N (A o C o G o T)

Por ejemplo, en el conjunto de codones DVK, D puede ser los nucleótidos A o G o T; V puede ser A o G o C;

y K puede ser G o T. Este conjunto de codones puede presentar 18 codones diferentes y puede codificar los aminoácidos Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly y Cys.

- 45 50 Los conjuntos de oligonucleótidos o cebadores pueden sintetizarse usando métodos convencionales. Un conjunto de oligonucleótidos puede sintetizarse, por ejemplo, mediante síntesis de fase sólida, que contiene secuencias que representan todas las posibles combinaciones de tripletes de nucleótidos proporcionados por el conjunto de codones y que codificarán el grupo deseado de aminoácidos. La síntesis de oligonucleótidos con "degeneración" de nucleótidos seleccionada en ciertas posiciones se conoce bien en la técnica. Dichos conjuntos de nucleótidos que tienen ciertos conjuntos de codones pueden sintetizarse usando sintetizadores de ácidos nucleicos comerciales (disponibles de, por ejemplo, Applied Biosystems, Foster City, CA), o pueden obtenerse en el mercado (por ejemplo, de Life Technologies, Rockville, MD). Por lo tanto, un conjunto de oligonucleótidos sintetizados que tienen un conjunto de codones particular incluirá normalmente una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias,

estableciéndose las diferencias por el conjunto de codones dentro de la secuencia general. Los oligonucleótidos, como se usan de acuerdo con la invención, tienen secuencias que permiten la hibridación con un molde de ácido nucleico de dominio variable y también pueden incluir sitios de enzimas de restricción para fines de clonación.

- 5 En un método, pueden crearse secuencias de ácido nucleico que codifican aminoácidos variantes por mutagénesis mediada por oligonucleótidos. Esta técnica se conoce bien en este campo como se describe en Zoller *et al.* Nucleic Acids Res. 10: 6487-6504 (1987). Brevemente, se crean secuencias de ácido nucleico que codifican aminoácidos variantes hibridando un conjunto de oligonucleótidos que codifica los conjuntos de codones deseados con un molde de ADN, donde el molde es la forma monocatenaria del plásmido que contiene una secuencia molde de ácido nucleico de región variable. Después de la hibridación, se usa ADN polimerasa para sintetizar una segunda cadena complementaria del molde que de este modo incorporará el cebador oligonucleótido, y contendrá los conjuntos de codones como se proporcionan por el conjunto de oligonucleótidos.
- 10 En general, se usan oligonucleótidos de al menos 25 nucleótidos de longitud. Un oligonucleótido óptimo tendrá de 12 a 15 nucleótidos que son completamente complementarios del molde en uno de los lados del nucleótido o los nucleótidos que codifican la mutación o las mutaciones. Esto asegura que el oligonucleótido hibride apropiadamente con la molécula molde de ADN monocatenario. Los oligonucleótidos se sintetizan fácilmente usando técnicas conocidas en este campo tales como las descritas en Crea *et al.*, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 75: 5765 (1978).
- 15 20 El molde de ADN se genera por los vectores que derivan de vectores del bacteriófago M13 (los vectores M13mp18 y M13mp19 disponibles en el mercado son adecuados), o los vectores que contienen un origen de replicación de fago monocatenario como se describe en Viera *et al.*, Meth. Enzymol., 153: 3 (1987). Por lo tanto, el ADN para mutar puede insertarse en uno de estos vectores para generar un molde monocatenario. La producción del molde monocatenario se describe en las secciones 4.21-4.41 de Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente.
- 25 30 Para alterar la secuencia de ADN nativa, el oligonucleótido se hibrida con el molde monocatenario en condiciones de hibridación adecuadas. Una enzima de polimerización de ADN, habitualmente ADN polimerasa T7 o el fragmento Klenow de ADN polimerasa I, se añade después para sintetizar la cadena complementaria del molde usando el oligonucleótido como un cebador para síntesis. Se forma de este modo una molécula de heterodúplex de modo que una cadena de ADN codifique la forma mutada del gen 1, y la otra cadena (el molde original) codifique la secuencia nativa, inalterada, del gen 1. Esta molécula de heterodúplex se transforma después en una célula hospedadora adecuada, habitualmente un procariota tal como *E. coli* JM101. Después de cultivar las células, estas se siembran en placas de agarosa y se exploran usando el cebador oligonucleotídico radiomarcado con un ³²-Fosfato para identificar las colonias bacterianas que contienen el ADN mutado.
- 35 40 El método descrito inmediatamente antes puede modificarse de modo que se cree una molécula de homodúplex en la que ambas cadenas del plásmido contienen la mutación o las mutaciones. Las modificaciones son las siguientes: el oligonucleótido monocatenario se hibrida con el molde monocatenario como se ha descrito anteriormente. Se combina una mezcla de tres desoxirribonucleótidos, desoxirriboadenosina (dATP), desoxirriboguanosina (dGTP) y desoxirribotimidina (dTTP) con una tiodesoxirribocitosina modificada denominada dCTP-(aS) (que puede obtenerse de Amersham). Esta mezcla se añade al complejo de molde-oligonucleótido. Tras la adición de ADN polimerasa a esta mezcla, se genera una cadena de ADN idéntica al molde excepto por las bases mutadas. Además, esta nueva cadena de ADN contendrá dCTP-(aS) en lugar de dCTP, que actúa para protegerla de digestión con endonucleasas de restricción. Después de cortarse la cadena molde del heterodúplex bicatenario con una enzima de restricción apropiada, la cadena molde puede digerirse con nucleasa ExoIII u otra nucleasa apropiada para cortar en una región distinta de la que contiene el sitio o los sitios para mutar. La reacción se detiene después para dejar una molécula que es solamente parcialmente monocatenaria. Después se forma un homodúplex de ADN bicatenario completo usando ADN polimerasa en presencia de los cuatro desoxirribonucleótido trifosfatos, ATP y ADN ligasa. Esta molécula de homodúplex puede después transformarse en una célula hospedadora adecuada.
- 45 50 Como se ha indicado previamente, la secuencia del conjunto de oligonucleótidos es de suficiente longitud para hibridar con el ácido nucleico molde y también puede contener, aunque no es necesario, sitios de restricción. El molde de ADN puede generarse por los vectores que derivan de vectores de bacteriófago M13 o vectores que contienen un origen de replicación de fago monocatenario como se describe en Viera *et al.* Meth. Enzymol., 153: 3 (1987). Por lo tanto, el ADN para mutar debe insertarse en uno de estos vectores para generar un molde monocatenario. La producción del molde monocatenario se describe en las secciones 4.21-4.41 de Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente.
- 55 60 De acuerdo con otro método, puede generarse una biblioteca proporcionando conjuntos de oligonucleótidos cadena arriba y cadena abajo, teniendo cada conjunto una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, las diferentes secuencias establecidas por los conjuntos de codones proporcionados dentro de la secuencia de los oligonucleótidos. Los conjuntos de oligonucleótidos cadena arriba y cadena abajo, junto con una secuencia de ácido nucleico molde de dominio variable, pueden usarse en una reacción en cadena de la polimerasa para generar una "biblioteca" de productos de PCR. Los productos de PCR pueden denominarse "casetes de ácido nucleico", ya que pueden fusionarse con otras secuencias de ácido nucleico relacionadas o no relacionadas, por ejemplo, proteínas de cubierta vírica y dominios de dimerización, usando técnicas de biología molecular establecidas.
- 65

La secuencia de los cebadores de PCR incluye uno o más de los conjuntos de codones diseñados para las posiciones accesibles al disolvente y altamente diversas en una región hipervariable. Como se ha descrito anteriormente, un conjunto de codones es un conjunto de diferentes secuencias de tripletes de nucleótidos usadas para codificar aminoácidos variantes deseados. Los seleccionadores de anticuerpos que cumplen los criterios deseados, como se selecciona mediante etapas de selección/exploración apropiadas pueden aislarse y clonarse usando técnicas recombinantes convencionales.

5 **B. Preparación recombinante**

10 En el presente documento también se desvela un ácido nucleico aislado que codifica anticuerpos anti PD-L1, vectores y células hospedadoras que comprenden dicho ácido nucleico, y técnicas recombinantes para la producción del anticuerpo.

15 Para producción recombinante del anticuerpo, el ácido nucleico que lo codifica se aísla y se inserta en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo monoclonal se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente con genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. La elección del vector depende en parte de la célula hospedadora que se use. En general, las células hospedadoras preferidas son de origen procariota o eucariota (en general de mamífero).

20 **1. Producción de anticuerpos en células procariotas**

25 **a) *Construcción de vectores***

30 Pueden obtenerse secuencias polinucleotídicas que codifican componentes polipéptidos de los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención usando técnicas recombinantes convencionales. Pueden aislarse y secuenciarse secuencias polinucleotídicas deseadas a partir de células productoras de anticuerpos tales como células de hibridoma. Como alternativa, pueden sintetizarse polinucleótidos usando técnicas de PCR o sintetizador de nucleótidos. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en hospedadores procariotas. Muchos vectores que están disponibles y se conocen en la técnica pueden usarse para el fin de la presente invención. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos para insertar en el vector y la célula hospedadora particular para transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótido heterólogo, o ambas) y su compatibilidad con la célula hospedadora particular en la que reside. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero sin limitación: un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión a ribosomas (RBS), una secuencia señal, el inserto de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

40 En general, se usan vectores plasmídicos que contienen secuencias de replicón y de control que derivan de especies compatibles con la célula hospedadora en relación con estos hospedadores. El vector porta habitualmente un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma normalmente usando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. PBR322 contiene genes que codifican resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y por tanto proporciona un medio fácil para identificar células transformadas. PBR322, sus derivados, u otros plásmidos microbianos o bacteriófagos también pueden contener, o modificarse para contener, promotores que pueden usarse por el organismo microbiano para expresión de proteínas endógenas. Se describen en detalle ejemplos de derivados de pBR322 usados para expresión de anticuerpos particulares en detalle en Carter *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.648.237.

50 Además, pueden usarse vectores de fagos que contienen secuencias de replicón y de control que son compatibles con el microorganismo hospedador como vectores transformantes en relación con estos hospedadores. Por ejemplo, pueden utilizarse bacteriófagos tales como GEMTM-11 en la preparación de un vector recombinante que puede usarse para transformar células hospedadoras susceptibles tales como *E. coli* LE392.

55 El vector de expresión puede comprender dos o más pares de promotor-cistrón, que codifican cada uno de los componentes polipeptídicos. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida localizada cadena arriba (5') de un cistrón que modula su expresión. Los promotores procariotas normalmente se clasifican en dos clases, inducibles y constitutivos. El promotor inducible es un promotor que inicia niveles aumentados de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en las condiciones de cultivo, por ejemplo la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio de temperatura.

65 Se conoce bien un gran número de promotores reconocidos por una diversidad de células hospedadoras potenciales. El promotor seleccionado puede unirse operativamente con ADN cistrónico que codifica la cadena ligera o pesada retirando el promotor del ADN fuente mediante digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia promotora aislada en el vector. Tanto la secuencia promotora nativa como muchos promotores

heterólogos pueden usarse para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. Pueden utilizarse promotores heterólogos, ya que generalmente permiten mayor transcripción y mayores rendimientos del gen diana expresado en comparación con el promotor polipeptídico diana nativo.

- 5 Los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen el promotor de PhoA, los sistemas
 10 promotores de galactamasa y lactosa, un sistema de promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor *tac* o *trc*. Sin embargo, también son adecuados otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacterianos o de fagos conocidos). Sus secuencias de nucleótidos se han publicado, permitiendo de este modo que un experto en la materia los una operativamente con cistrones que codifiquen las cadenas ligeras y pesadas diana (Siebenlist *et al.* (1980) Cell 20: 269) usando enlazadores o adaptadores para proporcionar cualquier sitio de restricción requerido.

Cada cistrón dentro del vector recombinante puede comprender un componente de secuencia señal de secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser parte del ADN del polipéptido diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada para el fin de la presente invención debería ser una que sea reconocida y procesada (es decir escindida por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. Para células hospedadoras procariotas que no reconocen y procesan las secuencias señal nativas de los polipéptidos heterólogos, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en fosfatasa alcalina, penicilinasa, Ipp, o líderes de enterotoxina termoestable II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. Las secuencias señal usadas en ambos cistrones del sistema de expresión pueden ser secuencias señal de STII o variantes de las mismas.

25 La producción de los anticuerpos anti-PD-L1 de acuerdo con la invención, puede producirse en el citoplasma de la célula hospedadora, y por lo tanto no requiere la presencia de secuencias señal de secreción dentro de cada cistrón. A este respecto, se expresan cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina, se pliegan y se ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales dentro del citoplasma. Ciertas cepas hospedadoras (por ejemplo, las cepas de *E. coli* *trxB*) proporcionan condiciones de citoplasma que son favorables para la formación de enlaces disulfuro, permitiendo de este modo el plegamiento y ensamblaje apropiado de subunidades proteicas expresadas. Proba y
 30 Pluckthun Gene, 159: 203 (1995).

35 En el presente documento también se desvela un sistema de expresión en el que la relación cuantitativa de componentes polipeptídicos expresados puede modularse para maximizar el rendimiento de anticuerpos secretados y ensamblados de forma apropiada de la invención. Dicha modulación se consigue al menos en parte modulando simultáneamente las fuerzas de traducción para los componentes polipeptídicos.

40 Se desvela una técnica para modular la fuerza de traducción en Simmons *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.840.523. Utiliza variantes de la región de inicio de la traducción (TIR) dentro de un cistrón. Para una TIR dada, puede crearse una serie de variantes de secuencias de aminoácidos o ácido nucleico con una serie de fuerzas de traducción, proporcionando de este modo un medio conveniente por el que ajustar este factor para el nivel de expresión deseado de la cadena específica. Pueden generarse variantes de TIR por técnicas de mutagénesis convencional que dan como resultado cambios de codones que pueden alterar la secuencia de aminoácidos, aunque se prefieren cambios silenciosos en la secuencia de nucleótidos. Las alteraciones en la TIR pueden incluir, por ejemplo, alteraciones en el número o la separación de secuencias de Shine-Dalgarno, junto con alteraciones en la secuencia señal. Un método para generar secuencias señal mutantes es la generación de un "banco codónico" al comienzo de una secuencia codificante que no cambia la secuencia de aminoácidos de la secuencia señal (es decir, los cambios son silenciosos). Esto puede conseguirse cambiando la tercera posición de nucleótido de cada codón; adicionalmente, algunos aminoácidos, tales como leucina, serina y arginina, tienen múltiples primera y segunda posiciones que pueden añadir complejidad al preparar el banco. Este método de mutagénesis se describe en detalle en Yansura *et al.* (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4: 151-158.

55 Preferentemente, se genera un conjunto de vectores con un intervalo de fuerzas de TIR para cada cistrón en el mismo. Este conjunto limitado proporciona una comparación de niveles de expresión de cada cadena así como el rendimiento de los productos de anticuerpo deseados con diversas combinaciones de fuerza de TIR. Las fuerzas de TIR pueden determinarse cuantificando el nivel de expresión de un gen indicador como se describe en detalle en Simmons *et al.* Patente de Estados Unidos n.º 5.840.523. Basándose en la comparación de fuerza de traducción, las TIR individuales deseadas se seleccionan para combinar en las construcciones de vector de expresión de la invención.

60 b) *Células hospedadoras procariotas.*

65 Las células hospedadoras procariotas adecuadas para expresar anticuerpos anti-PD-L1 de la invención incluyen Arqueobacterias y Eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos. Los ejemplos de bacterias útiles incluyen *Escherichia* (por ejemplo *E. coli*), Bacilos (por ejemplo, *B. subtilis*), Enterobacterias, especies de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* o *Paracoccus*. Pueden utilizarse células gram negativas. Pueden utilizarse células de

E. coli como hospedadores para la invención. Los ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen la cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1987), págs. 1190-1219; n.º de Depósito de ATCC 27.325) y derivados de la misma, incluyendo la cepa 33D3 que tiene genotipo W3110 *ÿfhuA* (*ÿtonA*) *pfr3 lac Iq lacL8 ÿompT*_Y(*nmpc-fepE*) *degP41 kan*^R (Patente de Estados Unidos n.º 5.639.635).

5 Otras cepas y derivados de las mismas, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31.608) también son adecuados. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes. Se conocen en la técnica métodos para construir derivados de cualquiera de las bacterias anteriormente mencionadas que tienen genotipos definidos y se describen, por ejemplo, en Bass *et al.*, Proteins, 8: 309-314 (1990). Es necesario en general seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en consideración la capacidad de replicación del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, pueden usarse convenientemente especies de *E. coli*, *Serratia* o *Salmonella* como el hospedador cuando se usen plásmidos conocidos tales como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 para proporcionar el replicón.

10 Normalmente la célula hospedadora debería secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas, y pueden incorporarse convenientemente inhibidores de proteasa adicionales en el cultivo celular.

15 c) *Producción de anticuerpos*

20 Se transforman células hospedadoras con los vectores de expresión anteriormente descritos y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. La transformación significa introducir ADN en el hospedador procariota de modo que el ADN sea replicable, bien como un elemento extracromosómico o bien mediante integrante cromosómico. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se realiza usando técnicas convencionales apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro cálcico se usa en general para células bacterianas que contengan barreras de paredes celulares sustanciales. Otro método para transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Otra técnica más usada es la electroporación.

25 Las células procariotas usadas para producir los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención se cultivan en medios conocidos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células hospedadoras seleccionadas. Los ejemplos de medios adecuados incluyen caldo de cultivo Iuria (LB) más complementos nutrientes necesarios. Los medios también pueden contener un agente de selección, elegido basándose en la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el crecimiento de células procariotas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina a medios para cultivo de células que expresan gen resistente a ampicilina.

30 También puede incluirse cualquier complemento necesario además de carbono, nitrógeno y fuentes de fosfato inorgánico a concentraciones apropiadas introducidas solas o como una mezcla con otro complemento o medio tal como una fuente de nitrógeno compleja. Opcionalmente el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol y ditiotreitol.

35 40 Las células hospedadoras procariotas se cultivan a temperaturas adecuadas. Para cultivo de *E. coli*, por ejemplo, la temperatura preferida varía de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 39 °C, más preferentemente de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 37 °C, aún más preferentemente a aproximadamente 30 °C. El pH del medio puede ser cualquier pH que varíe de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo hospedador. Para *E. coli*, el pH es preferentemente de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4, y más preferentemente de aproximadamente 7,0.

45 50 Si se usa un promotor inducible en el vector de expresión de la invención, se induce expresión de proteínas en condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un aspecto de la invención, se usan promotores de PhoA para controlar la transcripción de los polipéptidos. En consecuencia, las células hospedadoras transformadas se cultivan en un medio con fosfato limitante para inducción. Preferentemente, el medio con fosfato limitante es el medio C.R.A.P (véase, por ejemplo, Simmons *et al.*, J. Immunol. Methods (2002), 263: 133-147). Puede usarse una diversidad de inductores adicionales, de acuerdo con la construcción de vector empleada, como se conoce en la técnica.

55 60 Las proteínas de anticuerpos expresadas pueden secretarse en periplasma de las células hospedadoras y recuperarse del mismo. La recuperación de proteínas normalmente implica alterar el microorganismo, generalmente por medios tales como choque osmótico, ultrasonidos o lisis. Una vez que las células se alterado, los residuos celulares o las células completas pueden retirarse por centrifugación o filtración. Las proteínas pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, mediante cromatografía de resina de afinidad. Como alternativa, las proteínas pueden transportarse al medio de cultivo y aislarse en el mismo. Las células pueden retirarse del cultivo y el sobrenadante de cultivo que se filtra y se concentra para purificación adicional de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden aislarse e identificarse adicionalmente usando métodos conocidos habitualmente tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de transferencia de Western.

65 Como alternativa, la producción de anticuerpos se realiza en gran cantidad por un proceso de fermentación. Están disponibles diversos procedimientos de fermentación semicontinuos a gran escala para producción de proteínas

recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1000 litros de capacidad, Preferentemente de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores usan impulsores agitadores para distribuir oxígeno y nutrientes, especialmente glucosa (la fuente de carbono/energía preferida). La fermentación a pequeña escala se refiere en general a fermentación en un fermentador que no tiene más de 5 aproximadamente 100 litros de capacidad volumétrica, y puede variar de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

Durante el proceso de fermentación, la inducción de la expresión de proteína se inicia normalmente después de haberse cultivado las células en condiciones adecuadas hasta una densidad deseada, por ejemplo, una DO₅₅₀ de 10 aproximadamente 180-220, en cuyo estadio las células están en la fase estacionaria temprana. Puede usarse una diversidad de inductores, de acuerdo con la construcción de vector empleada, como se conoce en la técnica y como se ha descrito anteriormente. Las células pueden cultivarse durante períodos más cortos antes de la inducción. Las células se inducen habitualmente durante aproximadamente 12-50 horas, aunque puede usarse un tiempo de 15 inducción más largo o más corto.

Para mejorar el rendimiento y la calidad de producción de los anticuerpos de la invención, pueden modificarse 20 diversas condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje y plegamiento apropiado de los polipéptidos de anticuerpos secretados, pueden usarse vectores adicionales que sobreexpresan proteínas chaperonas, tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y/o DsbG) o FkpA (una peptidilpropil cis, trans-isomerasa con actividad chaperona) para cotransformar las células procariotas hospedadoras. Se ha demostrado 25 que las proteínas chaperonas facilitan el plegamiento y la solubilidad apropiados de proteínas heterólogas producidas en células hospedadoras bacterianas. Chen *et al.* (1999) J Bio Chem 274: 19601-19605; Georgiou *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 6.083.715; Georgiou *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 6.027.888; Bothmann y Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275: 17100-17105; Ramm y Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275: 17106-17113; Arie *et al.* (2001) Mol. Microbiol. 39: 199-210.

Para minimizar la proteólisis de proteínas heterólogas expresadas (especialmente las que son proteolíticamente sensibles), ciertas cepas hospedadoras deficientes para enzimas proteolíticas pueden usarse para la presente 30 invención. Por ejemplo, pueden modificarse cepas de células hospedadoras para efectuar una mutación o mutaciones genéticas en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas tales como proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, proteasa I, proteasa Mi, proteasa V, proteasa VI y combinaciones de las mismas. Dichas cepas deficientes en proteasa de *E. coli* están disponibles y se describen en, por ejemplo, Joly *et al.* (1998), mencionado anteriormente; Georgiou *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.264.365; Georgiou *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.508.192; Hara *et al.*, Microbial Drug Resistance, 2: 63-72 (1996).

35 Pueden usarse cepas de *E. coli* deficientes para enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas chaperonas como células hospedadoras en el sistema de expresión que codifica los anticuerpos de la invención.

40 d) *Purificación de anticuerpos*

La proteína de anticuerpo producida en el presente documento se purifica adicionalmente para obtener 45 preparaciones que son sustancialmente homogéneas para ensayos y usos adicionales. Pueden emplearse métodos de purificación de proteínas convencionales conocidos en la técnica. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico tal como DEAE, cromatoenfoque, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75.

50 En un aspecto, la Proteína A inmovilizada en una fase sólida se usa para purificación de inmunoafinidad de los productos de anticuerpo de longitud completa de la invención. La Proteína A es una proteína de la pared celular de 41 kD de *Staphylococcus aureus* que se une con alta afinidad con la región Fc de anticuerpos. Lindmark *et al.* (1983) J. Immunol. Meth. 62: 1-13. La fase sólida en la que se inmoviliza la Proteína A es preferentemente una columna que comprende una superficie de vidrio o sílice, más preferentemente una columna de vidrio de poro controlado o 55 una columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna se ha recubierto con un reactivo, tal como glicerol, en un intento de impedir la adherencia no específica de contaminantes. La fase sólida se lava después para retirar contaminantes unidos de forma no específica con la fase sólida. Finalmente el anticuerpo de interés se recupera de la fase sólida por elución.

60 2. *Producción de anticuerpos en células eucariotas*

Para expresión eucariota, los componentes de vector generalmente incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes, una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores y un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

65 a) *Componente de secuencia señal*

Un vector para su uso en un hospedador eucariota también puede tener un inserto que codifica una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N terminal de la proteína o el polipéptido maduro. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferentemente es una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. En expresión de células de mamífero, están disponibles secuencias señal de mamífero así como líderes secretores víricos, por ejemplo, la señal gD del herpes simple.

El ADN para dicha región precursora se liga en fase de lectura con ADN que codifica los anticuerpos de la invención.

10 *b) Origen de replicación*

En general, el componente de origen de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamíferos (el origen de SV40 puede usarse normalmente tan solo porque contiene el promotor temprano).

15 *c) Componente de gen de selección*

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas o (c) proporcionan nutrientes críticos no disponibles del medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa para Bacilos.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Las células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármacos y por lo tanto sobreviven al régimen de selección. Ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son los que permiten la identificación de células competentes para captar ácido nucleico que codifica los anticuerpos de la invención, tales como DHFR, timidina quinasa, metalotioneína-I y -II, preferentemente genes de metalotioneína de primates, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, se identifican en primer lugar células transformadas con el gen de selección de DHFR cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula hospedadora apropiada cuando se emplea DHFR de tipo silvestre es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

Como alternativa, pueden seleccionarse células hospedadoras (particularmente hospedadores de tipo silvestre que contienen DHFR endógeno) transformadas o cotransformadas con las secuencias de ADN codificantes del anticuerpo, proteína DHFR de tipo silvestre y otro marcador seleccionable tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) por cultivo celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglucósido, por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418. Véase Patente de Estados Unidos n.º 4.965.199.

45 *d) Componente de promotor*

Los vectores de expresión y clonación habitualmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo hospedador y está unido operativamente con el ácido nucleico que codifica las secuencias de anticuerpo deseadas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases cadena arriba del sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia hallada de 70 a 80 bases cadena arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola de poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias pueden insertarse en vectores de expresión eucariotas.

55 Otros promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen el promotor de phoA, sistemas promotores de lactamasa y lactosa, promotor de fosfatasa alcalina, un promotor de triptófano (trp) y promotores híbridos tales como el promotor de tac. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente con el ADN que codifica el polipéptido del anticuerpo.

65 La transcripción de polipéptidos de anticuerpos a partir de vectores en células hospedadoras de mamífero está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus del poliomavirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y más preferentemente Virus de Simio 40 (SV40), de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de

promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras.

5 Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación vírico de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E. Se desvela un sistema para expresar ADN en hospedadores de mamífero usando el virus del papiloma bovino como un vector en la Patente de Estados Unidos n.º 4.419.446. Se describe una modificación de este sistema en la Patente de Estados Unidos n.º 4.601.978. Véase también Reyes *et al.*, Nature 297: 598-601 (1982) sobre la expresión de ADNc de interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa de virus del herpes simple. Como alternativa, la repetición terminal larga del virus de Sarcoma de Rous puede usarse como promotor.

10 15 e) Componente de elemento potenciador

15 La transcripción de un ADN que codifica los anticuerpos de la presente invención por eucariotas superiores se aumenta con frecuencia insertando una secuencia potenciadora en el vector. Se conocen ahora muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α-fetoproteína e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador a partir de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliomielitis en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) sobre elemento potenciadores para activación de promotores eucariotas. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia codificante del anticuerpo, pero está preferentemente localizado en un sitio 5' del promotor.

20 25 f) Componente de terminación de la transcripción

25 Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (células de levadura, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente de las regiones no traducidas 5', y ocasionalmente 3', de ADN o ADNc eucariotas o víricos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión desvelado en el mismo.

30 35 g) Selección y transformación de células hospedadoras

35 Las células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores del presente documento incluyen células eucariotas superiores descritas en el presente documento, incluyendo células hospedadoras de vertebrados. La propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Son ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamíferos útiles la línea de CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol., 36: 59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster Chino/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N. Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

40 45 50 55 Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o clonación anteriormente descritos para producción de anticuerpos y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Son ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles

h) Cultivo de las células hospedadoras

60 65 Las células hospedadoras usadas para producir el anticuerpo de la presente invención pueden cultivarse en una diversidad de medios. Son adecuados para cultivar las células hospedadoras medios disponibles en el mercado tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma). Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes *et al.*, Anal. Biochem. 102: 255 (1980), Patentes de Estados Unidos n.º 4.767.704, 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o Patente de Estados Unidos Re. 30.985 pueden usarse como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina,

transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes en concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro complemento necesario a concentraciones apropiadas que conocerían los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las previamente usadas con la célula hospedadora seleccionada para expresión, y resultarán evidentes para el experto habitual en la materia.

5 *i) Purificación de anticuerpos*

10 Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse de forma intracelular, en el espacio periplásmico o secretarse directamente al medio. Si el anticuerpo se produce de forma intracelular, como una primera etapa, los residuos en partículas, bien de células hospedadoras o bien de fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, Bio/Technology 10: 163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. Brevemente, la pasta celular se descongela en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fenilmetsulfonilfluoruro (PMSF) durante aproximadamente 30 minutos. Los residuos celulares pueden retirarse por centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se concentran en primer lugar en general usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para impedir el crecimiento de contaminantes adventicios.

15 La composición de anticuerpos preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La conveniencia de la proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que se basan en inmunoglobulinas humanas que contienen 1, 2, o 4 cadenas pesadas (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). La proteína G está recomendada para todos los isotipos de ratón y para 3 humana (Guss *et al.*, EMBO J. 5: 1567-1575 (1986)). La matriz con la que se une el ligando de afinidad es con más frecuencia agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estireno-divinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden conseguirse con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para purificación. 20 30 35

También se dispone de otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina, cromatografía de SEPHAROSE™ en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliásptico), cromatoenfoque, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio, dependiendo del anticuerpo que se vaya a recuperar.

40 Después de cualquier etapa o etapas de purificación preliminares, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba de pH bajo usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5 y 4,5, preferentemente realizada a concentraciones salinas bajas (por ejemplo, de sal aproximadamente 0-0,25 M).

45 C. Preparación de anticuerpos

1) *Anticuerpos policionales*

50 Se inducen generalmente anticuerpos policionales en animales por múltiples inyecciones subcutáneas (s.c.) o intraperitoneales (i.p.) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante con una proteína que sea inmunogénica en la especie que se va a inmunizar, por ejemplo, con hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja, usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoin sulfosuccinimida (conjugación mediante restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (mediante restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 o $\text{R}^1\text{N} = \text{C} = \text{NR}$, donde R y R^1 son de forma independiente grupos alquilo inferiores. Los ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM (monofosforil Lípido A, trehalosa dicitrionomicolato sintético). Un experto en la materia sin experimentación indebida puede seleccionar el protocolo de inmunización.

60 Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados, combinando, por ejemplo, 100 µg o 5 µg de la proteína o del conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes después, los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original del péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund por inyección subcutánea en sitios múltiples. De siete a catorce días después, se toman muestras sanguíneas de los animales y se ensaya el suero con respecto a títulos de anticuerpos. Los animales se refuerzan

hasta que el título se estabiliza. También pueden prepararse conjugados en cultivo celular recombinante como fusiones proteicas. Además, para potenciar la respuesta inmunitaria, son adecuados agentes agregantes, tal como alumbré.

5 2) *Anticuerpos monoclonales*

Se obtienen anticuerpos monoclonales a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural y/o modificaciones postraduccionales (por ejemplo, isomerizaciones, amidaciones) que pueden estar presentes en cantidades menores. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica como el carácter del anticuerpo que no está en una mezcla de anticuerpos discretos.

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando el método de hibridoma descrito en primer lugar en Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975), o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567).

En el método de hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster, se inmuniza como se ha descrito anteriormente en el presente documento para inducir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente con la proteína usada para inmunización. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Los linfocitos se fusionan después con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)).

El agente de inmunización incluirá normalmente la proteína antigénica o una variante de fusión de la misma. En general se usan linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o se usan células del bazo o células de ganglios linfáticos si se desean fuentes de mamífero no humanas. Los linfocitos se fusionan después con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Coding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press (1986), págs. 59-103.

Las líneas celulares inmortalizadas son habitualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen de roedor, bovino y humano. Habitualmente, se emplean líneas celulares de mieloma de ratón o rata. Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales, no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), que son las sustancias que evitan el crecimiento de células deficientes en HPRT.

Son células de mieloma inmortalizadas preferidas las que se fusionan eficazmente, soportan la producción a alto nivel estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre estas, se prefieren líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Centro de Distribución Celular del Instituto Salk, San Diego, California, EE.UU. y células SP-2 (y derivados de las mismas, por ejemplo X63-Ag8-653) disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, Virginia, EE.UU. También se han descrito líneas celulares de mieloma de ratón y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984), Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el que se cultivan células de hibridoma se ensaya con respecto a producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma puede ensayarse con respecto a la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno deseado. Preferentemente, la afinidad y especificidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse por inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo ligado a enzimas (ELISA). Dichas técnicas y dichos ensayos se conocen en este campo. Por ejemplo, la afinidad de unión puede determinarse por el análisis de Scatchard de Munson *et al.*, Anal. Biochem., 107: 220 (1980).

Después de identificarse las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los subclones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y cultivarse por métodos convencionales (Goding, mencionado anteriormente). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan convenientemente del medio de cultivo, líquido ascítico o suero por procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

5 También pueden prepararse anticuerpos monoclonales por métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567 y como se ha descrito anteriormente. Se aísla fácilmente ADN que codifica los anticuerpos monoclonales y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente con genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma actúan como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se transfecan en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células de COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otro modo proteína inmunoglobulina, para sintetizar anticuerpos monoclonales en dichas células hospedadoras recombinantes. Los artículos de revisión sobre expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra *et al.*, Curr. Opinion in Immunol., 5: 256-262 (1993) y Plückthun, Immunol. Revs. 130: 151-188 (1992).

10 20 25 Los anticuerpos pueden aislar de fagotecas de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, Nature, 348: 552-554 (1990). Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) por redistribución de cadenas (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10: 779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir fagotecas muy grandes (Waterhouse *et al.*, Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993)). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales para aislamiento de anticuerpos monoclonales.

30 35 El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567, Morrison *et al.*, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81: 6851 (1984)), o uniendo covalentemente con la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido distinto de inmunoglobulina. Normalmente, dichos polipéptidos distintos de inmunoglobulina sustituyen los dominios constantes de un anticuerpo, o sustituyen los dominios variables de un sitio de combinación con antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente químérico que comprende un sitio de combinación con antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación con antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

40 45 50 Los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento pueden ser monovalentes, cuya preparación se conoce bien en la técnica. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de cadena ligera de inmunoglobulina y una cadena pesada modificada. La cadena pesada se trunca en general en cualquier punto en la región Fc para impedir la reticulación de cadena pesada. Como alternativa, los restos de cisteína relevantes pueden sustituirse con otro resto de aminoácido o se suprimen para impedir la reticulación. Los métodos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente fragmentos Fab, puede conseguirse usando técnicas rutinarias conocidas en este campo.

También pueden prepararse anticuerpos químéricos o híbridos *in vitro* usando métodos conocidos en química de proteínas sintética, incluyendo los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptopbutirimidato.

3) Anticuerpos humanizados.

55 60 65 Los anticuerpos de la invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas químéricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las se reemplazan restos de una región determinante de complementariedad (CDR) (HVR como se usa en el presente documento) por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como un ratón, una rata o un conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, se reemplazan restos de marco conservado de Fv de la inmunoglobulina humana por restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o marco conservado importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una

inmunoglobulina humana. Jones *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332: 323-329 (1988) y Presta, Curr. Opin. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992).

En la técnica se conocen bien métodos para humanizar anticuerpos no humanos. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan con frecuencia restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores, Jones *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332: 323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, Science 239: 1534-1536 (1988) o mediante sustitución de CDR de roedor o secuencias de CDR para las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos químéricos (Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se han sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que se sustituyen algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método denominado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que es más cercana a la del roedor se acepta después como el marco conservado (FR) humano para el anticuerpo humanizado. Sims *et al.*, J. Immunol., 151: 2296 (1993); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196: 901 (1987). Otro método usa un marco conservado particular derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco conservado puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes. Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 151: 2623 (1993).

Es importante además que los anticuerpos se humanicen con conservación de alta afinidad del antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método preferido, se preparan anticuerpos humanizados por un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Están disponibles habitualmente modelos de inmunoglobulina tridimensionales y los expertos en la materia están familiarizados con ellos. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse con su antígeno. De esta manera, los restos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias receptora y de importación de modo que se consiga la característica de anticuerpo deseada, tal como afinidad aumentada por el antígeno o los antígenos diana. En general, los restos de CDR están implicados directa y más sustancialmente en la influencia en la unión a antígeno.

Se contemplan diversas formas del anticuerpo humanizado. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, que está conjugado opcionalmente con uno o más agentes citotóxicos para generar un inmunoconjunto. Como alternativa, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

4) Anticuerpos humanos

Como alternativa a la humanización, pueden generarse anticuerpos humanos. Por ejemplo, es posible ahora producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras su inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homocigota del gen de la región de unión a cadena pesada (J_H) del anticuerpo en ratones mutantes químéricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362: 255-258 (1993); Brugemann *et al.*, Year in Immuno., 7: 33 (1993); Patentes de Estados Unidos n.º 5.591.669 y documento WO 97/17852.

Como alternativa, puede usarse tecnología de presentación en fagos para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. McCafferty *et al.*, Nature 348: 552-553 (1990); Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol. 227: 381 (1991). De acuerdo con esta técnica, los genes de dominio V del anticuerpo se cloran en fase en un gen de proteína recubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se presenta como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosos contiene una copia de ADN monocatenaria del genoma de fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra

esas propiedades. Por lo tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. Puede realizarse presentación en fagos en una diversidad de formatos, revisados en, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Curr. Opin Struct. Biol. 3: 564-571 (1993). Pueden usarse varias fuentes de segmentos de gen V para presentación en fagos. Clackson *et al.*, Nature 352: 624-628 (1991) aislaron una serie diversa de anticuerpos anti oxazolona a partir de una biblioteca combinatoria aleatoria pequeña de genes V derivados de los bazos de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V a partir de donantes humanos no inmunizados y pueden aislarse anticuerpos para una serie diversa de antígenos (incluyendo autoantígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas en Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991), o Griffith *et al.*, EMBO J. 12: 725-734 (1993). Véase también, Patentes de Estados Unidos n.º 5.565.332 y 5.573.905.

Las técnicas de Cole *et al.*, y Boerner *et al.*, también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner *et al.*, J. Immunol. 147(1): 86-95 (1991)). De forma similar, pueden prepararse anticuerpos humanos introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o completamente. Tras la exposición, se observa producción de anticuerpos humanos, que se asemeja estrechamente a la vista en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo la reordenación génica, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016 y en las siguientes publicaciones científicas: Marks *et al.*, Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-13 (1994), Fishwild *et al.*, Nature Biotechnology 14: 845-51 (1996), Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996) y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995).

Finalmente, también pueden generarse anticuerpos humanos *in vitro* mediante células B activadas (véase Patentes de Estados Unidos n.º 5.567.610 y 5.229.275).

5) Fragmentos de anticuerpos

En ciertas circunstancias es ventajoso el uso de fragmentos de anticuerpos, en lugar de anticuerpos completos. Los tamaños de fragmentos más pequeños permiten la eliminación rápida y pueden conducir a acceso mejorado a tumores sólidos.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se han obtenido mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, J Biochem Biophys. Method. 24: 107-117 (1992); y Brennan *et al.*, Science 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente por células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv pueden expresarse todos en *y secretarse de E. coli*, permitiendo de este modo la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Pueden aislarse fragmentos de anticuerpos a partir de las fagotecas de anticuerpos analizadas anteriormente. Como alternativa, pueden recuperarse directamente fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, pueden aislarse fragmentos F(ab')₂ directamente del cultivo de células hospedadoras recombinantes. Fab y F(ab')₂ con aumento de semivida *in vivo* se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 5.869.046. En otras realizaciones, el anticuerpo elegido es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase documento WO 93/16185; Patente de Estados Unidos n.º 5.571.894 y Patente de Estados Unidos n.º 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.641.870. Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

6) Terapia de profármaco mediado por enzima dependiente de anticuerpo (ADEPT)

Los anticuerpos de la presente invención también pueden usarse en ADEPT conjugando el anticuerpo con una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo un agente quimioterapéutico de peptidilo, véase el documento WO 81/01145) en un fármaco antineoplásico activo. Véase, por ejemplo, el documento WO 88/07378 y la Patente de Estados Unidos n.º 4.975.278.

El componente enzimático del inmunoconjuguado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar en un profármaco de tal manera que lo convierta en su forma más activa, citotóxica.

Las enzimas que son útiles en el método de la presente invención incluyen, pero sin limitación, glicosidasa, glucosa oxidasa, lisozima humana, glucuronidasa humana, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco antineoplásico 5-fluorouracilo; proteasas tales como proteasa de *Serratia*, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas (por ejemplo, carboxipeptidasa G2 y carboxipeptidasa A) y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácidos; enzimas de escisión de carbohidratos tales como β-galactosidasa y neuramínidasa útiles para convertir profármacos glucosilados en fármacos libres; β-lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con β-lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasa, tales como penicilina V amidasa o penicilina

- 5 G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Como alternativa, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas" pueden usarse para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Pueden prepararse conjugados de anticuerpo-abzima como se describe en el presente documento para suministro de la abzima a una población de células tumorales.
- 10 Las enzimas anteriores pueden unirse covalentemente con el polipéptido o anticuerpos descritos en el presente documento por técnicas bien conocidas en este campo tales como el uso de los agentes de reticulación heterobifuncionales analizados anteriormente. Como alternativa, pueden construirse proteínas de fusión que comprenden al menos la región de unión a antígeno del anticuerpo de la invención unido con al menos una parte funcionalmente activa de una enzima de la invención usando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en este campo (véase, por ejemplo, Neuberger *et al.*, Nature 312: 604-608 (1984)).
- 15 7) *Anticuerpos biespecíficos y poliespecíficos*
- 20 Los anticuerpos biespecíficos (BsAb) son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes, incluyendo los que están en la misma proteína o en otra. Como alternativa, un brazo puede unirse con el antígeno diana, y otro brazo puede combinarse con un brazo que se une con una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo, CD3) o receptores de Fc para IgG (FcγR) tales como FcγR1 (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), para centrarse en y localizar mecanismos de defensa celulares para la célula que expresa antígeno diana. Dichos anticuerpos pueden derivar de anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).
- 25 También pueden usarse anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos para células que expresan el antígeno diana. Dichos anticuerpos poseen un brazo que se une con el antígeno deseado y otro brazo que se une con el agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti interferón α, alcaloide de la vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno con isótopo radiactivo). Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos conocidos incluyen anti-ErbB2/anti-FcgRIII (documento WO 96/16673), anti-ErbB2/anti-FcgRI (documento U.S.P. 5.837.234), anti-ErbB2/anti-CD3 (documento US 5.821.337).
- 30 En la técnica se conocen métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadenas ligera/cadena pesada de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas tienen especificidades diferentes. Millstein *et al.*, Nature, 305: 537-539 (1983). Debido a la clasificación aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza habitualmente por etapas de cromatografía de afinidad, es más bien incómoda, y los rendimientos de producto son bajos. Se desvelan procedimientos similares en el documento WO 93/08829 y en Traunecker *et al.*, EMBO J., 10: 3655-3659 (1991).
- 35 De acuerdo con un enfoque diferente, se fusionan dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para unión a cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Se insertan ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones cuando relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es posible, sin embargo, insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en relaciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las relaciones no son particularmente importantes.
- 40 45 50 55 60 65
- De acuerdo con otro enfoque descrito en el documento WO 96/27011 o U.S.P. 5.731.168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpos puede modificarse técnicamente para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se

recuperan de cultivo celular recombinante. La interfaz preferida comprende al menos una parte de la región CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, se reemplazan una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo con cadenas laterales mayores (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o las cadenas laterales grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Se han descrito en la bibliografía técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan *et al.*, Science 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente formador de complejo con ditiol arsenita sódica para estabilizar dítoles cercanos e impedir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten después en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte después al derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Pueden recuperarse directamente fragmentos Fab' de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, J. Exp. Medicina. 175: 217-225 (1992) describe la producción de moléculas de anticuerpo biespecífico completamente humanizadas F(ab')₂. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de este modo fue capaz de unirse con células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y células T humanas normales, así como desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas tumorales de mama humanas.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos bivalentes directamente de cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido heterodímeros bivalentes usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, J. Immunol., 148 (5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun se ligaron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpo" descrita en Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6444 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos/bivalentes. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado con un dominio variable de cadena ligera (V_L) por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, se obliga a los dominios V_H y V_L de un fragmento a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha presentado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos/bivalentes mediante el uso de dímeros de Fv monocatenarios (sFv). Véase Gruber *et al.*, J. Immunol., 152: 5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos. Tutt *et al.*, J. Immunol. 147: 60 (1991).

Los anticuerpos biespecíficos ilustrativos pueden unirse con dos epítopos diferentes en una molécula dada. Como alternativa, un brazo anti proteína puede combinarse con un brazo que se une con una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo, CD2, CD3, CD28 o B7), o receptores de Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) para centrar los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa la proteína particular. También pueden usarse anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan una proteína particular. Dichos anticuerpos poseen un brazo de unión a proteína y un brazo que se une a un agente citotóxico o un quelante radionúclido, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une con la proteína de interés y se une además con el factor tisular (FT).

8) Anticuerpos multivalentes

Un anticuerpo multivalente puede internalizarse (y/o catabolizarse) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno con el que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son distintos de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse fácilmente por expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno amino terminales de la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido del presente documento comprende (o consiste en) tres a aproximadamente ocho, pero preferentemente cuatro, sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (y preferentemente dos cadenas polipeptídicas), en las que la cadena o las cadenas polipeptídicas comprenden dos o más dominios variables. Por

ejemplo, la cadena o las cadenas polipeptídicas pueden comprender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, en la que VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o un polipéptido y n es 0 o 1. Por ejemplo, la cadena o las cadenas polipeptídicas pueden comprender: VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-cadena de región Fc; o VH-CH1-VH-CH1-cadena de región Fc. El anticuerpo multivalente del presente documento comprende además preferentemente al menos dos (y preferentemente cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente del presente documento puede, por ejemplo, comprender de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados en el presente documento comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio CL.

9) Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados también están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse con avidina, el otro con biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas, documento U.S.P. 4.676.980 y para el tratamiento de infección por VIH. Documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 0308936. Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse *in vitro* usando métodos conocidos en química de proteína sintética, incluyendo los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los desvelados, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos n.º 4.676.980. Pueden prepararse anticuerpos heteroconjugados usando cualquier método de reticulación conveniente. En la técnica se conocen bien agentes de reticulación adecuados, y se desvelan en la Patente de Estados Unidos n.º 4.676.980, junto con varias técnicas de reticulación.

10) Modificación técnica de la función efectora

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora de Fc, por ejemplo, para modificar (por ejemplo, potenciar o eliminar) la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. La función efectora de Fc de los anticuerpos anti PD-L1 puede reducirse o eliminarse. Esto puede conseguirse introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Como alternativa o adicionalmente, pueden introducirse un resto o restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener capacidad de internalización mejorada y/o destrucción celular mediada por complemento aumentada y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Véase Caron *et al.*, J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) y Shope, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992). También pueden prepararse anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada usando reticuladores heterobifuncionales como se describe en Wolff *et al.*, Cancer Research 53: 2560-2565 (1993). Como alternativa, puede modificarse técnicamente un anticuerpo que tenga regiones Fc dobles y puede por lo tanto tener lisis de complemento y capacidades de ADCC potenciadas. Véase Stevenson *et al.*, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989).

Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítopo de unión a receptor de recuperación en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe en la patente de Estados Unidos 5.739.277, por ejemplo. Como se usa en el presente documento, la expresión "epítopo de unión al receptor de recuperación" se refiere a un epítopo de la región Fc de una molécula IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que es responsable de aumentar la semivida en suero *in vivo* de la molécula IgG.

50 11) Otras modificaciones de secuencia de aminoácidos

Se contemplan una modificación o modificaciones de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se preparan variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, supresiones de y/o inserciones en y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se realiza cualquier combinación de supresión, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos postraduccionales del anticuerpo, tales como cambiar el número o la posición de sitios de glucosilación.

Un método útil para identificación de ciertos restos o regiones del anticuerpo que sean localizaciones preferidas para mutagénesis se denomina "mutagénesis de exploración de alanina" como se describe en Cunningham y Wells en Science, 244: 1081-1085 (1989). Aquí, se identifica un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos con carga tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o con carga negativa (más preferentemente alanina o polialanina) para afectar la interacción del antígeno de aminoácidos. Las localizaciones

de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan después introduciendo otras variantes o variantes adicionales en, o por, los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación en sí misma esté predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se realiza 5 mutagénesis de exploración de ala o aleatoria en el codón o la región diana y las variantes de anticuerpo expresadas se exploran con respecto a la actividad deseada.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales que varían en 10 longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto de metionilo aminoterminal o el anticuerpo fusionado con un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión con el extremo N o C terminal del anticuerpo con una enzima (por ejemplo para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un resto de 15 aminoácido en la molécula de anticuerpo reemplazada por un resto diferente. Los sitios de mayor interés para mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Se muestran sustituciones conservativas en la Tabla A bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Si dichas 20 sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ilustrativas" en la Tabla A, o como se describe adicionalmente posteriormente en referencia a clases de aminoácidos y pueden explorarse los productos.

TABLA A

Sustituciones de Aminoácidos

Resto Original	Sustituciones Ilustrativas	Sustituciones Preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	Val
Arg (R)	Lys; gln; asn	Lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	Gln
Asp (D)	glu; asn	Glu
Cys (C)	ser; ala	Ser
Gln (Q)	asn; glu	Asn
Glu (E)	asp; gln	Asp
Gly (G)	ala	Ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	Arg
Ile (I)	Leu; val; met; ala; phe; norleucina	Leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	Ile
Lys (K)	arg; gln; asn	Arg
Met (M)	leu; phe; ile	Leu
Phe (F)	Leu; val; ile; ala; tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	tyr; phe	Tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	Phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	Leu

25 Se consiguen modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieran significativamente en su efecto en el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o

hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos basándose en propiedades de cadena lateral comunes:

- (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;
- (3) ácidos: asp, glu;
- (4) básicos: asn, gln, su, lys, arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de cadena: gly, pro; y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

También puede sustituirse cualquier resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula e impedir la reticulación aberrante. Por el contrario, pueden añadirse un enlace o enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Un tipo particularmente preferido de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo un anticuerpo humanizado o humano). En general, la variante o las variantes resultantes seleccionadas para el desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas en relación con el anticuerpo parental del que se generan. Un modo conveniente para generar dichas variantes de sustitución implica la maduración de afinidad usando presentación en fagos. Brevemente, se mutan varios sitios de región hipervariable (por ejemplo 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpo generadas de este modo se presentan de una manera monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto de gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se exploran después con respecto a su actividad biológica (por ejemplo afinidad de unión) como se desvela en el presente documento. Para identificar sitios de región hipervariable candidatos para modificación, puede realizarse mutagénesis de exploración de alanina para identificar restos de región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y su diana (por ejemplo, PD-L1, B7.1). Dichos restos de contacto y restos adyacentes son candidatos para sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se han generado dichas variantes, el panel de variantes se somete a exploración como se describe en el presente documento y anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes pueden seleccionarse para desarrollo adicional.

Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glucosilación original del anticuerpo. Por alterar se entiende suprimir uno o más restos de carbohidratos de hallados en el anticuerpo y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glucosilación de anticuerpos es normalmente ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato con la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para unión enzimática del resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de una de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa con un hidroxiaminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas anteriormente descritas (para sitios de glucosilación ligados a N). La alteración puede también realizarse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación ligados a O).

Se preparan moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias de aminoácidos para los anticuerpos de la invención por una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos de origen natural) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigida), mutagénesis de PCR y mutagénesis de casete de una variante preparada antes o una versión no variante.

60 12) Otras modificaciones de anticuerpos

Los anticuerpos de la presente invención pueden modificarse adicionalmente para contener restos no proteicos adicionales que se conocen en la técnica y están disponibles fácilmente. Preferentemente, los restos adecuados para derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero sin limitación, polietenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano,

copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (bien homopolímeros o bien copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(*n*-vinilpirrolidona)polietenglicol, homopolímeros de polipropilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si está unido más de un polímero, estos pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para derivatización pueden determinarse basándose en consideraciones que incluyen, pero sin limitación, las propiedades particulares o funciones del anticuerpo para mejorar, si el derivado de anticuerpo se usara en una terapia en condiciones definidas, etc. Dichas técnicas y otras formulaciones adecuadas se desvelan en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20^a Ed., Alfonso Gennaro, Ed., Philadelphia College of Pharmacy and Science (2000).

D. Formulaciones farmacéuticas

Se preparan formulaciones terapéuticas para almacenamiento mezclando el principio activo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20^a Ed., Lippincott Williams y Wiklins, Pub., Gennaro Ed., Filadelfia, PA 2000). Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones, antioxidantes incluyendo ácido ascórbico, metionina, vitamina E, metabisulfito sódico; conservantes, isotonicificantes, estabilizadores, complejos metálicos (por ejemplo complejos Zn-proteína); agentes quelantes tales como EDTA y/o tensioactivos no iónicos.

Cuando el agente terapéutico es un fragmento de anticuerpo, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente con el dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, basándose en las secuencias de región variable de un anticuerpo, pueden diseñarse fragmentos de anticuerpo o incluso moléculas peptídicas que conservan la capacidad de unirse con la secuencia de proteína diana. Dichos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse por tecnología de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7889-7893 [1993]).

Se usan tampones para controlar el pH en un intervalo que optimiza la eficacia terapéutica, especialmente si la estabilidad depende del pH. Están preferentemente presentes tampones a concentraciones que varían de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 250 mM. Los agentes tamponantes adecuados para su uso con la presente invención incluyen ácidos tanto orgánicos como inorgánicos y sales de los mismos. Por ejemplo, citrato, fosfato, succinato, tartrato, fumarato, gluconato, oxalato, lactato, acetato. Adicionalmente, los tampones pueden estar comprendidos por histidina y sales de trimetilamina tales como Tris.

Se añaden conservantes para retardar el crecimiento microbiano, y están normalmente presentes en un intervalo de 0,2 %-1,0 % (p/v). Los conservantes adecuados para su uso con la presente invención incluyen cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; haluros de benzalconio (por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro), cloruro de bencetonio; timerosal, fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol, 3-pentanol y *m*-cresol.

Están presentes agentes de tonicidad, conocidos en ocasiones como "estabilizadores" para ajustar o mantener la tonicidad del líquido en una composición. Cuando se usan con biomoléculas grandes, con carga tales como proteínas y anticuerpos, se denominan con frecuencia "estabilizadores" porque pueden interaccionar con los grupos con carga de las cadenas laterales de aminoácidos, reduciendo de este modo el potencial de interacciones inter e intramoleculares. Pueden estar presentes agentes de tonicidad en cualquier cantidad entre 0,1 % y 25 % en peso, preferentemente 1 y 5 %, teniendo en cuenta las cantidades relativas de los otros ingredientes. Los agentes de tonicidad preferidos incluyen alcoholes de azúcares polihídricos, preferentemente alcoholes de azúcares trihídricos o superiores, tales como glicerina, eritritol, arabinol, xilitol, sorbitol y manitol.

Los excipientes adicionales incluyen agentes que pueden actuar como uno o más de los siguientes: (1) agentes formadores de volumen, (2) potenciadores de la solubilidad, (3) estabilizadores y (4) y agentes que eviten la desnaturalización o adherencia a la pared del recipiente. Dichos excipientes incluyen: alcoholes de azúcares polihídricos (enumerados anteriormente); aminoácidos tales como alanina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, lisina, ornitina, leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc.; azúcares orgánicos o alcoholes de azúcares tales como sacarosa, lactosa, lactitol, trehalosa, estaquiosa, manosa, sorbosa, xilosa, ribosa, ribitol, mioinositosa, mioinisolit, galactosa, galactitol, glicerol, ciclitoles (por ejemplo, inositol), polietenglicol; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tiótico, tioglicerolato sódico, tioglicerol, α-monotioglicerol y tiosulfato sódico; proteínas de bajo peso molecular tales como albúmina de suero humano, albúmina de suero bovino, gelatina u otras inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; monosacáridos (por ejemplo, xilosa, manosa, fructosa, glucosa); disacáridos (por ejemplo, lactosa, maltosa, sacarosa); trisacáridos tales como rafinosa; y polisacáridos tales como dextrina o dextrano.

Están presentes tensioactivos no iónicos o detergentes (también conocidos como "agentes humectantes") para ayudar a solubilizar el agente terapéutico así como para proteger la proteína terapéutica contra agregación inducida

por agitación, que también permite que la formulación se exponga a tensión de corte en superficie sin provocar la desnaturalización de la proteína terapéutica activa o el anticuerpo. Están presentes tensioactivos no iónicos en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, preferentemente de aproximadamente 0,07 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml.

5 Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen polisorbatos (20, 40, 60, 65, 80, etc.), polioxámeros (184, 188, etc.), polioles PLURONIC®, TRITON®, polioxietilensorbitán monoéteres (TWEEN®-20, TWEEN®-80, etc.), lauromacrogol 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, éster de ácido graso de sacarosa, metilcelulosa y carboximetilcelulosa. Los detergentes aniónicos que pueden 10 usarse incluyen laurilsulfato sódico, dioctil sulfosuccinato sódico y dioctil sulfonato sódico. Los detergentes catiónicos incluyen cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio.

15 Para que las formulaciones se usen para administración *in vivo*, estas deben ser estériles. La formulación puede hacerse estéril por filtración a través de membranas de filtración estéril. Las composiciones terapéuticas del presente documento se colocan generalmente en un recipiente que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

20 La vía de administración es de acuerdo con métodos conocidos y aceptados, tal como por embolada individual o múltiple, o infusión durante un largo periodo de tiempo de una manera adecuada, por ejemplo, inyección o infusión por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, intralesional o intraarticular, administración tópica, inhalación o por liberación sostenida o medios de liberación extendida.

25 La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se trata, preferentemente los que tienen actividades complementarias que no se afectan de forma adversa entre sí. Como alternativa, o además, la composición puede comprender un agente citotóxico, una citocina o un agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes convenientemente en combinación en cantidades que son eficaces para el fin pretendido.

30 Los principios activos también pueden inmovilizarse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli (metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 18^a edición, mencionado anteriormente.

35 La estabilidad de las proteínas y los anticuerpos descritos en presente documento pueden potenciarse mediante el uso de "sales metálicas polivalentes solubles en agua" no tóxicas. Los ejemplos incluyen Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Sn^{2+} , Sn^{4+} , Al^{2+} y Al^{3+} . Los ejemplos de aniones que pueden formar sales solubles en agua con los cationes metálicos polivalentes anteriores incluyen los formados a partir de ácidos orgánicos y/o ácidos inorgánicos. Dichas sales solubles en agua tienen una solubilidad en agua (a 20 °C) de al menos aproximadamente 20 mg/ml, 40 como alternativa al menos aproximadamente 100 mg/ml, como alternativa al menos aproximadamente 200 mg/ml.

45 Los ácidos inorgánicos adecuados que pueden usarse para formar las "sales metálicas polivalentes solubles en agua" incluyen ácido clorhídrico, acético, sulfúrico, nítrico, tiociánico y fosfórico. Los ácidos orgánicos adecuados que pueden usarse incluyen ácido carboxílico alifático y ácidos aromáticos. Los ácidos alifáticos dentro de esta definición pueden definirse como ácidos carboxílicos C₂₋₉ saturados o insaturados (por ejemplo, ácidos alifáticos mono, di y tricarboxílicos). Por ejemplo, los ácidos monocarboxílicos ilustrativos dentro de esta definición incluyen los ácidos monocarboxílicos C₂₋₉ saturados acético, propiónico, butírico, valérico, caproico, enántico, caprílico pelargónico y caprónico y los ácidos monocarboxílicos C₂₋₉ insaturados ácidos acrílico, propiólico metacrílico, crotónico e isocrotónico. Los ácidos dicarboxílicos ilustrativos incluyen los ácidos dicarboxílicos C₂₋₉ saturados malónico, succínico, glutárico, adipico y pimélico, mientras que los ácidos dicarboxílicos C₂₋₉ insaturados incluyen ácidos maleico, fumárico, citrácónico y mesacónico. Los ácidos tricarboxílicos ilustrativos incluyen los ácidos tricarboxílicos C₂₋₉ saturados y ácido 1,2,3-butanotricarboxílico. Adicionalmente, los ácidos carboxílicos de esta definición también pueden contener uno o más grupos hidroxilo para formar ácidos hidroxicarboxílicos. Los ácidos hidroxicarboxílicos ilustrativos incluyen ácido glicólico, láctico, glicérico, tartrónico, málico, tartárico y cítrico. Los aminoácidos dentro de esta definición incluyen ácido benzoico y salicílico.

55 Las sales metálicas polivalentes solubles en agua habitualmente empleadas que pueden usarse para ayudar a estabilizar los polipéptidos encapsulados de la presente invención incluyen, por ejemplo: (1) las sales metálicas de ácidos inorgánicos de haluros (por ejemplo, cloruro de cinc, cloruro de calcio), sulfatos, nitratos, fosfatos y tiocianatos; (2) las sales metálicas de ácido carboxílico alifáticas (por ejemplo, acetato de calcio, acetato de cinc, propionato de calcio, glicolato de cinc, lactato de calcio, lactato de cinc y tartrato de cinc); y (3) las sales metálicas de ácido carboxílico aromáticas de benzoatos (por ejemplo, benzoato de cinc) y salicilatos.

E. Métodos de tratamiento:

Para la prevención o el tratamiento de enfermedad, la dosificación apropiada de un agente activo dependerá del tipo de enfermedad que se trate, como se ha definido anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el agente se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al agente, y el criterio del médico a cargo. El agente se administra convenientemente al paciente de una sola vez o durante una serie de tratamientos.

La invención se refiere a coestimulación resultante de la atenuación de la señalización a través de PD-1, específicamente por la aplicación de anticuerpos de PD-L1 que evitan la unión con PD-1 y/o B7.1, así como al tratamiento terapéutico de trastornos disfuncionales de células T.

1. Infecciones

PD-1 y sus ligandos ("PD-1:PD-L") desempeñan un papel importante en la regulación de las defensas inmunitarias contra patógenos que provocan infecciones agudas y crónicas. La señalización de PD-1:PD-L desempeña un papel clave en la regulación del equilibrio entre una defensa inmunitaria antimicrobiana eficaz y daño tisular mediado por inmunidad. Por ejemplo, aunque los ratones nulgénicos para el PD-1 eliminan la infección adenovirus más rápidamente que sus homólogos de tipo silvestre, desarrollan lesión hepatocelular más grave. Iwai *et al.*, J. Exp. Med. 198: 39-50 (2003). En un modelo de ratón de queratitis estromal por herpes, el bloqueo del anticuerpo anti PD-L1 agravó la queratitis, aumentando la expansión de células T CD4 efectoras específicas de VHS-1 y producción y supervivencia de IFN-γ. Jun *et al.*, FEBS Lett. 579: 6259-64 (2005).

Los microorganismos que provocan infección crónica han aprovechado la ruta de señalización de PD-1:PD-L para impedir las respuestas inmunitarias del hospedador que dan como resultado infecciones crónicas. Los virus que provocan infección crónica pueden hacer a las células T específicas de virus no funcionales y de este modo silenciar la respuesta de células T antivíricas. Barber *et al.*, Nature 439: 682-87 (2006); Wherry *et al.*, J. Virol. 78: 5535-45 (2004). El agotamiento de células T o anergia, de células T CD8⁺ es una razón importante para el control vírico ineficaz durante las infecciones crónicas y es característico de infecciones por LCMV crónicas en ratones así como infección por VIH, VHB, VHC y HTLV e infección por SIV en primates. Parece haber una pérdida jerárquica, progresiva de la función dentro del fenotipo de células T CD8⁺ específicas de virus agotadas, perdiéndose la citotoxicidad y producción de IL-2 en primer lugar, seguido de producción de citocinas efectoras.

PD-1 está regulado positivamente tras la activación, y su expresión se mantiene a un alto nivel por células T CD8⁺ agotadas en ratones con infección crónica por LCMV. Barber *et al.*, mencionado anteriormente. La administración de anticuerpos que bloqueaban la unión de PD-1:PD-L1 dio como resultado respuestas de células T potenciadas y una reducción sustancial en la carga vírica. En ratones infectados persistentemente con respuesta de T_H CD4⁺ ineficaz, el bloqueo de PD-1:PD-L1 restauró células T CD8⁺ de un estado disfuncional dando como resultado proliferación, secreción de citocinas, destrucción de células infectadas y reducción de la carga vírica, lo que sugiere en gran medida un enfoque terapéutico para el tratamiento de infecciones víricas crónicas.

Como resultado del papel de PD-1:PD-L en LCMV, se ha mostrado un gran interés en la dirección de esta ruta para el tratamiento de infección crónica en seres humanos. La expresión de PD-1 es alta en células específicas de VIH [Petrovas *et al.*, J. Exp. Med. 203: 2281-92 (2006); Day *et al.*, Nature 443: 350-54 (2006); Traumann *et al.*, Nat. Med. 12: 1198-202 (2006)], específicas de VHB [Boettler *et al.*, J. Virol. 80: 3532-40 (2006); Boni *et al.*, J. Virol. 81: 4215-25 (2007)] y específicas de VHC [Urbani *et al.*, J. Virol. 80: 11398-403 (2006)]. PD-L1 también está regulado positivamente en monocitos CD14⁺ de sangre periférica y CD mieloídes en pacientes con infección por VHB crónica [Chen *et al.*, J. Immunol. 178: 6634-41 (2007); Geng *et al.*, J. Viral Hepat. 13: 725-33 (2006)] y en células CD14⁺ y células T en pacientes con VIH [Trabattoni *et al.*, Blood 101: 2514-20 (2003)]. El bloqueo de las interacciones de PD-1:PD-L1 *in vitro* invierte el agotamiento de células T específicas de VIH, específicas de VHB, específicas de VHC y específicas de SIV CD8⁺ y CD4⁺ y restaura la proliferación y producción de citocinas. Petrovas *et al.*, J. Exp. Med. 203: 2281-92 (2006); Day *et al.*, mencionado anteriormente; Trautmann *et al.*, mencionado anteriormente; Boni *et al.*, mencionado anteriormente; Urbani *et al.*, mencionado anteriormente; Velu *et al.*, J. Virol. 81: 5819-28 (2007).

El grado de expresión de PD-1 también puede ser un marcador de diagnóstico útil en células T CD8⁺ específicas de virus para indicar el grado de agotamiento de células T y gravedad de la enfermedad. El nivel de expresión de PD-1 en células T CD8⁺ específicas de VIH correlaciona con la carga vírica, la disminución de los recuentos de CD4⁺ y la capacidad reducida de las células T CD8⁺ para proliferar en respuesta a antígeno del VIH *in vitro*. En correspondencia a observaciones *in vivo*, existe una correlación directa entre la expresión de PD-1 en células T CD4⁺ específicas de VIH y en la carga vírica. D'Souza *et al.*, J. Immunol. 179: 1979-87 (2007). Los que no progresan a largo plazo tienen células T CD8⁺ de memoria específicas de VIH funcionales con expresión de PD-1 notablemente menor, a diferencia de los que progresan normalmente que expresan PD-1 regulado positivamente de forma significativa, que se correlaciona con reducción del número de células T CD4⁺, disminución del número de células T CD4⁺, disminución de la función de células T CD8⁺ de memoria efectoras específicas para VIH y carga vírica en plasma elevada. Zhang *et al.*, Blood 109: 4671-78 (2007).

La ruta de PD-1:PD-L también se ha implicado en la cronicidad de infecciones bacterianas. *Helicobacter pylori* provoca gastritis crónica y úlceras gastroduodenales y es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico.

Durante una infección por *H. pylori*, las respuestas de células T son insuficientes para eliminar la infección, lo que conduce a infección persistente. Después de exposición a *H. pylori* *in vitro* o *in vivo*, PD-L1 está regulada positivamente en células epiteliales gástricas. Las células epiteliales gástricas expresan moléculas del MHC de clase II y se cree que desempeñan una función de APC importante durante la infección por *H. pylori*. Los anticuerpos anti

5 PD-L1 que bloquean la interacción de PD-1 con PD-L1 potencian la proliferación de células T y la producción de IL-2 en cultivos de células epiteliales gástricas expuestas a *H. pylori* y células T CD4. El bloqueo de PD-L1 con anticuerpos o ARNip evitó la generación de las células T reguladoras, lo que sugiere que PD-L1 puede promover la supresión de células T e infecciones persistentes controlando la dinámica entre células T reguladoras y efectoras durante la infección por *H. pylori*. Beswick *et al.*, Infect. Immun. 75: 4334-41 (2007).

10 Los gusanos parásitos también han aprovechado la ruta de PD-1:PD-L1 para inducir macrófagos que suprimen la respuesta inmunitaria. Durante infecciones por *Taenia crassiceps* (es decir, cestodo) en ratones, PD-1 y PD-L2 están regulados positivamente en macrófagos activados y las células T CD4⁺ expresan PD-1. El bloqueo de PD-1, PD-L1 o PD-L2 redujo significativamente la supresión de proliferación de células T *in vitro* por macrófagos de ratones infectados por cestodos. Terrazas *et al.*, Int. J. Parasitol. 35: 1349-58 (2005). Durante infección por *Shistosoma mansoni* en ratones, los macrófagos expresan altos niveles de PD-L1 y niveles más modestos de PD-L2. Anti-PD-L1 eliminó la capacidad de estos macrófagos para suprimir proliferación de células T *in vitro*, mientras que anti PD-L2 no tuvo ningún efecto. La expresión de PD-L1 en macrófagos de ratones infectados desciende después de 12 semanas de infección, lo que se correlaciona con una interrupción de la anergia de células T. Smith *et al.*, J. Immunol. 173: 1240-48 (2004).

2. Inmunidad tumoral

25 Las pruebas empíricas para inmunidad tumoral incluyen (i) la observación de remisión espontánea, (ii) la presencia de respuesta inmunitaria del hospedador detectable, pero ineficaz, a los tumores, (iii) la prevalencia aumentada de tumores malignos primarios y secundarios en pacientes inmunodeficientes, (iv) la detección de niveles aumentados de anticuerpos y linfocitos T en pacientes con tumores y (v) la observación de que los animales de ensayo pueden inmunizarse contra diversos tipos de tumores.

30 Los estudios han mostrado que la mayoría de los tumores humanos expresan antígenos asociados a tumor (TAA) que pueden ser reconocidos por células T y por lo tanto son potencialmente capaces de inducir respuesta inmunitaria. Boon *et al.*, Immunol. Today 16: 334-336 (1995). Se han iniciado ensayos clínicos de fase temprana vacunando pacientes con cáncer con TAA o células presentadoras de antígenos profesionales pulsadas con TAA. Dudley *et al.*, Science 298: 850-854 (2002); Gajewski *et al.*, Clin. Cancer Res. 7: 895s-901s (2001); Marincola *et al.*, Adv. Immunol. 74: 181-273 (2000); Peterson *et al.*, J. Clin. Oncol. 21: 2342-2348 (2003). Se ha conseguido inducción 35 de células T CD8⁺ específicas de antígenos tumorales en muchos de estos ensayos. Mackensen *et al.*, Eur. Cytokine Netw. 10: 329-336 (1999); Peterson *et al.*, mencionado anteriormente. También se ha perseguido la transferencia adoptiva de células T específicas de antígenos tumorales en pacientes y ha revelado la orientación de linfocitos T citotóxicos expandidos (CTL) a sitios tumorales. Meidenbauer *et al.*, J. Immunol. 170: 2161-2169 (2003). Sin embargo, a pesar de la infiltración tumoral de células efectoras inmunitarias, el crecimiento tumoral se ha controlado pocas veces.

40 Se ha establecido bien que el microambiente tumoral puede proteger las células tumorales de la destrucción inmunitaria. Ganss *et al.*, Cancer Res. 58: 4673-4681 (1998); Singh *et al.*, J. Exp. Med. 175: 139-146 (1992). Se ha descubierto que factores solubles, así como moléculas unidas a membrana incluyendo factor de crecimiento transformante β (TGF-β), interleucina (IL)-10, prostaglandina E₂, FASL, ligandos de CTLA-4, ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL) y ligando del receptor de muerte programada 1 (PD-L1, también conocido como B7-H1) se expresan en tumores y se cree que median en la evasión inmunitaria. Por lo tanto, el bloqueo de estas señales reguladoras inmunitarias negativas en células tumorales es un enfoque prometedor para potenciar la inmunidad de células T CD8⁺ específicas de tumor *in vivo*.

45 50 La expresión de PD-L1 en muchos tumores es un componente de esta supresión y puede actuar junto con otras señales inmunosupresoras. PD-L1 regula negativamente la señalización de receptores de células T. La expresión de PD-L1 se ha mostrado *in situ* en una amplia diversidad de tumores sólidos, incluyendo cánceres de mama, pulmón, colon, ovárico, melanoma, vejiga, hígado, salivar, de estómago, gliomas, de tiroides, tímico, epitelial, de cabeza y cuello. Brown *et al.*, J. Immunol. 170: 1257-66 (2003); Dong *et al.*, Nat. Med. 8: 793-800 (2002); Hamanishi *et al.*, PNAS 104: 3360-65 (2007); Strome *et al.*, Cancer Res. 63: 6501-5 (2003); Inman *et al.*, Cancer 109: 1499-505 (2007); Konishi *et al.*, Clin. Cancer Res. 10: 5094-100 (2004); Nakanishi *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 56: 1173-82 (2007); Nomi *et al.*, Clin. Cancer Res. 13: 2151-57 (2004); Thompson *et al.*, PNAS 101: 17174-79 (2004); Wu *et al.*, Acta Histochem. 108: 19-24 (2006).

55 60 La tinción inmunológica también revela la expresión de expresión de PD-1:PD-L en diversos cánceres.

65 Resulta interesante que el cáncer se ha caracterizado también como una enfermedad inflamatoria crónica. Coussens *et al.*, Nature 420: 860-867 (2002). Aunque hasta el 15 % de los cánceres en todo el mundo tienen un origen infeccioso directo [Kuper *et al.*, J. Intern. Med. 248: 171-183 (2000)], muchos tumores humanos están relacionados con irritación e inflamación crónica. Zou *et al.*, Ntu. Rev. Cancer 5: 263-274 (2005).

Los estudios que relacionan la expresión de PD-L1 en tumores con el resultado de enfermedad muestran que la expresión de PD-L1 se correlaciona fuertemente con pronóstico desfavorable en cáncer de riñón, ovárico, de vejiga, de mama, gástrico y pancreático, pero quizás no en cáncer de pulmón microcítico. Hamanishi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 3360-65 (2007), Inman *et al.*, Cancer 109: 1499-505 (2007), Konishi *et al.*, Clin. Cancer Res. 10:5094-100 (2004); Nakanishi *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 56: 1173-82 (2007); Nomi *et al.*, Clin. Cancer Res. 13: 2151-57 (2007); Thompson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 17174-79 (2004); Wu *et al.*, Acta Histochem. 108: 19-24 (2006). Además, estos estudios sugieren que mayores niveles de expresión de PD-L1 en tumores pueden facilitar el avance del estadio tumoral y la invasión en estructuras tisulares más profundas.

La ruta de PD-1:PD-L tambiéen puede desempeñar un papel en los tumores malignos hematológicos. PD-1 o PD-L1 se expresan en pocas ocasiones en tumores malignos de células B, pero PD-L2 se sobreexpresa en tumores malignos de células del manto. Brown *et al.*, mencionado anteriormente; Rosenwald *et al.*, J. Exp. Med. 198: 851-62 (2003). PD-L1 se expresa en células de mieloma múltiple, pero no en células plasmáticas normales. La expansión de células T en respuesta a células de mieloma está potenciada *in vitro* por bloqueo de PD-L1. Liu *et al.*, Blood 110: 296-304 (2007). PD-L1 se expresa en algunos linfomas de células T primarios, particularmente linfomas T de células grandes anaplásicos, y PD-L1 se expresa en la red de células dendríticas foliculares asociada. Dorfman *et al.*, Am. J. Surg. Pathol. 30: 802-10 (2006). El análisis de micromatrizes sugiere adicionalmente que las células T asociadas a tumores responden a señales de PD-1 *in situ* en linfoma de Hodgkin. Chemnitz *et al.*, Blood 110: 3226-33 (2007). PD-1 y PD-L1 se expresan en células T CD4⁺ en leucemia y linfoma de células T del adulto mediados por HTLV-1. Shimauchi *et al.*, Int. J. Cancer 121: 2585-90 (2007). Estas células tumorales son hipersensibles a señales del TCR, y el bloqueo de PD-1 aumentó su expresión de TNF- α , pero no IFN- γ . Los estudios en modelos animales demuestran que la expresión de PD-L1 en tumores inhibe la activación de células T y la lisis de células tumorales y en algunos casos conduce a aumento de la muerte de células T específicas de tumor. Dong *et al.*, Nat. Med. 8: 793-800 (2006); Hirano *et al.*, Cancer Res. 65: 1089-96 (2005).

Por lo tanto, la supresión de señalización a través de PD-L1 con los anticuerpos anti PD-L1 de la invención, para potenciar la función de células T, es prometedora para atenuar la inmunidad tumoral y, como resultado, puede ser un tratamiento eficaz para el cáncer.

F. Terapias de combinación

El método desvelado en el presente documento puede combinarse con métodos conocidos del tratamiento de infección crónica o cáncer, bien como etapas de tratamiento combinadas o adicionales o bien como componentes adicionales de una formulación terapéutica.

1. Cáncer:

La potenciación de la función inmunitaria del hospedador para combatir tumores es cada vez un objeto de mayor interés. Los métodos convencionales incluyen: (i) potenciación de APC, tal como (a) inyección en el tumor de ADN que codifica aloantígenos de MHC exógenos, o (b) transfección de células tumorales obtenidas por biopsia con genes que aumentan la probabilidad de reconocimiento de antígenos inmunitarios (por ejemplo, citocinas estimulantes inmunitarias, GM-CSF, moléculas coestimuladoras B7.1, B7.2) del tumor, (iii) immunoterapia celular adoptiva o tratamiento con células T específicas de tumor activadas. La immunoterapia celular adoptiva incluye aislar linfocitos T del hospedador que se infiltran en tumores, expandir la población *in vitro*, tal como mediante estimulación por IL-2 o tumor o ambas. Adicionalmente, las células T aisladas que son disfuncionales pueden también activarse por aplicación *in vitro* de los anticuerpos anti PD-L1 de la invención. Las células T que están activadas de este modo pueden después volver a administrarse al hospedador.

Las terapias tradicionales para cáncer incluyen las siguientes: (i) *terapia por radiación* (por ejemplo, radioterapia, terapia de rayos X, irradiación) o el uso de radiación ionizante para destruir células cancerosas y encoger tumores. La radioterapia puede administrarse bien de forma externa mediante radioterapia de haz externo (EBRT) o internamente mediante braquiterapia; (ii) *quimioterapia*, o la aplicación de fármaco citotóxico que generalmente afecta a células en rápida división; (iii) *terapias dirigidas*, o agentes que afectan específicamente a las proteínas desreguladas de células cancerosas (por ejemplo, inhibidores de tirosina quinasa imatinib, gefitinib, anticuerpos monoclonales, terapia fotodinámica); (iv) *immunoterapia*, o potenciación de la respuesta inmunitaria del hospedador (por ejemplo, vacuna); (v) *terapia hormonal*, o bloqueo de hormonas (por ejemplo, cuando el tumor es sensible a hormonas), (vi) *inhibidor de la angiogénesis*, o bloqueo de la formación y el crecimiento de vasos sanguíneos y (vii) *cuidados paliativos*, o tratamiento dirigido a mejorar la calidad de cuidados para reducir el dolor, las náuseas, los vómitos, la diarrea y la hemorragia. La mediación analgésica tal como morfina y oxicodeona, antieméticos tales como ondansetrón y aprepitant, pueden permitir regímenes de tratamiento más agresivos.

En el tratamiento del cáncer, puede realizarse cualquiera de los tratamientos convencionales anteriormente descritos para el tratamiento de inmunidad de cáncer antes de, después de o simultáneamente con la administración de los anticuerpos anti PD-L1 de la invención. Adicionalmente, los anticuerpos anti PD-L1 de la invención pueden administrarse antes de, después de o simultáneamente con tratamientos de cáncer convencionales, tales como la

administración de anticuerpos de unión a tumores (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos monoclonales conjugados con toxinas) y/o la administración de agentes quimioterapéuticos.

2. Infección:

- 5 En el tratamiento de infección (por ejemplo, aguda y/o crónica), la administración de los anticuerpos anti PD-L1 de la invención puede combinarse con tratamientos convencionales además de o en lugar de estimular las defensas inmunitarias del hospedador naturales para la infección. Las defensas inmunitarias naturales del hospedador a la infección incluyen, pero sin limitación, inflamación, fiebre, defensa del hospedador mediada por anticuerpos, 10 defensas del hospedador mediadas por linfocitos T, incluyendo secreción de linfocinas y células T citotóxicas (especialmente durante la infección vírica), lisis y opsonización mediada por complemento (fagocitosis facilitada) y fagocitosis. La capacidad de los anticuerpos anti PD-L1 de la invención para reactivar células T disfuncionales sería particularmente útil para tratar infecciones crónicas, en particular en las que la inmunidad mediada por células es crítica para la recuperación completa.
- 15 a. bacterias
- 20 Para infecciones resultantes de una infección bacteriana, los anticuerpos anti PD-L1 de la invención pueden combinarse por administración simultánea con, antes de o posteriormente a terapias convencionales para tratar infección bacteriana. Las infecciones bacterianas se tratan más habitualmente en la actualidad con antibióticos 25 antibacterianos, pero también puede ser eficaz suero que contiene anticuerpos específicos de patógenos de hospedadores inmunizados.
- 25 Las bacterias que son patógenas como resultado de la secreción de toxinas (bacterias toxogénicas), vacunación con toxina inactiva y/o la administración de agentes terapéuticos que bloquean la toxicidad de las toxinas son habitualmente eficaces (por ejemplo, suero polyclonal, anticuerpos, antibióticos, etc.). Estos organismos incluyen *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Vibrio cholerae*, *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus* spp., 30 *Streptococcus* spp. Las bacterias gram negativas que también responden normalmente a dichas terapias tradicionales incluyen Enterobacterias (por ejemplo, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Yersinia*, *Erwina*), *Salmonella* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las bacterias encapsuladas, que son resistentes a fagocitosis y opsonización, y por lo tanto evitan con frecuencia una exposición más significativa a eliminación inmunitaria incluyen: *Streptococcus* spp., *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp., *Klebsiella* spp. y *Bacteroides fragillil*.
- 35 Las bacterias que evaden las defensas del hospedador invadiendo células para evadir el anticuerpo en suero y el complemento presentan un reto particular. La eliminación de estas infecciones depende casi completamente de la inmunidad mediada por linfocitos T, y son especialmente propensas a convertirse en infecciones crónicas. Los ejemplos específicos incluyen *Salmonella* (*S. typhi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*), *Legionella* spp., *Listeria* spp., *Brucella* spp. y *Mycobacterium*, incluyendo *M. tuberculosis*, *M. avium* y *M. leprae*.
- 40 Las espiroquetas, incluyendo *Treponema* spp., *Borrelia* spp. y *Leptospira* spp. son bacterias que provocan infecciones persistentes y latentes. *Treponema palladium*, el patógeno que provoca la enfermedad sífilis es una enfermedad de transmisión sexual que puede tener consecuencias patológicas graves si se deja sin tratar. La enfermedad avanza a través de distintos estadios. El estadio clínico inicial es una úlcera o chancre en el sitio de inoculación de treponema. Después de este hay un periodo de espiroquetemia y distribución metastásica de microorganismos que continúa, incluyendo ciclos repetidos de infección y resolución en una afección conocida como sífilis secundaria. Después de la resolución de la sífilis secundaria, la enfermedad entra en un periodo de latencia asintomático que puede concluir en sífilis terciaria, que es una afección grave y con frecuencia letal. La sífilis terciaria puede manifestarse en (i) el corazón como aortitis con formación de aneurisma e insuficiencia de la válvula aórtica secundaria, (ii) sistema nervioso central (tabes dorsal, paresia general), (iii) ojos (queratitis intersticial) o (iv) oídos (sordera nerviosa). Las formas no venéreas se asemejan a las manifestaciones clínicas de las formas venéreas, pero se transmiten principalmente por contacto directo y escasa higiene. Éstas incluyen frambrasia (*T. pallidum* subsp. *pertinue*), pinta (*T. carateum*) y bejel (*T. pallidum* subsp. *endemicum*).
- 45 El tratamiento para la sífilis incluye penicilina (por ejemplo, penicilina G.), tetraciclina, doxiciclina, ceftriaxona y azitromicina. Los anticuerpos anti PD-L1 de la invención se administrarían más provechosamente para tratar el periodo de infección latente.
- 50 La enfermedad de Lyme, causada por *Borrelia burgdorferi* se transmite a seres humanos por picaduras de garrapatas. La enfermedad se manifiesta inicialmente como una erupción localizada, seguida de síntomas de tipo gripal incluyendo malestar, fiebre, cefalea, cuello rígido y artralgias. Las manifestaciones posteriores pueden incluir artritis migratoria y poliarticular, implicación neurológica y cardíaca con parálisis de nervios craneales y radiculopatía, miocarditis y arritmias. Algunos casos de enfermedad de Lyme se convierten en persistentes, dando como resultado daño irreversible análogo a sífilis terciaria.
- 55 La terapia actual para enfermedad de Lyme incluye principalmente la administración de antibióticos. Las cepas resistentes a antibióticos pueden tratarse con hidroxicloroquina o metotrexato. Los pacientes refractarios para

antibióticos con dolor neuropático pueden tratarse con gabapentina. La minociclina puede ser útil en enfermedad de Lyme tardía/crónica con manifestaciones inflamatorias neurológicas u otras. Los anticuerpos anti PD-L1 se administrarían más provechosamente para tratar el periodo de infección tardío.

5 Otras formas de borreliosis, tales como las resultantes de *B. recurrentis*, *B. hermsii*, *B. turicatae*, *B. parikeri*, *B. hispanica*, *B. duttonii* y *B. persica*, así como leptospirosis (por ejemplo, *L. interrogans*), se resuelven normalmente de forma espontánea a no ser que los títulos en sangre alcancen concentraciones que provoquen obstrucción intrahepática.

10 b. virus

Para infecciones resultantes de causas víricas, los anticuerpos anti PD-L1 de la invención pueden combinarse por aplicación simultánea con, antes de o posteriormente a la aplicación de terapias convencionales para tratar infecciones víricas. Dichas terapias convencionales varían dependiendo del tipo de virus, aunque en la mayoría de los casos, la administración de suero humano que contiene anticuerpos (por ejemplo, IgA, IgG) específicos del virus puede ser eficaz.

15 1) *Gripe*

20 La infección por gripe da como resultado fiebre, tos, mialgia, cefalea y malestar, que con frecuencia suceden en epidemias de temporada. La gripe también se asocia con varios trastornos postinfecciosos, tales como encefalitis, miopericarditis, síndrome de Goodpasture y síndrome de Reye. La infección por gripe también suprime las defensas antibacterianas pulmonares normales, de modo que la recuperación del paciente de la gripe tiene un riesgo aumentado de desarrollo de neumonía bacteriana.

25 Las proteínas de superficie vírica de la gripe muestran variación antigenética notable, resultante de mutación y recombinación. Por lo tanto, los linfocitos T citolíticos son el vehículo primario del hospedador para la eliminación de virus después de la infección. La gripe se clasifica en tres tipos primarios: A, B y C. La gripe A es única porque infecta tanto a seres humanos como a muchos otros animales (por ejemplo, cerdos, caballos, aves y focas) y es la causa principal de la gripe pandémica. Además, cuando una célula está infectada por dos cepas de gripe A diferentes, los genomas de ARN segmentados de dos tipos de virus parentales se mezclan durante la replicación para crear un replicante híbrido, dando como resultado nuevas cepas epidémicas. La gripe B no replica en animales y por lo tanto tiene menor variación genética y la gripe C tiene solamente un único serotipo.

30 35 La mayoría de las terapias convencionales son paliativas de los síntomas resultantes de la infección, mientras que la respuesta inmunitaria del hospedador elimina de hecho la enfermedad. Sin embargo, ciertas cepas (por ejemplo, gripe A) pueden provocar enfermedad más grave y muerte. La gripe A puede tratarse tanto clínicamente como profilácticamente mediante la administración de los inhibidores de aminas cíclicas amantadina y rimantadina, que inhiben la replicación vírica. Sin embargo, la utilidad clínica de estos fármacos está limitada debido a la incidencia relativamente alta de reacciones adversas, su espectro antivírico estrecho (solamente gripe A) y la propensión del virus a hacerse resistente. La administración de anticuerpo IgG en suero para las proteínas de superficie de gripe principales, hemaglutinina y neuraminidasa, puede impedir la infección pulmonar, mientras que IgA mucosa se requiere para impedir la infección de las vías respiratorias superiores y la tráquea. El tratamiento actual más eficaz para la gripe es la vacunación con la administración de virus inactivado con formalina o β-propiolactona.

40 45 2) *Virus del sarampión*

50 Después de una incubación de 9-11 días, los hospedadores infectados con el virus de sarampión desarrollan fiebre, tos, rinitis y conjuntivitis. En un periodo de 1-2 días, se desarrolla una erupción eritematosa, maculopapular, que se propaga rápidamente por todo el cuerpo. Debido a que la infección también suprime la inmunidad celular, el hospedador tiene un mayor riesgo de desarrollar superinfecciones bacterianas, incluyendo otitis media, neumonía y encefalomielitis postinfecciosa. La infección aguda se asocia con morbilidad y mortalidad significativas, especialmente en adolescentes desnutridos.

55 60 65 El tratamiento para el sarampión incluye la administración pasiva de IgG humana agrupada, que puede impedir la infección en sujetos no inmunes, incluso si se administra hasta una semana después de la exposición. Sin embargo, la inmunización previa con virus vivos, atenuados, es el tratamiento más eficaz y evita la enfermedad de más del 95 % de los inmunizados. Como hay un serotipo de este virus, una única inmunización o infección normalmente da como resultado protección de por vida de la infección posterior.

En una pequeña proporción de hospedadores infectados, el sarampión puede desarrollarse a SSPE, que es un trastorno neurológico progresivo crónico resultante de una infección persistente del sistema nervioso central. SSPE está provocado por variantes cloniales del virus del sarampión con defectos que interfieren con el ensamblaje del virión y la gemación. Para estos pacientes, sería deseable la reactivación de células T con los anticuerpos anti PD-L1 de la invención para facilitar la eliminación vírica.

3) *Virus de la hepatitis B*

El virus de la hepatitis B (VHB) es el patógeno portado en la sangre conocido más infeccioso. Es una causa importante de hepatitis aguda y crónica y carcinoma hepático, así como infección crónica durante toda la vida.

5 Después de la infección, el virus se replica en hepatocitos, que también desprenden después el antígeno de superficie HBsAg. La detección de niveles excesivos de HBsAg en suero se usa como un método convencional para diagnosticar una infección por hepatitis B. Una infección aguda puede resolverse o puede desarrollarse a una infección persistente crónica.

10 Los tratamientos actuales para VHB crónico incluyen interferón α, que aumenta la expresión de antígeno de leucocitos humanos de clase I (HLA) en la superficie de hepatocitos, facilitando de este modo su reconocimiento por linfocitos T citotóxicos. Adicionalmente, los análogos de nucleósidos ganciclovir, famciclovir y lamivudina también han mostrado algo de eficacia en el tratamiento de la infección por VHB en un ensayo clínico. Los tratamientos adicionales para VHB incluyen interferón α pegilado, adenovovir, entecavir y telbivudina. Aunque puede conferirse inmunidad pasiva mediante administración parenteral de anticuerpos en suero anti HBsAg, la vacunación con HBsAg inactivado o recombinante también confiere resistencia a infección. Los anticuerpos anti PD-L1 de la invención pueden combinarse con tratamientos convencionales para infecciones de hepatitis B para ventaja terapéutica.

4) *Virus de la hepatitis C*

20 La infección por virus de la hepatitis C (VHC) puede conducir a una forma crónica de hepatitis, que da como resultado cirrosis. Aunque los síntomas son similares a infecciones resultantes de la hepatitis B, en claro contraste con VHB, los hospedadores infectados pueden ser asintomáticos durante 10-20 años. El tratamiento para infección por VHC incluye la administración de una combinación de interferón α y ribavirina. Una terapia potencial prometedora para infección por VHC es el inhibidor de proteasa telaprevir (VX-960). Los tratamientos adicionales incluyen: anticuerpo anti PD-1 (MDX-1106, Medarex), bavituximab (un anticuerpo que se une con el fosfolípido aniónico fosfatidilserina de una manera dependiente de glucoproteína I B2, Peregrine Pharmaceuticals), el anticuerpo o los anticuerpos anti proteína E2 de la cubierta vírica de VPH (por ejemplo, ATL 6865-Ab68+ Ab65, XTL Pharmaceuticals) y Civacir® (inmunoglobulina humana anti VHC polyclonal). Los anticuerpos anti PD-L1 de la invención pueden combinarse con uno o más de estos tratamientos para infecciones por hepatitis C para ventaja terapéutica.

30 Los inhibidores de proteasa, polimerasa y NS5A que pueden usarse en combinación con los anticuerpos anti PD-L1 de la invención para tratar específicamente la infección por Hepatitis C incluyen los siguientes identificados en la Tabla B

35 Tabla B

Inhibidores de proteasa y polimerasa de Hepatitis C		
Tipo de inhibidor	Nombre del Inhibidor	Fabricante(s)
Proteasa	R7227/ITMN 191	Roche/InterMune
	CTS-1027	Roche Biosciences
	VX500, VX813, VX985	Vertex
	Telaprevir (VX950)	Vertex/Tibotec
	TMC435350/TMC 435	Medivir/Tibotec
	Boceprevir (SCH503034), Narlaprevir (SCH900518/SP900518)	Schering-Plough
	BI201335, BILN 2061	Boehringer Ingelheim
	MK7009	Merck
	IDX-136, IDX-316	Idenix
	BMS-790052, BMS-791325	Bristol Myers Squibb
	PHX-1766	Phenomix
	ACH-806	Achillion/Gilead
	ACH-1625	Achillion
	ABT-450	Abbott Labs
	VBY 376	Virobay

(continuación)

Inhibidores de proteasa y polimerasa de Hepatitis C		
Tipo de inhibidor	Nombre del Inhibidor	Fabricante(s)
Inhibidores de Polimerasa	R1626	Roche
	R7128	Roche/Pharmasset
	NM283	Idenix
	HCV796	Wyeth
	BILB 1941, BI-207127	Boehringer Ingelheim
	GL60667, GS9190	Gilead
	PF-00868554	Pfizer
	VCH757, VCH916	Virochem
	VX222, VX759	Vertex
	MK-3281	Merck
	ANA598	Anadys
	IDX184, IDX375	Idenix
	PSI-7851	Pharmasset
	ABT-072, ABT-333	Abbott Labs
	BMS650032	Bristol Myers Squibb
Inhibidores de NS5A	BMS790052, BMX824393	Bristol Myers Squibb
	AZD 2836, AZD 7295	Arrow Therapeutics
	GSK 625433	Glaxo Smith Kline

5) Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)

- 5 El VIH ataca a células CD4+, incluyendo linfocitos T, monocitos-macrófagos, células dendríticas foliculares y células de Langerhans y las células inductoras/auxiliares CD4+ se agotan. Como resultado, el hospedador adquiere un defecto grave en la inmunidad mediada por células. La infección con VIH da como resultado SIDA en al menos 50 % de los individuos, y se transmite mediante contacto sexual, administración de sangre o productos sanguíneos infectados, inseminación artificial con semen infectado, exposición a agujas que contienen sangre o jeringas y transmisión de una madre infectada al niño durante el parto.

- 10 Un hospedador infectado con VIH puede ser asintomático, o puede desarrollar una enfermedad aguda que se asemeja a la mononucleosis - fiebre, cefalea, dolor de garganta, malestar y erupción. Los síntomas pueden progresar a disfunción inmunitaria progresiva, incluyendo fiebre persistente, sudores nocturnos, pérdida de peso, diarrea inexplicada, ecema, psoriasis, dermatitis seborreica, herpes zóster, candidiasis oral y leucoplaquia oral vellosa. Son habituales infecciones oportunistas por un hospedador de parásitos en pacientes cuyas infecciones evolucionan a SIDA.

- 20 Los tratamientos para el VIH incluyen terapias antivíricas que incluyen análogos de nucleósidos, zidovudina (AST), bien solas o bien en combinación con didanosina o zalcitabina, didesoxiinosina, didesoxicitidina, lamivudina, estavudina; inhibidores de transcripción inversa tales como delavirdina, nevirapina, lovirida e inhibidores de proteinasa tales como saquinavir, ritonavir, indinavir y nelfinavir. Los anticuerpos anti PD-L1 de la invención pueden combinarse con tratamientos convencionales para infecciones por VIH para ventaja terapéutica.

25 6) Citomegalovirus

- 30 La infección por citomegalovirus (CMV) se asocia con frecuencia con infección persistente, latente y recurrente. El CMV infecta y permanece latente en monocitos y células progenitoras de granulocitos-monocitos. Los síntomas clínicos de CMV incluyen síntomas de tipo mononucleosis (es decir, fiebre, glándulas hinchadas, malestar) y una tendencia a desarrollar erupciones cutáneas alérgicas frente a antibióticos. El virus se propaga por contacto directo. El virus se desprende en la orina, saliva, semen y en menor grado en otros fluidos corporales. La transmisión

también puede producirse de una madre infectada a su feto o neonato y por transfusión sanguínea y trasplantes de órganos. La infección por CMV da como resultado deterioro general de la inmunidad celular, caracterizada por respuestas blastogénicas alteradas a mitógenos no específico y antígeno de CMV específicos, capacidad citotóxica reducida y elevación del número de linfocitos CD8 de linfocitos CD4+.

5 Los tratamientos de infección por CMV incluyen los antivíricos ganciclovir, foscarnet y cidovir, pero estos fármacos se recetan normalmente solo en pacientes inmunocomprometidos. Los anticuerpos anti PD-L1 de la invención pueden combinarse con tratamientos convencionales para infecciones por citomegalovirus para ventaja terapéutica.

10 7) *Virus de Epstein-Barr*

El virus de Epstein-Barr (VEB) puede establecer infecciones persistentes y latentes y principalmente ataca células B. La infección con VEB da como resultado la afección clínica de mononucleosis infecciosa, que incluye fiebre, dolor de garganta, con frecuencia con exudado, linfadenopatía generalizada y esplenomegalia. También está presente hepatitis, que puede evolucionar a ictericia.

15 Aunque los tratamientos típicos para infecciones por VEB son paliativos de síntomas, VEB se asocia con el desarrollo de ciertos cánceres tales como linfoma de Burkitt y cáncer nasofaríngeo. Por lo tanto, la eliminación de la infección vírica antes de que aparezcan estas complicaciones sería muy beneficiosa. Los anticuerpos anti PD-L1 de la invención pueden combinarse con tratamientos convencionales para infecciones por virus de Epstein-Barr para ventaja terapéutica.

20 8) *Virus del herpes*

25 El virus del herpes simple (VHS) se transmite por contacto directo con un hospedador infectado. Una infección directa puede ser asintomática, pero normalmente da como resultado ampollas que contienen partículas infecciosas. La enfermedad se manifiesta como ciclos de periodos activos de enfermedad, en los que las lesiones aparecen y desaparecen ya que el virus infecta de forma latente al ganglio nervioso para brotes posteriores. Las lesiones pueden ser en la cara, los genitales, los ojos y/o las manos. En algunos casos, una infección también puede provocar encefalitis.

30 Los tratamientos para las infecciones por herpes se dirigen principalmente a resolver los brotes sintomáticos, e incluyen medicinas antivíricas sistémicas tales como: aciclovir (por ejemplo, Zovirax®), valaciclovir, famciclovir, penciclovir y medicamentos tópicos tales como docosanol (Abreva®), tromantadina y zilactina. La eliminación de infecciones latentes de herpes sería muy beneficiosa clínicamente. Los anticuerpos anti PD-L1 de la invención pueden combinarse con tratamientos convencionales para infecciones por virus del herpes para ventaja terapéutica.

35 9) *HTLV*

40 El virus T linfotrópico humano (HTLV-1, HTLV-2) se transmite por contacto sexual, lactancia o exposición a sangre contaminada. El virus activa un subconjunto de células T_H denominadas células Th1, dando como resultado su sobreproliferación y sobreproducción de citocinas relacionadas con Th1 (por ejemplo, IFN-γ y TNF-α). Esto a su vez da como resultado una supresión de linfocitos Th2 y reducción de la producción de citocinas de Th2 (por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13), provocando una reducción en la capacidad de un hospedador infectado para generar una respuesta inmunitaria adecuada frente a organismos invasores que requieran una respuesta dependiente de Th2 para eliminación (por ejemplo, infecciones parasitarias, producción de anticuerpos mucosos y humorales).

45 Las infecciones por HTLV conducen a infecciones oportunistas que dan como resultado bronquiectasia, dermatitis y superinfecciones con *Staphylococcus* spp. y *Strongyloides* spp. que dan como resultado muerte por septicemia polimicrobiana. La infección por HTLV también puede conducir directamente a leucemia/linfoma de células T del adulto y enfermedad de neuronas motoras superiores desmielinizante progresiva conocida como HAM/TSP. La eliminación de infecciones latentes de HTLV sería muy beneficiosa clínicamente. Los anticuerpos anti PD-L1 de la invención pueden combinarse con tratamientos convencionales para infecciones por HTLV para ventaja terapéutica

55 10) *VPH*

50 El virus del papiloma humano (VPH) afecta principalmente a queratinocitos y aparece en dos formas: cutánea y genital. Se cree que la transmisión se produce mediante contacto directo y/o actividad sexual. La infección por VPH tanto cutánea como genital puede dar como resultado verrugas e infecciones latentes y en ocasiones infecciones recurrentes, que son combatidas por la inmunidad del hospedador que combate los síntomas y bloquea la aparición de verrugas, pero deja al hospedador capaz de transmitir la infección a otros.

55 La infección con VPH también puede conducir a ciertos cánceres, tales como cáncer del cuello uterino, anal, vulvar, peneano y orofaríngeo. No hay ninguna cura conocida para infección por VPH, pero el tratamiento actual es la aplicación tópica de imiquimod, que estimula al sistema inmunitario para atacar el área afectada. La eliminación de

infecciones latentes de VPH sería muy beneficiosa clínicamente. Los anticuerpos anti PD-L1 de la invención pueden combinarse con tratamientos convencionales para infecciones por VPH para ventaja terapéutica.

c. hongos

- 5 Las infecciones fúngicas, o micosis, pueden resultar como una infección primaria o como colonización oportunista de hospedadores con sistemas inmunitarios comprometidos por flora endógena. La inmunidad a las micosis es principalmente celular, que implica neutrófilos, macrófagos, linfocitos y probablemente células citolíticas naturales (NK). Normalmente las micosis no son susceptibles de dirigir la destrucción por anticuerpo y complemento. Las 10 micosis invasivas sistémicas resultantes de infección primaria incluyen blastomicosis, coccidioidomicosis, histoplasmosis y paracoccidioidomicosis. Para infecciones crónicas que resultan de infecciones fúngicas, los anticuerpos anti PD-L1 de la invención pueden administrarse antes de, simultáneamente con o después de cualquiera de los tratamientos convencionalmente conocidos para estas micosis.
- 15 La blastomicosis, provocada por *Blastomyces dermatitidis*, es adquirida por inhalación y produce una infección pulmonar primaria o enfermedad diseminada de forma hematogena que implica predominantemente a la piel, los huesos y el aparato genitourinario masculino. La exposición primaria puede ser asintomática, o puede producir un síndrome de tipo gripal. Esta enfermedad puede manifestarse en una forma indolente crónica. La enfermedad también se asocia con inmunocomprometidos tales como en pacientes con SIDA. La terapia convencional para 20 infección por *B. dermatitidis* incluye itraconazol, ketoconazol o inyección intravenosa de anfotericina B.
- 25 La coccidioidomicosis, provocada por *Coccidioides immitis*, es adquirida por inhalación y puede provocar infección pulmonar primaria, enfermedad pulmonar progresiva o enfermedad diseminada de forma hematogena que implica predominantemente a la piel, los tejidos subcutáneos, los huesos, las articulaciones y las meninges. La exposición primaria puede ser asintomática (60 %) o estar asociada con un síndrome de tipo gripal. Pueden producirse neumonía, pleuritis y cavitación pulmonar. Las manifestaciones metastásicas incluyen lesiones cutáneas, incluyendo nódulos, úlceras, conductos sinusales de lugares más profundos y granulomas verrugosos, huesos, articulaciones, vainas de tendones y meninges, incluyendo meningitis. La enfermedad también se asocia con inmunidad comprometida tal como en pacientes con SIDA. El tratamiento para coccidioidomicosis incluye ketoconazol, 30 itraconazol y fluconazol, especialmente para terapia de mantenimiento a largo plazo de enfermedad no meningítica. Las formas meningíticas se tratan habitualmente con administración intratecal de Anfotericina B.
- 35 La histoplasmosis, provocada por *Histoplasma capsulatum*, es una enfermedad adquirida por inhalación del sistema reticuloendotelial en el que residen levaduras minúsculas en macrófagos. Puede producir infección pulmonar primaria, enfermedad pulmonar progresiva o enfermedad diseminada de forma hematogena que implican predominantemente al sistema reticuloendotelial, superficies mucosas y glándulas adrenales. La reactivación de infecciones latentes se produce con frecuencia en pacientes con inmunidad comprometida, tal como en pacientes con SIDA. La exposición primaria puede ser asintomática o estar asociada con un síndrome de tipo gripal, incluyendo neumonía, pleuritis, cavitación pulmonar y adenopatía mediastinal. Los sitios metastásicos incluyen el 40 sistema reticuloendotelial (hepatosplenomegalia, linfadenopatía, anemia, leucopenia y trombocitopenia), membranas mucosas (ulceraciones oronasofaringeas), tubo gastrointestinal (mala absorción) e insuficiencia adrenal. Aunque la mayoría de las infecciones primarias se resuelven de forma espontánea, cuando se asocian con inmunidad comprometida tal como en pacientes con SIDA, se produce recaída y se asocia con frecuencia con neumonía hematogena, SDRA, coagulación intravascular diseminada (CID), papulopústulas distribuidas de forma 45 hematogena y meningitis. La histoplasmosis se trata con anfotericina B (especialmente en pacientes inmunocomprometidos con enfermedad aguda de diseminación hematogena), itraconazoles y ketoconazol.
- 50 La paracoccidioidomicosis, provocada por *Paracoccidioides brasiliensis*, es una micosis adquirida por inhalación que puede producir infección pulmonar primaria o enfermedad diseminada de forma hematogena que implica predominantemente a la piel, a las membranas mucosas, al sistema reticulendotelial y las glándulas adrenales. La infección puede ser inicialmente asintomática, pero latente, y después reanudarse. El tratamiento de esta infección usa ketoconazol, itraconazol y sulfonamidas.
- 55 Las micosis invasivas sistémicas resultantes de patógenos oportunistas, que aparecen en hospedadores inmunocomprometidos, incluyen candidiasis, criptococosis, aspergilosis, mucomicosis y neumocistosis. Aumentando la respuesta inmunitaria en un sistema inmunitario comprometido, los anticuerpos anti PD-L1 de la invención también pueden tener valor terapéutico en el tratamiento de estas afecciones, especialmente cuando se combinan con terapias convencionales.
- 60 Los tratamientos para la candidiasis (provocada por *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*), criptococosis (provocada por *Cryptococcus neoformans*), aspergilosis (provocada por *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. tereus* y *A. niger*) y mucormicosis (provocada por *Rhizopus arrhizus*, *Rhizomuco*, *Absidia*, *Cunninghamella*, *Mortierella*, *Saksenaea* spp.) pueden tratarse por uno o más de los siguientes imidazol, ketoconazol, itraconazol, fluconazol, anfotericina B con y sin flucitosina. La neumocistosis (provocada por la *Pneumocystis carni*) recientemente reclasificada de protozoaria a fúngica se trata con trimetoprim-sulfametoxol (TMP-SMZ) e isetonato de pentamidina intravenoso, así como dapsona, TMP-dapsón, trimetrexato, clindamicina-primaquina y atovagrona.

- La microesporidiosis causada por parásitos de Microsporidia, se ha reclasificado recientemente de protozoaria a fúngica. Son organismos unicelulares que tienen mitosomas en lugar de mitocondrias. Los organismos que pueden provocar enfermedad en seres humanos incluyen: *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon hellem*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Pleistophora* spp., *Trachipleistophora hominis*, *Trachipleistophora anthropophthera*, *Nosema connori*, *Nosema ocularum*, *Brachiola vesicularum*, *Vittaforma cornea*, *Microsporidium ceylonensis*, *Microsporidium africanum*, *Brachiola algerae*.
- Se cree que las infecciones se transmiten a seres humanos por contacto directo con animales, agua contaminada u otro hospedador infectado. Después de infectar a células hospedadoras, el esporoplasma crece, dividiéndose o formando un plasmodio multinucleado que puede tener ciclos de vida complejos incluyendo reproducción tanto asexual como sexual. La autoinfección por generaciones sucesivas y enfermedades crónicas, debilitantes, con frecuencia caracterizan las infecciones Microsporidiales.
- Las manifestaciones clínicas de la enfermedad pueden variar dependiendo de la especie y el estado inmunitario del hospedador, e incluyen conjuntivitis (por ejemplo, *V. cornea*), diarrea crónica, mala absorción y debilitamiento (por ejemplo, *E. bieneusi*, *E. intestinalis*).
- Los tratamientos para la microsporidiosis ocular, intestinal y diseminada incluyen administración de albendazol. La aplicación tópica de fumagilina también puede usarse eficazmente para tratar queratoconjuntivitis microsporidial. Otros fármacos incluyen antihelminticos (por ejemplo, albendazol), antibióticos (por ejemplo, fumagilina), inmunomoduladores (por ejemplo, talidomida), antiprotozoarios (por ejemplo, metronidazol).
- d. protozoos**
- Las enfermedades resultantes de trastornos parasitarios tales como paludismo, esquistosomiasis y leishmaniosis están entre los problemas de salud más probablemente e importantes en países en desarrollo. Estas enfermedades plantean retos particulares porque pueden evadir la inmunidad del hospedador por diversos medios, incluyendo: 1) viviendo dentro de las células hospedadoras (por ejemplo, *Leishmania*), 2) cambiando rápidamente los antígenos de superficie (por ejemplo, tripanosomas) y 3) "disfrazándose" como células hospedadoras presentando antígenos hospedadores (por ejemplo, esquistosomiasis). El uso de fármacos inmunosupresores en el tratamiento de cáncer y junto con trasplante de órganos, así como la prevalencia global de SIDA puede reactivar infecciones latentes o subclínicas de *Plasmodium* spp., *Toxoplasma* spp., *Leishmania* spp., *Cryptosporidium* spp., *Trypanosoma* spp. y helmintos.
- Para infecciones crónicas resultantes de infecciones con parásitos protozoarios, los anticuerpos anti PD-L1 de la invención pueden combinarse por la administración en combinación con, antes de o después de terapias antiprotozoarias convencionales.
- El *paludismo* provocado por parásitos del género *Plasmodium* (por ejemplo, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. falciparum*, *P. vivax*), comienza el ciclo infeccioso como un esporozoito que se desarrolla en el intestino del mosquito anofelino hembra. Tras la transmisión a seres humanos, estos esporozoitos invaden y se multiplican dentro de células hepáticas sin inducir una reacción inflamatoria. La descendencia de estos organismos, denominada merozoitos, invade después células eritrocíticas e inicia la fase clínica de la enfermedad, caracterizada normalmente por fiebre y escalofríos. En áreas del mundo en las que la infección es endémica, casi todos los residentes albergan infecciones crónicas de bajo nivel continuas de patogenicidad baja a moderada, con niveles crecientes de anticuerpos IgG que proporcionan protección contra la entrada de merozoitos en eritrocitos.
- Los fármacos antipalúdicos disponibles en la actualidad tanto para el tratamiento de la enfermedad clínica como para la profilaxis incluyen: Artemeter-lumefantrina (terapia, por ejemplo, Coartem® y Riamet®), artesunate-amodiaquina (terapia), artesunato-mefloquina (terapia), artesunato-Sulfadoxina/pirimetamina (terapia), atovacuona-proguanilo, (terapia y profilaxis, por ejemplo, Malarone®), quinina (terapia), cloroquina (terapia y profilaxis), cotrifazid (terapia y profilaxis), doxiciclina (terapia y profilaxis), mefloquina (terapia y profilaxis, por ejemplo, Lariam®), primaquina (terapia en *P. vivax* y *P. ovale* solamente; no para profilaxis), proguanilo (profilaxis), sulfadoxina-pirimetamina (terapia y profilaxis), hidroxicloroquina, (terapia y profilaxis, por ejemplo, Plaquenil®).
- Mediante la reactivación de células T anérgicas, los anticuerpos anti PD-L1 de la invención pueden ser particularmente terapéuticos para ayudar a eliminar los parásitos de paludismo.
- La *toxoplasmosis*, provocada por parásitos del género *Toxoplasma*, es con frecuencia asintomática, pero una fracción pequeña puede desarrollar enfermedad clínica, que puede variar de linfadenopatía benigna aguda a infecciones letales del sistema nervioso central. Las fuentes de infección incluyen quistes en carne de cerdo o cordero cruda o parcialmente cocinada y ovocitos que se transmiten en las heces de gatos infectados. La infección se produce en seres humanos habitualmente a través del tubo gastrointestinal, y los protozoos pueden penetrar y proliferar (como taquizoitos) en prácticamente cada célula del cuerpo. Estos taquizoitos pueden producir quistes cargados con cuerpos infecciosos de crecimiento lento pequeños (bradizoitos) que permanecen viables durante

periodos de tiempo largos, dando como resultado una infección crónica latente. Los hospedadores con sistemas inmunitarios comprometidos, tales como los que toman fármacos inmunosupresores o padecen VIH son particularmente propensos a padecer toxoplasmosis.

- 5 Los medicamentos que se usan para tratar la toxoplasmosis primaria incluyen los siguientes: pirimetamina, tanto con antibiótico acompañante (por ejemplo, sulfadiazina, clindamicina, espiramicina y minociclina) como sin él. La toxoplasmosis latente puede tratarse con los antibióticos atovacuona, tanto con clindamicina como sin ella.
- 10 La leishmaniosis, provocada por parásitos del género *Leishmania*, infecta macrófagos de la piel y las vísceras, y se transmite a seres humanos a través de flebótomos. Dado que los anticuerpos séricos específicos son escasos o inexistentes, la inmunidad celular a través de células T activadas parece ser una vía crítica para eliminar la infección. La leishmaniosis del Viejo Mundo, también conocida como llaga tropical, está provocada por varias especies de *Leishmania*: *L. tropica*, *L. major* y *L. aethiopica*. La leishmaniosis del Nuevo Mundo está provocada por diversas subespecies de *L. Mexicana* y *L. braziliensis*. Estos parásitos inducen una fuerte respuesta inmunitaria celular, pero el resultado de la enfermedad clínica también depende en parte de la respuesta del hospedador. Si el hospedador genera una respuesta celular suprimida o inadecuada, el resultado es leishmaniosis cutánea crónica difusa, con poca esperanza de cura espontánea (por ejemplo, *L. aethiopica*, *L. mexicana*). Si el hospedador genera una respuesta celular excesiva, la respuesta es una leishmaniosis lupoide o recidivante, con nódulos linfoides no ulcerados persistentes que aparecen en el borde de lesiones primarias (por ejemplo, *L. tropica*). La leishmaniosis recidivante puede aparecer de 1 a 10 años después de la lesión inicial. Existen dos formas de la enfermedad, cutánea y visceral, manifestándose la forma cutánea en lesiones cutáneas con inmunidad mediada por células que es crítica para la eliminación. En la forma visceral, la inmunidad mediada por células es insuficiente o inexistente, y la enfermedad se manifiesta clínicamente como hipergammaglobulinemia de células B policlonales, leucopenia, esplenomegalia y producción elevada de TNF- α .
- 15 25 La miltefosina (por ejemplo, Impavido®) y paramiocina son tratamientos disponibles en la actualidad para leishmaniosis tanto cutánea como visceral.
- 30 La criptosporidiosis, está provocada por infecciones de protozoos del género *Cryptosporidia* y resulta del contacto humano directo con excremento fecal de hospedadores infectados. La infección de tejido mucoso intestinal puede dar como resultado diarrea. La enfermedad se manifiesta normalmente como una infección aguda, pero puede hacerse crónica, especialmente en individuos inmunocomprometidos. Los tratamientos suelen ser paliativos, especialmente hidratación, pero la paromomicina, azitromicina e Ig en suero (por ejemplo, Lactobin-R®) han sido exitosos en la eliminación de infección.
- 35 40 La tripanosomiasis, provocada por el parásito *Trypanosoma* (por ejemplo, *T. brucei*, subsp *gambiense*, *rhodesiense*) infecta a seres humanos y a vacas a través de picaduras de la mosca tsé-tsé. El problema que plantea este patógeno es el resultado de sucesivas generaciones de poblaciones que presentan diferentes抗ágenos de superficie. Las infecciones se caracterizan por niveles elevados de inmunoglobulinas en suero no específicas y no protectoras.
- 45 Los tratamientos para la tripanosomiasis incluyen la administración intravenosa de lo siguiente: pentamidina (para *T.b. gambiense*), suramina intravenosa (para *T.b. rhodesiense*), eflornitina, melarsoprol tanto con nifurtimox como sin éste.
- 50 55 La infección helmíntica, resultante de trematodos (por ejemplo, *Schistosoma* spp.), cestodos y nematodos, comparte las respuestas inmunitarias comunes de eosinofilia y anticuerpo reagénico, respuestas que son dependientes de células T.
- 60 La esquistosomiasis (también conocida como bilharziasis), provocada por *Shistosoma mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium* y *S. mekongi*, comienza su ciclo de vida como huevos en el agua, que después eclosionan en miracidios, que se introducen en caracoles y crean múltiples generaciones de esporocistos. Estos a su vez producen cercarias de cola bifurcada que pueden infectar el torrente sanguíneo de un hospedador humano como una esquistosómula, que migra inicialmente a los pulmones, y después al hígado. Estos trematodos con el tiempo se emparejan, se aparean y ponen huevos en las vérulas mesentéricas. Aunque muchos de estos huevos viajan a los intestinos y se excretan, algunos se inmovilizan en la submucosa, vérulas portas del hígado y otros órganos del cuerpo. La inflamación granulomatosa asociada con los huevos inmovilizados es el síntoma definitivo de esquistosomiasis crónica.
- 65 Los tratamientos para la esquistosomiasis incluyen la administración de Praziquantel®, antimonio, Oxamniquina (*S. mansoni*) y Mirazid®.
- 70 Las infecciones por cestodos pueden clasificarse en dos grupos, uno es el de cestodos adultos que habitan en el intestino tales como *Diphyllobothrium latum* y *Taenia saginata*, que tienen un efecto inmunitario no humorral, restringido. El segundo grupo describe cestodos larvarios que se enquistan en tejido migratorios tales como *Hymenolepis nana*, *Echinococcus granulosus* y *Taenia solium*, que inducen fuertes respuestas parenterales del hospedador y anticuerpos en suero protectores. La infección por cestodo más grave en seres humanos es

Echinococcosis, que cuando se implanta en el hígado, pulmones, cerebro, riñones u otras partes del cuerpo puede dar como resultado la formación de quistes de hidátides.

5 Los tratamientos para la *echinococcosis* incluyen la administración de metronidazol, albendazol e intervención quirúrgica, tal como retirada, aspiración, marsupialización u omentopexia.

10 Los nematodos son los helmintos más habituales, variados y ampliamente distribuidos que infectan a seres humanos, provocando trastornos tales como triquinosis, ascariasis, filariosis y estrongilodiosis. La triquinosis, provocada por *Trichinella spiralis*, puede resultar de la ingesta de larvas de *T. spiralis* en carne cruda o carne parcialmente cocinada tal como cerdo. En seres humanos, las infecciones inducen una fuerte respuesta humoral con IgM elevada, seguida de producción de IgG, seguida de rápida expulsión de gusanos con daño por anticuerpos por linfocitos T.

15 El único tratamiento conocido para exterminar gusanos adultos en el intestino es el tiabendazol, aunque no hay ningún tratamiento conocido que extermine las larvas.

20 El áscaris, también conocido como áscari (*Ascaris lumbricoides*), es un parásito habitual en seres humanos resultante de la ingesta de sustancias contaminadas fecalmente. Aunque los pacientes pueden permanecer asintomáticos durante períodos muy largos de tiempo, a medida que los estadios larvarios viajan a través del cuerpo, estos pueden provocar daño visceral, peritonitis e inflamación, agrandamiento del hígado o el bazo, toxicidad y neumonía.

25 Los tratamientos para la ascariasis incluyen la administración de mebendazol (por ejemplo, Vermox®), piperazina, pamoato de pirantel (por ejemplo, Antiminth®, Pin-Rid®, Pin-X®), albendazol, tiabendazol con o sin piperazina, hexilresorcinol, santonina y aceite de Quenopodio. Los anticuerpos anti PD-L1 de la invención pueden administrarse en combinación con, antes de o después de la administración de estas terapias para el tratamiento de *ascariasis*.

30 La filariosis, provocada por nematodos filáridos, se introduce en seres humanos por vectores de insectos. *Onchocerca volvulus*, que provoca oncoceriasis o ceguera del río, se transmite por picaduras de la mosca negra.

35 Las larvas infecciosas se alojan subcutáneamente y se desarrollan a adultos, inducen una respuesta fibrogénica del hospedador y desprenden grandes cantidades de microfilarias, que se dispersan subcutáneamente y por los ojos, induciendo además una queratosis o retininitis que después provoca que la córnea se haga opaca. La filariosis linfática resulta de infección por *Brugia* spp. y *Wuchereria* spp. A lo largo del tiempo, la cicatrización del tejido linfático, especialmente en la ingle, puede evitar el drenaje, dando como resultado la afección deformante elefantiasis.

40 El tratamiento primario para la filariosis es la administración del antibiótico ivermectina, abendazol y citrato de dietilcarbamazina (DEC, Hetrazan®) con o sin ivermectina o albendazol. Otras posibilidades de tratamiento incluyen doxiciclina, que destruye una bacteria simbiótica, la *wolbachia*.

45 La estrongilodiosis, provocada por parásitos del género *Strongyloides* (por ejemplo, *S. stercoralis*, *S. fulleborni*), es una enfermedad que se pasa a seres humanos a través de suelo contaminado fecalmente. Existen tanto en un ciclo de vida libre (larvas rabditiformes que maduran a gusanos adultos) así como un ciclo parasitario (larvas filariformes que maduran a gusanos adultos) que penetra en la piel, viaja a los pulmones, después a la faringe y en última instancia reside en el intestino. También se sabe que se produce autoinfección con *Strongyloides*, que es esencialmente infección repetida por generaciones sucesivas de larvas filariformes.

50 Las infecciones pueden ser asintomáticas o pueden caracterizarse por dolor y diarrea en el tubo gastrointestinal, síndrome de Loffler en los pulmones (es decir, eosinofilia) y urticaria. También puede estar presente eosinofilia en la sangre. Como la infección persistente de *Strongyloides* puede imitar la úlcera péptica, la enfermedad de la vesícula biliar y enfermedad de Crohn, su diagnóstico erróneo es habitual. Es un problema particular en hospedadores inmunocomprometidos.

55 Son tratamientos conocidos para *estrongilodiosis* ivermectina, albenazol o tiabendazol pero como esta medicación solamente mata a gusanos adultos, es necesaria una administración repetida.

e. vacunación

60 La vacunación o la administración de material antigénico para inducir inmunidad frente a enfermedad se usa habitualmente para prevenir o aliviar los efectos de infección por un patógeno. Puede usarse potenciación de la inmunidad del hospedador en antígenos no deseados hallados no solamente en patógenos infecciosos, sino también en tejido del hospedador que ha enfermado (por ejemplo, canceroso). Tradicionalmente, las vacunas derivan de patógenos completos debilitados o muertos, pero también pueden ser péptidos que representan epítopos en el patógeno intacto que son reconocidos específicamente por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I o clase II humano. Son antígenos peptídicos de interés particular que son reconocidos específicamente por las células T.

Recientemente, se ha mostrado que la combinación de una vacunación terapéutica con administración de bloqueo de PD-L1 en células T CD8+ agotadas da como resultado potenciación de la función y el control vírico en un modelo de ratón de infección crónica. Ha *et al.*, J. Exp. Med. 205 (3): 543-555 (2008). Como resultado, los anticuerpos anti

5 PD-L1 descritos en el presente documento también pueden combinarse con vacunación de antígenos (por ejemplo, administrada antes, simultáneamente o después) para tratar la infección (por ejemplo, aguda y crónica) resultante de invasión vírica, bacteriana, fúngica o protozoaria así como inmunidad tumoral.

G. Dosificaciones farmacéuticas:

10 Las dosificaciones y la concentración de fármaco deseada de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar dependiendo del uso particular previsto. La determinación de la dosificación o la vía de administración apropiada están dentro de la experiencia de un experto habitual. Los experimentos animales proporcionan una orientación fiable para la determinación de dosis eficaces para terapia humana. El cambio de escala entre especies de dosis eficaces puede realizarse siguiendo los principios planteados en Mordini, J. y Chappell, W. "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics", En Toxicocinétique and New Drug Development, Yacobi *et al.*, Eds, Pergamon Press, Nueva York 1989, págs. 42-46.

20 Cuando se usa la administración *in vivo* de los polipéptidos o anticuerpos descritos en el presente documento, las cantidades de dosificación normales pueden variar de aproximadamente 10 ng/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del mamífero o más al día, preferentemente de aproximadamente 1 mg/kg/día a 10 mg/kg/día, dependiendo de la vía de administración. Se proporciona en la bibliografía orientación con respecto a las dosificaciones y los métodos particulares de suministro; véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos n.º 4.657.760; 5.206.344; o 5.225.212. Está dentro del alcance de la invención que diferentes formulaciones sean eficaces para diferentes tratamientos y diferentes trastornos, y esa administración que se pretende que trate un órgano o tejido específico puede requerir suministro de una manera diferente a la de otro órgano o tejido. Además, las dosificaciones pueden administrarse por una o más administraciones separadas, o por infusión continua. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se supervisa fácilmente con técnicas y ensayos convencionales.

H. Administración de la formulación

35 Las formulaciones, incluyendo pero sin limitación, formulaciones reconstituidas y líquidas, se administran a un mamífero que necesite tratamiento con los anticuerpos anti PD-L1, preferentemente un ser humano de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa como una embolada o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o inhalación.

40 Las formulaciones pueden administrarse al mamífero por administración subcutánea (es decir debajo de la piel). Para dichos fines, la formulación puede inyectarse usando una jeringa. Sin embargo, están disponibles otros dispositivos para administración de la formulación tales como dispositivos de inyección (por ejemplo, los dispositivos INJECTEASE™ y GENJECT™); bolígrafos inyectores (tales como el GENPENT™); dispositivos autoinyectores, dispositivos sin aguja (por ejemplo, MEDIRECTOR™ y BIOJECTOR™); y sistemas de suministro de parche subcutáneo.

45 En el presente documento también se describen kits para una unidad de administración de una sola dosis. Dichos kits pueden comprender un recipiente de una formulación acuosa de proteína o anticuerpo terapéutico, incluyendo jeringas precargadas tanto de una cámara como de múltiples cámaras. En Vetter GmbH, Ravensburg, Alemania, se dispone de jeringas precargadas ilustrativas.

55 La dosificación apropiada ("cantidad terapéuticamente eficaz") de la proteína dependerá, por ejemplo, de la afección para tratar, la gravedad y la evolución de la afección, si la proteína se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del paciente y su respuesta a anticuerpo anti PD-L1, el formato de la formulación usado, y el criterio del médico a cargo. El anticuerpo anti PD-L1 se administra convenientemente al paciente en una sola vez o durante una serie de tratamientos y puede administrarse al paciente en cualquier momento desde el diagnóstico en adelante. El anticuerpo anti PD-L1 puede administrarse como el único tratamiento o junto con otros fármacos o terapias útiles en el tratamiento de la afección en cuestión.

60 Para anticuerpos anti PD-L1, una dosificación candidata inicial puede variar de aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg para administración al paciente, que puede tomar la forma de una o más administraciones separadas. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El progreso de dicha terapia se supervisa fácilmente por técnicas convencionales.

I. Artículos de fabricación

La divulgación también se refiere a un artículo de fabricación que contiene la formulación y preferentemente proporciona instrucciones para su uso. El artículo de fabricación comprende un recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales (por ejemplo viales de cámara doble), jeringas (tales como jeringas de cámara individual o doble) y tubos de ensayo. El recipiente puede formarse a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene la formulación. La etiqueta que está en recipiente o asociada al mismo, puede indicar instrucciones para la reconstitución y/o el uso. La etiqueta puede indicar además que la formulación es útil o que se pretende que se use para la administración subcutánea, y/o para el tratamiento de un trastorno disfuncional de células T. El recipiente que contiene la formulación puede ser un vial multiuso, que permite administraciones repetidas (por ejemplo de 2 a 6 administraciones) de la formulación reconstituida. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un diluyente adecuado (por ejemplo BWFI). Tras mezclar el diluyente y la formulación liofilizada, la concentración de proteínas final en la formulación reconstituida generalmente será de al menos 50 mg/ml. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones para su uso.

La invención se entenderá más completamente en referencia a los siguientes ejemplos. No deberían, sin embargo, interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

La divulgación también se refiere a un artículo de fabricación que comprende las formulaciones descritas en el presente documento para su administración en un dispositivo autoinyector. Un autoinyector puede describirse como un dispositivo de inyección que al activarse suministra su contenido sin necesidad de que el paciente o el administrador tenga que realizar ninguna otra acción. Son particularmente adecuados para la automedicación de formulaciones terapéuticas cuando la velocidad de suministro debe ser constante y el tiempo de suministro es superior a unos instantes.

EJEMPLO 1

Identificación de anticuerpos anti PD-L1 en fagotecas

Clasificación y exploración de bibliotecas para identificar anticuerpos anti PD-L1

Se usaron fusiones de PD-L1-Fc humana (R&D Systems, cat n.º 156-B7) y murina (R&D Systems, cat n.º 1019-B7) como antígenos para clasificación de biblioteca alternativa. Específicamente, las fagotecas se clasificaron en primer lugar contra antígeno humano, seguido de antígeno murino, humano y murino en los tres ciclos siguientes. Se recubrieron inmunoplacas Nunc de 96 pocillos Maxisorp® durante una noche a 4 °C con antígeno diana (10 µg/ml) y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con tampón de bloqueo de fagos PBST (solución salina tamponada con fosfato (PBS) y albúmina de suero bovino (BSA) 1 % (p/v) y tween-20 0,05 % (v/v)). Se añadieron fagotecas de anticuerpos VH (véase, por ejemplo, Lee *et al.*, J. Immunol., Meth. 284: 119-132, 2004) y VH/VL (véase Liang *et al.*, J. Mol. Biol. 366: 815-829, 2007) a placas de antígenos por separado y se incubaron durante una noche a temperatura ambiente. Al día siguientes las placas recubiertas con antígenos se lavaron diez veces con PBT (PBS con Tween-20 0,05 %), y los fagos unidos se eluyeron con HCl 50 mM y NaCl 500 mM durante 30 minutos y se neutralizaron con un mismo volumen de base Tris 1 M (pH 7,5). Los fagos recuperados se amplificaron en células *E. coli* XL-1 Blue. Durante los ciclos de selección posteriores, la incubación de fagos de anticuerpos con las placas recubiertas con antígeno se redujo a 2-3 horas, y la rigurosidad del lavado de las placas se aumentó gradualmente.

Después de 4 ciclos de selección, se observó un enriquecimiento significativo. Se tomaron 96 clones de cada una de la clasificación de bibliotecas de VH y VH/VL para determinar si se unían específicamente con PD-L1-Fc tanto humano como murino. Las regiones variables de estos clones se secuenciaron por PCR para identificar clones de secuencia única.

Los clones parentales de interés se cambiaron de formato a IgG clonando regiones V_L y V_H de clones individuales en el vector LPG3 y LPG4 (Lee *et al.*, mencionado anteriormente), respectivamente, que se expresan de forma transitoria en células CHO de mamífero, y purificando con una columna de proteína A. Los 13 anticuerpos de fagos se evaluaron con respecto a su capacidad para bloquear la interacción entre la proteína de fusión PD-1-Fc soluble y PD-L1 humana o de ratón expresada en células 293 (los valores de C_{50} se designan en la Tabla 1-mitad superior). YW243.55, el anticuerpo con la menor C_{50} para bloqueo de unión de PD-L1 humano con PD-1 se seleccionó para maduración de afinidad posterior para mejorar su afinidad para PD-L1 tanto humano como de ratón. (Tabla 1). Un anticuerpo con reactividad cruzada comparable contra especies tanto de primate como murinas (así como que conservan la afinidad por ser humano) proporcionaría un producto terapéutico con mayor valor, en que el mismo anticuerpo que se ha caracterizado bien en modelos experimentales puede usarse en ensayos clínicos humanos. Esto evita el resultado incierto del uso de un sustituto específico de modelo.

Bibliotecas de construcciones para la mejora de la afinidad de clones derivados de la biblioteca de V_H

El fagémido pW0703 (derivado del fagémido pV0350-2b (Lee *et al.*, J. Mol. Biol 340: 1073-1093 (2004)), que contenía el codón de terminación (TAA) en todas las posiciones de CDR-L3 y que presentaba Fab monovalente en la superficie de bacteriófago M13), actuó como el molde de la biblioteca para injertar dominios variables de cadena pesada (V_H) de clones de interés de la biblioteca de V_H para la maduración de afinidad. Se usaron estrategias de selección aleatoria tanto fuerte como suave para la maduración de afinidad. Para la selección aleatoria fuerte, se selecciona aleatoriamente una biblioteca de cadena ligera con posiciones seleccionadas de las tres CDR de cadena ligera usando aminoácidos diseñados para imitar los anticuerpos humanos naturales y la degradación del ADN diseñado fue como se ha descrito en Lee *et al.* (J. Mol. Biol 340, 1073-1093 (2004)). Para la selección aleatoria suave, los objetivos fueron los restos en las posiciones 91-94 y 96 de CDR-L3, 28-31 y 34-35 de CDR-H1, 50, 52 y 53-58 de CDR-H2, 95-99 y 100A de CDR-H3; y se seleccionaron dos combinaciones diferentes de bucles de CDR, L3/H1/H2 y L3/H3 para clasificación aleatoria. Para conseguir las condiciones de clasificación aleatoria suave, que introducía la tasa de mutación de aproximadamente 50 % en las posiciones seleccionadas, el ADN mutagénico se sintetizó con mezclas 70-10-10-10 de bases que favorecen los nucleótidos de tipo silvestre (Gallop *et al.*, Journal of Medicinal Chemistry 37: 1233-1251 (1994)).

Clasificación de fagos para generar mejora de afinidad

Los clones de fagos previamente identificados se sometieron a clasificación en placas para el primer ciclo, seguido de cinco o seis ciclos de clasificación en solución. Las bibliotecas se clasificaron frente a PD-L1-Fc humano y murino por separado (R&D Systems, cat. n.º 156-B7, cat n.º 1019-B7, respectivamente). Para la diana de PD-L1-Fc humana, en el primer ciclo de clasificación en placas, se clasificaron tres bibliotecas frente a placa recubierta con diana (placa NUNC Maxisorp®) por separado con aportación de fago de aproximadamente 3 D.O./ml en BSA 1 % y Tween 20 0,05 % durante 2 horas a temperatura ambiente. Después del primer ciclo de clasificación en placas, se realizó clasificación en solución para aumentar la rigurosidad de la selección. Para clasificación en solución, se incubó 1 D.O./ml de fago propagado a partir del primer ciclo de clasificación en placas con proteína diana biotinilada 20 nM (la concentración se basa en el valor de CI_{50} de fago de clon parental) en 100 µl de tampón que contiene Superblock 1 % (Pierce Biotechnology) y Tween-20 0,05 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó adicionalmente 10X con Superblock 1 %, y se aplicaron 100 µl/pocillo a pocillos recubiertos con neutravidina (5 µg/ml) durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación suave de modo que la diana biotinilada se unió al fago. Los pocillos se lavaron 10 x con PBS-Tween-20 0,05 %. Para determinar la unión de fondo, se capturaron pocillos de control que contenían fagos con dianas que no estaban biotiniladas en placas recubiertas con neutravidina. El fago unido se eluyó con HCl 0,1 N durante 20 minutos, se neutralizó por volumen 1/10 de Tris 1 M (pH-11), se valoró y se propagó durante el siguiente ciclo. A continuación, se llevaron a cabo cinco ciclos más de clasificación en solución junto con dos métodos de rigurosidad de selección creciente. El primero de ellos es para selección de velocidad de recepción por reducción de la concentración de proteína diana biotinilada de 4 nM a 0,5 nM, y el segundo de ellos es para selección de velocidad de disociación mediante la adición de cantidades en exceso de proteína diana no biotinilada (100-2000 veces más) para retirar por competición agentes de unión más débiles a temperatura ambiente o 37 °C. Además, el aporte del fago se redujo (0,1-0,5 D.O./ml) para reducir la unión del fago de fondo. Para diana de PD-L1-Fc murina, el método de clasificación de fagos es similar al descrito anteriormente para el antígeno de PD-L1 Fc humano, con algunas modificaciones. Específicamente, se usó PD-L1-Fc murino biotinilado 100 nM para selección de solución inmediatamente después del primer ciclo de selección en placas. En los cuatro ciclos posteriores de selección en solución, la diana biotinilada se redujo de 10 nM a 1 nM, y se añadió un exceso de 200-500 veces de diana no biotinilada a temperatura ambiente.

A continuación, los clones madurados por afinidad se sometieron a una exploración adicional con el procedimiento de ELISA de exploración de afinidad de alto rendimiento descrito en el siguiente ejemplo.

ELISA de exploración de afinidad de alto rendimiento (competición de un solo punto)

Se seleccionaron colonias de la séptima y sexta rondas de exploración para la diana de PD-L1 humana y murina, respectivamente. Las colonias se cultivaron durante una noche a 37 °C en medio 2YT 150 µl/pocillo con carbenicilina 50 µg/ml y KO7 1E10/ml en placas de 96 pocillos (Falcon). A partir de la misma placa, se seleccionó una colonia de fago parental infectado por XL-1 como control. Se recubrieron placas Nunc Maxisorp® de 96 pocillos con 100 µl/pocillo de proteína PD-L1-Fc humana y murina (2 µg/ml) por separado en PBS a 4 °C durante una noche o a temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas se bloquearon con 65 µl de BSA 1 % durante 30 minutos y 40 µl de Tween 20 1 % durante otros 30 minutos.

El sobrenadante de fago se diluyó 1:10 en tampón de ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) (PBS con BSA 0,5 %, Tween-20 0,05 %) con o sin proteína diana 10 nM en 100 µl de volumen total y se incubó al menos 1 hora a temperatura ambiente en una placa F (NUNC). Se transfirieron 75 µl de mezcla con o sin proteína diana en paralelo a las placas recubiertas con proteína diana. La placa se agitó suavemente durante 15 minutos para permitir la captura de fago no unido en la placa recubierta con proteína diana. La placa se lavó al menos cinco veces con PBS-Tween-20 0,05 %. La unión se cuantificó añadiendo anticuerpo anti M13 conjugado con peroxidasa de rábano rusticano (HRP) en tampón de ELISA (1:5000) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS-Tween 20 0,05 % al menos cinco veces. A continuación, se añadieron 100 µl/pocillo de una relación 1:1 de sustrato de peroxidasa 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y Solución de Peroxidasa B (H_2O_2)

(Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)) al pocillo y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo 100 μ l de ácido fosfórico 1 M (H_3PO_4) a cada pocillo y se permitió que se incubara durante 5 minutos a temperatura ambiente. La DO (densidad óptica) del color amarillo en cada pocillo se determinó usando un lector de placas de ELISA convencional a 450 nm. La reducción de DO (%) se calculó por la siguiente ecuación.

$$\text{Reducción de DO}_{450\text{nm}} (\%) = [(\text{DO}_{450\text{nm}} \text{ de pocillos con competidor}) / (\text{DO}_{450\text{nm}} \text{ de pocillos sin competidor})] \times 100$$

En comparación con la reducción de DO_{450nm} (%) del pocillo de fago parental (100 %), los clones que tenían la reducción de DO_{450nm} (%) menor de 50 % para la diana tanto humana como murina se seleccionaron para análisis posterior. Se seleccionaron clones únicos para preparación de fagos para determinar la afinidad de unión (Cl_{50} de fagos) frente a PD-L-Fc tanto humano como murino por comparación con clones parentales.

Materiales

hPD-1-Fc, hPD-L1-Fc, hB7.1-Fc, mPD-1-Fc, mPD-L1-Fc y mB7.1 se obtuvieron en R&D Systems. Se generaron células 293 que expresaban hPD-L1 en Genentech usando técnicas convencionales. Se obtuvo IgG Fc F(ab')₂ de cabra anti humano de Jackson ImmunoResearch Laboratories.

Conjugación de proteínas

Las proteínas las proteínas PD-1-Fc y B7.1-Fc se biotinilaron con EZ-Link sulfo-NHS-LC-LC-biotina (Pierce) durante 30 minutos a temperatura ambiente como describe el fabricante. Se retiró el exceso de biotina que no había reaccionado con columnas de alta capacidad de centrifugación rápida, G50-Sephadex (Roche) como describe el fabricante.

El IgG Fc F(ab')₂ de cabra anti humano se marcó con Rutenio con MSD Sulfo-Tag NHS-Éster (Meso Scale Discovery) como describe el fabricante y el Sulfo-Tag que no había reaccionado en exceso se retiró con Columna de Alta Capacidad de Centrifugación Rápida, G50-Sephadex.

Ensayo de unión celular ECL para analizar anticuerpos de fagos

Se midieron las concentraciones de anticuerpos que daban como resultado inhibición al 50 % (Cl_{50}) de la unión de hPD-1-Fc con células 293 que expresaban hPD-L1 por ensayo de unión celular electroquimioluminiscente (ECL). Las células 293 que expresaban hPD-L1 se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se sembraron a 25.000 células por pocillo en 25 μ l de PBS en placa de alta unión de 96 pocillos (Meso Scale Discovery). Se incubaron placas a temperatura ambiente para permitir que las células se unieran a la superficie de carbono de la placa. Se añadieron 25 ml de FBS al 30 % a cada pocillo y se incubó la placa durante 30 minutos con agitación suave para bloquear los sitios de unión no específicos. Se lavó la placa tres veces en un lavador de microplacas de ELISA (ELx405 Select, Bio-Tek Instruments) en condiciones de distribución y aspiración suaves. El PBS sobrante se retiró de los pocillos aplicando papel absorbente sobre las placas. Se añadieron 12,5 μ l de concentración 2X de anticuerpos a cada pocillo en FBS 3 % en PBS (tampón de ensayo) y seguido de 12,5 μ l de hPD-1-biotina 4 μ g/ml (concentración 2X) en tampón de ensayo y se incubó la placa durante una hora con agitación suave. La placa se lavó 3 veces con PBS en un lavador de microplacas y se secó con papel absorbente. Se añadieron 25 μ l de 2 μ g/ml de Estreptavidina-Rutenio (Meso Scale Discovery) y se incubaron en tampón de ensayo a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación suave. La placa se lavó 3 veces con PBS en un lavador de microplacas y se secó en papel absorbente. Se añadieron 150 μ l de Tampón de Lectura MSD 1X sin tensioactivo (Meso Scale Discovery). Se leyó la luz de luminiscencia emitida a 620 nm en el lector Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery). Los valores de ECL se analizaron con las concentraciones de los anticuerpos de ensayo usados en el ensayo, usando un ajuste de mínimos cuadráticos no lineal de cuatro parámetros, para obtener los valores de Cl_{50} de cada competidor en el ensayo

Resultados y análisis:

Se eligieron quince anticuerpos de fagos únicos derivados de YW243.55 que se unían con PD-L1 tanto humano como murino y se cambiaron de formato a anticuerpos IgG1 de longitud completa para evaluación adicional. Las secuencias de región variable de cadena ligera y pesada de estos anticuerpos se presentan en las Figuras 11A y B.

Los quince Ab reformateados se ensayaron con respecto a su capacidad para bloquear la unión de PD-1 con células 293 que expresaban PD-L1 humano o de ratón mediante un ensayo de unión celular electroquimioluminiscente (ECL). (Tabla 1-mitad inferior): en la Tabla 1, "Formato 1" describe unión de PD-1-Fc humano soluble con células 293 transfectadas con PD-L1 humano; "Formato 2" describe la unión de PD-1-Fc murino con células 293 transfectadas con PD-L1 murino y "Formato 3" describe la unión de PD-1 humano con células 293 transfectadas con PD-L1 murino. Aunque los quince Ab con afinidad mejorada habían adquirido reactividad cruzada significativa con PD-L1 de ratón, se seleccionó YW243.55S70 como el candidato primario para investigar basándose en su capacidad para bloquear la unión de PD-L1 tanto humano como de ratón con PD-1 (Tabla 1: valores de Cl_{50} de 49 pM y 22 pM, respectivamente).

Tabla 1

Clon	Formato 1	Formato 2	Formato 3
	hPD1-Fc-biotina/ hPDL1-293 CI ₅₀ en nM	mPD1-Fc-biotina/ mPDL1-293 CI ₅₀ en nM	hPD1-Fc-biotina/ mPDL1-293 CI ₅₀ en nM
YW251.11	8,6		
YW 243.1	0,234		
YW243.55	0,099		>100
YW254.1	>100	0,795	
YW254.2	>100	3,76	
YW254.3	>100	>100	
YW254.4	1,73	15,6	
YW254.9	>100	0,224	
YW254.33	2,2	>100	
YW262.4	50	1,42	
YW262.5	90	25	
YW262.16	7,5	0,626	
YW262.64	0,256	100	
YW243.55.5	0,104		0,141
YW243.55.8	0,061		0,063
YW243.55.30	0,108		0,100
YW243.55.34	0,084		0,049
YW243.55.49	0,08		0,032
YW243.55.51	0,078		0,031
YW243.55.62	0,096		0,066
YW243.55.84	0,124		0,051
YW243.55.89	0,066		0,13
YW243.55.H12	0,103		0,156
YW243.55.H37	0,109		0,163
YW243.55.H70	0,084		0,042
YW243.55.S1	0,114		0,074
YW243.55.S37	0,100		0,024
YW243.55.S70	0,049		0,022

EJEMPLO 2

5 Caracterización de anticuerpos anti PD-L1 (BIAcore)

Se midieron las afinidades de unión de anticuerpos anti fagos de PD-L1 YW243.55 y YW243.55S70 contra PD-L1 humano y de ratón recombinante por resonancia de plasmón superficial (SRP) usando un instrumento BIAcore™-3000. Se recubrieron microplacas biosensoras CM5 directamente con PD-L1-Fc humano recombinante (R&D Systems, cat n.º 156-B7) y PD-L1-Fc de ratón recombinante (R&D Systems, cat n.º 1019-B7) para conseguir aproximadamente 500 unidades de respuesta (UR). Para mediciones de cinética, se inyectaron diluciones en serie dobles (3,9 nm a 500 nm) en tampón PBT (PBS con Tween-20 0,05 %) a 25 °C con un caudal de 30 µl/min. Las velocidades de asociación (k_{on}) y velocidad de disociación (k_{off}) se calcularon usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno sencillo (Software BIAcore Evaluation versión 3.2). La constante de disociación en equilibrio (kD) se calculó como la relación k_{off}/k_{on} .

Las afinidades de unión de clones de anticuerpos anti fago PD-L1 YW243.55 y YW243.55.S70 medidas se indican a continuación en la Tabla 2

Tabla 2

Clon	rhPD-L1 Fc inmovilizado			rmPD-L1 Fc inmovilizado		
	$k_{on}/(1/Ms)$	$k_{off}/(1/s)$	$KD(M)$	$k_{on}/(1/Ms)$	$k_{off}/(1/s)$	$KD(M)$
	$5,80 \times 10^5$	$7,30 \times 10^{-3}$	$1,26 \times 10^{-8}$	--	--	$> 1 \times 10^{-6}$
YW243.55 (Fab)	$2,70 \times 10^5$	$2,60 \times 10^{-4}$	$9,63 \times 10^{-10}$	$5,80 \times 10^4$	$9,20 \times 10^{-3}$	$1,59 \times 10^{-7}$
YW243.55.S70 (Fab)	$5,30 \times 10^5$	$1,00 \times 10^{-4}$	$1,89 \times 10^{-10}$	$4,80 \times 10^5$	$1,40 \times 10^{-3}$	$2,92 \times 10^{-9}$
YW243.55.S70 (IgG)	$3,90 \times 10^5$	$6,30 \times 10^{-5}$	$1,62 \times 10^{-10}$	$2,80 \times 10^5$	$1,80 \times 10^{-4}$	$6,43 \times 10^{-10}$

EJEMPLO 3A

- 5 Especificidad del anticuerpo anti PD-L1 por PD-L1 humano, de macaco de la India y de ratón-ensayo de unión a células de FACS y radioligandos)

Este ejemplo muestra la especificidad del anticuerpo anti-PD-L1 de la invención por PD-L1 humano, de macaco de la India (anteriormente *Macacus rhesus* y ahora *Macaca mulatta* o su nombre vulgar macaco de la India) y de ratón. Además, muestra la afinidad del Ab por PD-L1 de ratón y humano expresada en la membrana celular en células transfectadas 293.

10 PD-L1 humano y de ratón se transfeció de forma estable en células 293. Se recogieron células y se sembraron a 150.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos para estudios de unión.

15 Se obtuvo sangre de macaco de la India de Southwest Foundation for Biomedical Research (San Antonio, Texas). Se diluyó la sangre con un mismo volumen de PBS y se superpuso en Ficoll-Paque 96 % (GE Healthcare) para la separación de células mononucleares. Los glóbulos rojos de las células mononucleares se sometieron a lisis usando tampón de lisis de eritrocitos (Qiagen) y se cultivaron durante una noche a $1,5 \times 10^6$ células/ml con PMA 5 ng/ml más ionomicina 1 μ M en placas de 6 pocillos. El medio de cultivo fue RPMI 1640 con suero bovino fetal 10 %, HEPES 20 μ M y diluciones 1:100 de los siguientes complementos de Gibco: Gluta-MAX, piruvato sódico, penicilina/estreptomicina y aminoácidos no esenciales. Las células se recogieron el día siguiente y se separaron en alícuotas en una placa de 96 pocillos para estudios de unión (aproximadamente 120.000 células por pocillo).

20 25 El anticuerpo de PD-L1 YW243.55.S70 o control de anticuerpo Herceptin® se valoraron comenzando a 10 μ g/ml, en diluciones en serie triples y se unieron a células en volúmenes de 50 μ l durante 25 minutos en hielo. Las células se lavaron y después se unieron con IgG PE antihumano (Caltag) a 20 μ g/ml durante 25 minutos en hielo. Las células de macaco de la India también se tiñeron conjuntamente con CD3 FITC y CD4 APC (BD Biosciences) para distinguir células T CD4+.

30 35 Todas las muestras se procesaron en un Beckman Dickinson FACSCalibur y se analizó la Intensidad de Fluorescencia Media de datos de unión de PD-L1 en función de la concentración de anticuerpo anti-PD-L1 usando software Tree Star, Inc. FlowJo®; se calcularon valores de CE_{50} (concentración de Ab asociada con unión semimáxima) usando Kaleidagraph. Además, se realizaron estudios de unión en equilibrio para definir las afinidades precisas (Kd) para unión de YW243.55.S70 con PD-L1 humano y de ratón expresado en células 293 (Ejemplo 3B). Estos valores se resumen a continuación en la Tabla 3:

Tabla 3

Resumen de CE_{50}		
Especie	CE_{50} (nm) por FACS	Kd (nM) por unión de radioligando en equilibrio
Humana	0,4	0,4
Macaco de la India	0,3	
Ratón	0,3	0,13
Rata	0,8	

EJEMPLO 3B

Medición de afinidad de Ab anti-PD-L1 por PD-L1 humano y de ratón - Ensayo de Unión Celular de radioligando de unión en equilibrio

5 Se cultivaron células 293 transfectadas con PD-L1 humano y de ratón en medio de cultivo, que consistía en medio RPMI 1640 complementado con suero bovino fetal (FBS) 10 %, L-glutamina 2 mM, penicilina-estreptomicina 1X, a 37 °C en CO₂ 5 %. Las células se lavaron con tampón de unión (DMEM/F12 50:50 con FBS 2 % y Hepes 50 mM, pH 7,2) y se colocaron en placas de 96 pocillos a aproximadamente 230.000 células en 0,2 ml de tampón de unión. El anticuerpo anti-PD-L1, YW243.55.S70.hlgG, se yodó usando el método de Iodogen. Los anticuerpos anti-PD-L1 radiomarcados se purificaron a partir de ¹²⁵I-NA por filtración en gel usando una columna NAP-5; el Ab purificado tuvo una actividad específica de 17,41 µCi/µg. Se colocaron mezclas de reacción de competición de 50 µl de volumen que contenían una concentración fija de anticuerpo yodado y concentraciones decrecientes de anticuerpo no marcado diluido en serie en placas de 96 pocillos. Se cultivaron líneas celulares transfectantes estables 293 que expresaban PD-L1 humano y PD-L1 murino en medio de cultivo, que consistía en medio DMEM/F12 50:50 complementado con suero bovino fetal (FBS) 10 %, L-glutamina 2 mM, penicilina-estreptomicina 1X, a 37 °C en CO₂ 5 %. Las células se lavaron con tampón de unión (DMEM/F12 50:50 con FBS 2 %, HEPES 50 mM, pH 7,2 y azida sódica 2 mM) y se añadieron a una densidad aproximada de 200.000 células en 0,2 ml de tampón de unión a las mezclas de reacción de competición de 50 µl. La concentración final del anticuerpo yodado en cada reacción de competición con células fue de ~150 pM (~120.000 cpm por cada 0,25 ml) y la concentración final del anticuerpo no marcado en la reacción de competición con células varió, comenzando a 500 nM y después reduciéndose en 2 veces durante 10 concentraciones. Las reacciones de competición con células se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las reacciones de competición con células para cada concentración de anticuerpo no marcado se ensayaron por triplicado. Después de la incubación de 2 horas, las reacciones de competición se transfirieron a una placa de filtro Millipore Multi Screen y se lavaron 4X con tampón de unión para separar el anticuerpo yodado libre del unido. Los filtros se contaron en un contador gamma Wallace Wizard 1470 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences Inc. Wellesley, MA). Los datos de unión se evaluaron usando software NewLigand (Genentech), que usa el algoritmo de ajuste de Munson y Robard para determinar la afinidad de unión del anticuerpo. Musson *et al.*, Anal. Biochem. 107:220-39 (1980).

10 30 Los valores Kd como se determinan por análisis de Scatchard corroboran los valores de CE50 de la unión del anticuerpo anti-PD-L1 con PD-L1 humano y de ratón como se muestra en la Tabla 3.

EJEMPLO 4

Selectividad y Afinidad de Ab anti-PD-L1 (Cl₅₀)

35 Este ejemplo muestra el ensayo de selectividad y afinidad de unión (como Cl₅₀) usado para evaluar los anticuerpos anti-PD-L1 de longitud completa de la presente invención con respecto a su capacidad para bloquear la unión de PD-L1 tanto con PD-1 como con B7.1.

40 *Métodos:*ELISA de unión de HB7.1-Fc-biotina y hPD-1-Fc-biotina con hPD-L1-Fc (Formato 4):

45 Se descubrió una placa de 384 pocillos Nunc Maxisorp con 25 µl de hPD-L1-Fc 250 ng/ml en PBS durante una noche. Se lavaron los pocillos tres veces con Tween 0,05 % PBS (tampón de lavado) en un lavador de microplacas y se bloquearon los pocillos con BSA 0,5 % en PBS. Se añadieron 12,5 µl de concentración 2X de anticuerpos a cada pocillo en Tween 0,05 %, BSA 0,5 % en PBS (Diluyente de Ensayo) y seguido de 12,5 µl de HB7.1-Fc-biotina 250 ng/ml (concentración 2X) en Diluyente de Ensayo y se incubó la placa durante una hora y media con agitación. Se lavaron los pocillos seis veces con tampón de lavado y se añadieron 25 µl de estreptavidina-HRP (1:40.000 en Diluyente de Ensayo, GE Healthcare). Se incubó la placa durante 30 minutos con agitación y se lavaron los pocillos seis veces con tampón de lavado. Se añadieron 25 µl de sustrato de TMB (Kirkegaard and Perry Laboratories) durante una hora y se detuvo la reacción con 25 µl de Ácido Fosfórico 1 M. Se leyó la absorbancia a 450 nm y se analizaron los valores de Cl₅₀ como se describe en el ensayo de unión celular ECL en el Ejemplo 1.

55 *Formatos 5, 6, 7:*

Para unión de hPD-1-Fc-biotina con hPD-L1-Fc (Formato 5), el formato es similar al del ensayo anterior excepto que se usó hPD-1-Fc-biotina en lugar de HB7.1-Fc-biotina para unión. El tiempo de reacción del sustrato de TMB fue de 17 minutos.

60 Para la unión de mB7.1-Fc-biotina con mPD-L1-Fc (Formato 6), el formato es similar al Formato 5, excepto que se usó mPD-L1-Fc para recubrir la placa en lugar de hPD-L1-Fc y se usó mB7.1-Fc-biotina para unión en lugar de HB7.1-Fc-biotina. El tiempo de reacción de sustrato de TMB fue de 7 minutos.

Para la unión de mPD-1-Fc-biotina con mPD-L1-Fc (Formato 7), el formato es similar al ELISA de ratón mencionado anteriormente excepto que se usó mPD-1-Fc-biotina para unión en lugar de mB7.1-Fc-biotina. El tiempo de reacción del sustrato de TMB fue de 5 minutos.

5 **Resultados:**

Se presenta la evaluación de la Cl_{50} del anticuerpo anti-PD-L1 del fago de afinidad madurada YW243.55.S70 para bloquear interacciones entre los pares de unión designados en la Tabla 4. YW243.55S70 fue capaz de bloquear la unión de PD-L1 humano con hB7.1 Fc con una concentración inhibidora semimáxima de 38 pM, una concentración relativamente comparable a su valor de Cl_{50} para bloquear la interacción de PD-L1/PD-1 (42 pM). Los estudios de Biacore que median la capacidad de YW243.55S70 para bloquear la interacciones de PD-L1 tanto con PD-1 como con B7.1 fueron coherentes con estos resultados de ELISA (datos no mostrados).

10 **Tabla 4**

Anticuerpo	Formato 4 Cl_{50} de hB7.1-biotina/hPD-L1 en pM	Formato 5 Cl_{50} hPD-1-biotina/hPD-L1 en pM	Formato 6 Cl_{50} mB7.1-biotina/mPD-L1 en pM	Formato 7 Cl_{50} mPD-1-biotina/mPD-L1 en pM
YW243.55.S70	38	42	29	48

15 **EJEMPLO 5**

20 **Ensayo *in vitro* PMEL/B16 de potenciación de la actividad de células T CD4+ y CD8+ *in vitro* mediante anticuerpo anti-PD-L1 YW243.55.S70**

25 Este ejemplo muestra el efecto de los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención tras la activación de células T CD8⁺ transgénicas para el receptor de células T PMEL, como se mide por potenciación de la producción de γ -IFN en respuesta al péptido melanocitario, gp100. En este procedimiento, se obtienen células T CD8⁺ de ratones transgénicos PMEL TCR cuyas células T CD8⁺ expresan un TCR específico para el péptido gp100. Despues de la purificación de las células T CD8⁺, se realizan múltiples ciclos de estimulación para generar y expandir las células T CD8⁺ activadas, que después a su vez regulan positivamente la expresión de PD-1. En paralelo, las células de melanoma B16 se tratan con IFN- γ para regular positivamente su expresión de PD-L1. Despues, las células se cocultan en presencia de anticuerpo anti-PD-L1, y se evalúa el efecto en la producción de IFN- γ . Se eligieron células B16 para la estimulación terciaria porque expresan de forma endógena niveles bajos de péptido gp100 (a diferencia de la aplicación exógena del péptido). Además, como estas células no expresan PD-L2, B7.1 o B7.2, el efecto de señalización adicional no relacionada con PD-L1 (p. ej., señalización a través de CD28 o CTLA-4 o señalización inducida por PD-L2 a través de PD-1) se minimiza.

35 **Ensayo PMEL:**

30 Como se muestra en la Figura 3, los anticuerpos anti-PD-L1 potencian tanto el porcentaje de células T CD8⁺ PMEL productoras de IFN- γ como los niveles promedio de IFN- γ producidos en respuesta a las cantidades designadas de péptido gp100.

40 **Ensayo *in vitro* de D.011.10:**

45 Un ensayo similar que utiliza células T CD4+ Tg TCR específicas de Ova, muestra proliferación de células T potenciada en presencia del anticuerpo anti-PD-L1 después de la estimulación previa con péptido Ova para inducir la expresión de PD-1 (Figura 4). En la estimulación final, se usaron células B A20 irradiadas que expresan PD-L1 para presentar las concentraciones designadas de péptido Ova a las células T DO.11.10. Notablemente, la contribución del eje PD-1/PD-L1 es más pronunciada a menores grados de estimulación del receptor de antígeno, niveles que reflejan más estrechamente la magnitud de la estimulación fisiológicamente relevante.

50 **Materiales y métodos:**

Ensayo PMEL

Estimulación primaria (día 0-4)

55 Se recogieron ganglios linfáticos de bazo y mesentéricos de ratones receptores de células T transgénicos para PMEL. Los órganos se trituraron en suspensiones de células individuales y sus glóbulos rojos de sometieron a lisis. Se aislaron células T CD8⁺ usando el kit de aislamiento de células T CD8⁺ y separador de células AutoMACS (Miltenyi Biotec) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se aisló el bazo de un ratón del mismo sexo no transgénico y se trituró en una suspensión de células individuales y los glóbulos rojos se sometieron a lisis. Las células se sometieron a pulsos de 0,1 µg/ml de péptido gp100 durante dos horas a 37 °C y se lavaron.

5 Las células se cocultivaron en una placa de fondo plano de 96 pocillos con 200.000 células T CD8⁺ PMEL y 75.000 esplenocitos pulsados con gp100 durante 4 días. El medio de cultivo fue medio de Dulbecco Modificado de Iscove + suero bovino fetal al 10 % + HEPES 20 µM, y diluciones 1:100 de los siguientes complementos de Gibco:Gluta-MAX, piruvato sódico, penicilina/estreptomicina y aminoácidos no esenciales.

10 Estimulación secundaria (día 4-7)

Se centrifugaron cultivos de PMEL y el medio se aspiró usando una pipeta multicanal. Se añadió medio nuevo y se mezcló para lavar las células, seguido de otra centrifugación. Se retiró la mayoría del medio y se añadieron anticuerpos (Herceptin®, YW243.55.S70, o ninguno) para obtener una concentración final de 10 µg/ml. Se establecieron las condiciones en pocillos por duplicado de modo que la producción de IFN-γ promedio podría evaluarse en el punto final.

15 Durante 2 horas, se sometieron a pulsos células DC-1 con péptido gp100 0,1 µg/ml a 37 °C y se lavaron. Se añadieron células DC-1 pulsadas con gp100 a cultivos de PMEL lavados a 40.000 células/pocillo. Se cocultivaron PMEL y DC-1 + anticuerpo durante 3 días.

20 Tercera estimulación (día 7-8)

25 Un día antes de la tercera estimulación el día 6, las células de melanoma B16 se incubaron con 20 ng/ml de IFN-γ de ratón (R&D Systems) durante una noche para regular positivamente su expresión de PD-L1.

30 El día 7, los cultivos de PMEL se centrifugaron y el medio se aspiró usando una pipeta multicanal. Se añadió medio nuevo y se mezcló, seguido de otra centrifugación. La mayoría del medio se retiró y se añadieron anticuerpos para obtener una concentración final de 10 µg/ml.

35 Después de estimulación durante una noche con IFN-γ, las células B16 se lavaron y se dividieron en tres grupos para una incubación de dos horas sin gp100, con gp100 a 1 ng/ml (gp100 bajo) y gp100 a 10 ng/ml (gp100 alto). Las células se lavaron y después se añadieron a los cultivos de PMEL + Ab lavados a 40.000 células por pocillo y se incubaron juntas durante una noche.

40 Tinción intracelular de IFN-γ el día 8

45 Durante las últimas 5 horas de cultivo, se añadió Golgi-Plug (BD Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó tinción intracelular de IFN-γ usando el kit de solución de Permeabilización/Fijación Cytoperm/Cytofix de BD Biosciences siguiendo las instrucciones del fabricante y todos los anticuerpos de tinción fueron también de BD Biosciences. Las células se tiñeron en la superficie con CD8a PE y Thy1.1 FITC y se tiñeron de forma intracelular con IFN-γ APC a concentraciones de saturación.

50 Todas las muestras se procesaron en un Beckman Dickinson FACSCalibur y los datos se analizaron usando software Tree Star, Inc. FLOWJO™.

55 *Ensayo in vitro de D011.10*

60 Se recogieron ganglios linfáticos de bazo y mesentéricos de ratones transgénicos DO11.10, se trituraron en suspensiones de células individuales, y sus glóbulos rojos se sometieron a lisis. Las células se cultivaron durante 72 horas a una densidad de 1 x 10⁶ células por ml en placas de 6 pocillos con péptido Ova a 0,3 µM. El medio de cultivo fue RPMI 1640 + suero bovino fetal 10 % + HEPES 20 µM y diluciones 1:100 de los siguientes complementos de Gibco: Gluta-MAX, piruvato sódico, penicilina/estreptomicina y aminoácidos no esenciales.

65 Después de la estimulación primaria, las células se recogieron y las células T CD4⁺ se purificaron usando un kit de purificación de células T CD4 de ratón siguiendo las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec). Después, las células T CD4⁺ purificadas se dejaron en reposo durante una noche.

70 Al día siguiente, las células se recogieron, se lavaron y se cocultivaron con células A20 irradiadas (10.000 rad). El cocultivo se preparó en placas de fondo en U de 96 pocillos en pocillos por triplicado, con 50.000 células T CD4⁺ a 40.000 células A20 con péptido Ova valorado y anticuerpo a una concentración final de 20 µg/ml. Después de 48 horas, los cultivos se sometieron a pulsos durante una noche con 1 µCi/pocillo de 3H-timidina y se congelaron al día siguiente. Después las placas se descongelaron, se recogieron en un recolector celular y se leyeron en un contador beta.

EJEMPLO 6

Proliferación potenciada de células T CD8+ humanas en una reacción de linfocitos mixtos por Anti-PD-L1

- 5 La Figura 5 demuestra la capacidad de anti-PD-L1 (p. ej., YW243.55.S1) para potenciar la proliferación de células T CD8 humanas en respuesta a células de un donante con MHC incompatible. Las células T CD8+ sensibles se enriquecieron a partir de sangre completa del donante A usando en primer lugar RosetteSep® de células T CD8+ (StemCell Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después, las células se diluyeron en un mismo volumen de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se separaron por centrifugación en gradiente superponiendo en Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). Después de la separación, las células se tiñeron con CD8 APC (BD Biosciences) y se descubrió que el 78 % eran células T CD8+. Las células se marcaron con fluorescencia con colorante indicador CFSE 2,5 µM (Molecular Probes).
- 10 Para actuar como células presentadoras de antígenos (APC) alogénicas, las células mononucleares se aislaron primero de sangre completa del donante B y después se agotaron sus células T CD3+. La sangre se diluyó con un mismo volumen de PBS y las células mononucleares se aislaron después de centrifugación en gradiente sobre Ficoll. Las células se tiñeron con CD3 FITC (BD Biosciences), se lavaron y después se incubaron con microperlas anti-FITC (Miltenyi Biotec). Después se agotaron las células positivas para CD3 FITC en el separador celular AutoMACS (Miltenyi Biotec). Las células se irradiaron después con 2.500 rad en un irradiador de cesio.
- 15 20 Las células se cocultivaron en una placa de fondo plano de 96 pocillos con 150.000 células T CD8+ y 150.000 APC durante 5 días con anticuerpos a 10 µg/ml. El medio de cultivo fue RPMI 1640 + suero bovino fetal 10 % + HEPES 20 µM y diluciones 1:100 de los siguientes complementos de Gibco: Gluta-MAX, piruvato sódico, penicilina/estreptomicina y aminoácidos no esenciales.
- 25 30 El día 5, las células se recogieron, se lavaron y se tiñeron con CD8-biotina seguido de estreptavidina-PerCp (BD Biosciences). Las muestras se procesaron en un Beckman Dickinson FACSCalibur y los datos se analizaron usando software Tree Star, Inc. FlowJo.
- 35 Se observó una potenciación de aproximadamente 45 % de la proliferación de células T CD8 que respondían a células de un donante con MHC incompatible en presencia del anti-PD-L1.

EJEMPLO 7

Efectos del bloqueo de PD-L1 en modelo *in vivo* de LCMV

40 Se ha mostrado que las células T en condiciones de estimulación crónica regulan positivamente y mantienen la expresión del receptor inhibidor PD-1. El ligamiento de PD-1 con uno de sus dos ligandos PD-L1 y PD-L2 contribuye al estado refractario de la célula T activada crónicamente, atenuando su respuesta a su antígeno afín. En ratones infectados de forma persistente con virus de coriomeningitis linfocítica (LCMV), el bloqueo de PD-1 o su ligando PD-L1 es suficiente para revitalizar células T crónicamente refractarias, potenciando la magnitud y la calidad funcional de la respuesta de células T antivíricas. De forma similar, los seres humanos infectados de forma crónica con VIH o VHC muestran células T refractarias a la estimulación cuya actividad puede potenciarse *in vitro* mediante el bloqueo de PD-1 o PD-L1. Por lo tanto, la actividad del bloqueo de PD-L1 en el modelo de LCMV sugiere potencial terapéutico para potenciar inmunidad antivírica y antitumoral.

45 50 Para los experimentos *in vivo* de LCMV en el ratón, se ha reformateado el anticuerpo anti-PD-L1 humanizado (YW243.55S70), clonando las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera derivadas de fagos cadena arriba de dominios constantes de la cadena pesada IgG2a de ratón y la cadena ligera kappa de ratón. Para impedir la citotoxicidad mediada por anticuerpos de células que expresan PD-L1, inhibiendo la unión con el receptor Fcγ, las posiciones 265 (ácido aspártico) y 297 (asparagina) se cambiaron a alanina (DANA). Shields, RL *et al*. J. Biol Chem 2001 276 (9):6591-6604. Para ensayar la capacidad del anticuerpo anti-PD-L1 para potenciar la inmunidad antivírica en una infección crónica, los ratones se infectaron el Día 0 con 2×10^6 unidades formadoras de placas (ufp) del Clon 13 de LCMV o la cepa Armstrong de LCMV como un control de referencia. El esquema del diseño experimental aparece en la Figura 6. La infección con el Clon 13 da como resultado una infección crónica, caracterizada por células T que se expanden pero son incapaces de eliminar eficazmente el virus, mientras que LCMV Armstrong se elimina en un periodo de 8-10 días de infección. El día 14, los ratones comenzaron el tratamiento con anti-PD-L1 o mlgG de control suministrado a dosis de 10 mg/kg 3x/semana. Los días 21 y 28, se realizó análisis de la función de células T CD8 y títulos víricos en sangre y tejidos.

60 65 De forma coherente con los datos publicados de Barber *et al*, Nature 439:682-7 (2006), este ejemplo muestra la capacidad de la Ab anti-PD-L1 para potenciar la respuesta de linfocitos citotóxicos a LCMV después de un régimen de tratamiento de 2 semanas en una infección por LCMV crónica. La Figura 7A muestra el % de células T CD8 que expresan CD107a en su superficie celular en respuesta a péptido específico de LCMV gp33. La expresión de membrana plasmática de CD107a, normalmente expresado de forma intracelular, acompaña al proceso de desgranulación y de este modo actúa como un marcador sustituto para desgranulación. En relación a la respuesta

de células de la infección por LCMV Armstrong aguda, las células de animales infectados con la cepa crónica, clon 13, tienen desgranulación alterada (grupo Ig de control), mientras que el bloqueo PD-L1 fue capaz de restaurar la desgranulación de T CD8+ hasta niveles comparables a los observados en la infección por Armstrong. De forma similar, el 7B demuestra el porcentaje aumentado de células T CD8 productoras de IFN-γ en respuesta a gp33 de LCMV en el grupo tratado con anti-PD-L1 en relación con el Ig de control.

A continuación, se ensayó la influencia del Ab anti-PD-L1 en la reducción o erradicación del virus LCMV en sangre y tejidos. En la Figura 8A, los gráficos muestran títulos de virus logarítmicos en el tejido indicado de animales tratados con Ig de control y PD-L1 el día 21 y 28 después de la infección con LCMV clon 13. El tratamiento con anticuerpos se inició el día 14 después de la infección. El bloqueo de PD-L1 dio como resultado una reducción altamente significativa de títulos víricos en sangre, hígado, cerebro, pulmón y riñón. Resulta impresionante que, en 3 de 5 ratones, Ab α-PD-L1 redujo los títulos LCMV en sangre hasta niveles por debajo de la detección ($<1 \times 10^{-5}$). En un experimento posterior de diseño comparable, se observó la erradicación del virus en sangre e hígado en 5/5 ratones tratados durante 2 semanas con anti-PD-L1 a dosis de 10 mg/kg o 2 mg/kg 3 veces por semana (datos no mostrados). El gráfico inferior muestra la cinética de reducción de títulos víricos en la sangre y demuestra una reducción promedio de 96,8 % en el grupo tratado con anti-PD-L1 el Día 28 en relación con el control. Estos datos apoyan la importancia de la ruta de PD-1/PD-L1 en la inhibición de las respuestas de células T en infecciones crónicas y son coherentes con efectos de bloqueo de PD-L1 *in vitro* en células T obtenidas de seres humanos con infecciones crónicas tales como Hepatitis C y VIH.

Materiales y métodos:

Determinación de % de producción de IFN-gamma por células T CD8 en respuesta a péptido gp33 de LCMV

Se aislaron bazos de ratones infectados y se generó una suspensión de células individuales triturando los órganos en medio completo: IMDM (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) que contenía suero bovino fetal inactivado por calor al 10 %, L-glutamina 2 mM, penicilina/estreptomicina 100 U/ml y 2-mercaptopetanol 10 mM. Los glóbulos rojos se sometieron a lisis usando tampón de lisis ACK (NH_4Cl 0,15 M, KHCO_3 10 mM, EDTA 0,1 mM). Para medir las respuestas de células T CD8 específicas de antígeno, los esplenocitos se lavaron en medio completo y se reestimularon *in vitro* durante 4 horas con el péptido de LCMV GP33 (KAVYN-FATC, ProImmune Inc., Bradenton, FL). Se cultivaron 1×10^6 esplenocitos en placas de fondo plano de 96 pocillos con 100 ng/ml de péptido GP33 en presencia de 100 unidades/ml de interleucina-2 humana (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de brefeldina A y 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ (dilución 1:1.000) de monensina (BD pharmingen) y FITC anti-CD107a (clon ID4B, BD Biosciences, San José, CA). Después de la incubación, las células se lavaron una vez en PBS que contenía suero bovino fetal 2 % y se tiñeron marcadores de superficie celular usando anticuerpos conjugados con fluorocromo: APC anti-CD8 (clon 53.67, BD Biosciences, San José, CA) PerCp-Cy5.5 anti-CD4 (Clon RM4-5, BD Biosciences, San José, CA) y PE anti-PD-1 (clon J43, BD Biosciences, San José, CA). La tinción para IFN-γ intracelular se realizó usando el kit Cytofix Cytoperm Plus (BD Biosciences, San José, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante usando PE-Cy7 anti-IFN-γ (clon XMG1.2, eBioscience Inc. San Diego, CA). Para detectar el número de células T CD8 específicas de GP33, se tiñeron esplenocitos nuevos con pentámeros de GP33 (H2-Db unido a APC, ProImmune Inc., Bradenton, FL) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los datos se recogieron usando un BD FACSAria (BD Biosciences, San José, CA) y se analizaron con el Software FlowJo (Tree Star Inc. Ashland OR).

Determinación de los títulos víricos de LCMV:

Se infectan células de fibrosarcoma MC57 con diluciones en serie décimas de sangre que contiene LCMV u homogeneizado tisular en IMDM completo. La reacción se incuba después durante 2-6 horas a 37 °C en un incubador de cultivo tisular, después se superponen con DMEM que contiene metilcelulosa 1 %. Esto se sigue de incubación durante 3-5 días, después la capa de metilcelulosa se retira por aspiración. Las células se fijan con PBS/paraformaldehído 4 %, después se permeabilizan con Triton-x 0,5 % durante 20 minutos, se lavan en PBS, después se bloquean en FCS 10 % durante 1 hora con agitación suave. Se realiza tinción para LCMV con anticuerpo VL4 (1 hora), se lava 2x, después se desarrolla con HRP anti rata (1:400) en tampón de bloqueo. Esto se sigue de lavado 3x, después adición de sustrato de o-fenilendiamina (SIGMA P8806-50TAB 3 mg/comprimido) a pocillos para su desarrollo.

EJEMPLO 8

Bloqueo de PD-L1 en cáncer

Resultará evidente que muchos tumores aprovechan la expresión de ligandos de PD-1 como medio de atenuar las respuestas de células T antitumorales. Se han caracterizado varios cánceres humanos que expresan niveles elevados de PD-L1 tanto en tumores como en leucocitos que se infiltran en tumores y esta expresión de PD-L1 elevada se asocia con frecuencia con un peor pronóstico. Los modelos tumorales de ratón demuestran aumentos similares en la expresión de PD-L1 dentro de tumores y demuestran un papel para la ruta de PD-1/PD-L1 en la inhibición de la inmunidad tumoral.

Los inventores presentan aquí un experimento que demuestra la influencia del bloqueo de PD-L1 en el crecimiento tumoral ortotópico de células de carcinoma colorrectal murino MC38.Ova en ratones C57B6 singénicos (Figura 9A). Estas células expresan ovoalbúmina mediante transducción retrovírica y expresan PD-L1, pero no PD-L2 en la superficie de sus células como se evalúa por citometría de flujo (histograma-Figura 10A). Se inocularon en los ratones por vía subcutánea 0,5 millones de células MC38.Ova el Día 0. El Día 1 o el Día 14 se trataron ratones (cuando los tumores habían alcanzado un tamaño promedio de 250 mm³) 10 ratones/grupo con 10 mg/kg de anti PD-L1 (YW243.55S70-IgG2a de ratón-DANA), Ig de control, o Ab anti CTLA4 de bloqueo, (UC10-4F10-11) 3x/semana durante el transcurso del estudio. El bloqueo de PD-L1 bien pronto o bien tarde en la intervención es altamente eficaz como una terapia de un único agente en la prevención del crecimiento tumoral. Por el contrario, el bloqueo de CTLA4, otra molécula inhibidora expresada en células T, no mostró ninguna prueba de inhibición del crecimiento tumoral. Estos resultados demuestran el papel único del eje de PD-1/PD-L1 sobre CTLA4/B7 en la supresión de la respuesta inmunitaria antitumoral y apoyan el potencial del tratamiento de cánceres humanos con anticuerpos que bloquean la interacción de PD-L1 con PD-1 y B7.1.

Modelo tumoral singénico MC38.Ova: métodos. El Día 0, se inocularon en 70 animales por vía subcutánea 0,5 millones de células MC38.Ova en 100 microlitros de HBSS+matrigel. Comenzando el D1, se reclutaron 20 ratones en uno de dos grupos de tratamiento (véase posteriormente: grupo 1 o grupo 2). Se permitió que los 40 ratones restantes desarrollaran tumores hasta el Día 14. De estos 40, 30 ratones con tumores de tamaño similares se reclutaron en uno de 3 grupos de tratamiento (Grupos 3-5). Los tumores se midieron y los ratones se pesaron 2x/semana. Los ratones no reclutados en grupos de tratamiento posteriores, debido a volumen tumoral diferente, se sacrificaron:

Grupo 1: anticuerpo anti gp120, 10 mg/kg IP, 100 µl, D1, 3x/semana
 Grupo 2: anticuerpo anti PD-L1, 10 mg/kg IP, 100 µl, D1, 3x/semana
 Grupo 3: anticuerpo anti gp120, 10 mg/kg IP, 100 µl, D14, 3x/semana
 Grupo 4: anticuerpo anti PD-L1, 10 mg/kg IP, 100 µl, D14, 3x/semana
 Grupo 5: anticuerpo anti CTLA-4, 10 mg/kg IP, 100 µl, D14, 3x/semana

*** Los Grupos 1 y 2 comenzaron la dosificación el D1; los Grupos 3, 4 y 5 el D14.

EJEMPLO 9

Combinaciones de anti PD-L1 con otros agentes para proporcionar efecto antitumoral o terapia inmunopotenciadora-modelo MC38.Ova

El Día 0, se inocularon 150 animales por vía subcutánea 0,5 millones de células MC38.Ova en 100 microlitros de HBSS+matrigel. Se permitió que los ratones desarrollaran tumores. Los ratones se pesan y se miden 2x/semana hasta el Día 11 (cuando el volumen tumoral es de entre 100 y 200 mm³). El Día 11, después de la medición del tumor, los ratones se reclutan en 1 de los 12 grupos de tratamiento posteriores. Los ratones no reclutados en los grupos de tratamiento posteriores, debido a volumen tumoral diferente se sacrifican. El tratamiento con gencitabina (Grupo 4) comienza el día 12, mientras que el tratamiento para los grupos de anticuerpos restantes comienza el día 14. Todos los volúmenes son de 100 µl en vehículo inerte, con detalles adicionales como se indica a continuación:

Grupo 1: anticuerpo anti gp120, 10 mg/kg IP, 100 µl, 3x/semana x 5, n = 10
 Grupo 2: anticuerpo anti PD-L1, 10 mg/kg IP, 100 µl, 3x/semana x 5, n = 10
 Grupo 3: anticuerpo anti VEGF, 5 mg/kg IP, 100 µl, 2x/semana x 5, n = 10
 Grupo 4: gencitabina, 40 mg/kg IP, 100 µl, Día 12, 16, 20, n = 10
 Grupo 5: anticuerpo anti PD-L1 + anticuerpo anti gp120, n = 10
 Grupo 6: anticuerpo anti PD-L1 + anticuerpo anti VEGF, n = 10
 Grupo 7: anticuerpo anti PD-L1 + Gencitabina, n = 10
 Grupo 8: anticuerpo anti gp120 + Gencitabina, n = 10
 Grupo 9: anticuerpo anti gp120 + anti VEGF, n = 10
 Día 12: se tomaron muestras sanguíneas de ratones del grupo 1 (100 microlitros) de forma retro orbital con anestesia para análisis de CBC.
 Día 14 y Día 22: se tomaron muestras sanguíneas de ratones del grupo 4 (100 microlitros) de forma retro orbital con anestesia para análisis de CBC.
 Día 19: se tomaron muestras sanguíneas de todos los ratones, excepto el grupo 4 (100 microlitros) de forma retro orbital con anestesia para análisis de CBC.
 Día 26: se tomaron muestras sanguíneas de todos los ratones, excepto el grupo 4 (100 microlitros) de forma retro orbital con anestesia para análisis de PK.

Los tumores se miden y los ratones se pesan 2X/semana. Los animales que muestren pérdida de peso de > 15 % se pesarán diariamente y se sacrificarán si pierden > 20 % del peso corporal. Los ratones se sacrificarán cuando los volúmenes tumorales excedan 3.000 mm³, o después de 3 meses si no se forman tumores.

Este estudio muestra (Figura 10) que el bloqueo de PD-L1 fue más eficaz que α-VEGF y un régimen inductivo de gemcitabina solamente.

EJEMPLO 10

- 5 Expresión de anticuerpo anti PD-L1 en células de mamífero
- Este ejemplo ilustra la preparación de formas potencialmente glucosiladas de anticuerpo anti PD-L1 por expresión recombinante en células de mamíferos.
- 10 El vector, pRK5 (véase documento EP 307.247, publicado el 15 de marzo de 1989), se emplea como el vector de expresión. Opcionalmente, el ADN que codifica la cadena ligera y/o pesada del anticuerpo se liga en pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción de dicho ADN usando métodos de ligamiento tales como los descritos en Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente.
- 15 En una realización, las células hospedadoras seleccionadas pueden ser células 293. Se cultivan células 293 humanas (ATCC CCL 1573) hasta su confluencia en placas de cultivo tisular en medio tal como DMEM complementado con suero de ternero fetal y opcionalmente, componentes nutrientes y/o antibióticos. Se mezclan aproximadamente 10 µg de ADN que codifica el anticuerpo de pRK5 con aproximadamente 1 µg de ADN que codifica el gen de ARN de VA [Thimmappaya *et al.*, Cell, 31: 543 (1982)] y se disuelve en 500 µl de Tris-HCl 1 mM, EDTA 0,1 mM, CaCl₂ 0,227 M. A esta mezcla se añade, en gotas, 500 µl de HEPES 50 mM (pH 7,35), NaCl 280 mM, NaPO₄ 1,5 mM y se permite que se forme un precipitado durante 10 minutos a 25 °C. El precipitado se suspende y se añade a las células 293 y se permite que repose durante aproximadamente cuatro horas a 37 °C. El medio de cultivo se retira por aspiración y se añaden 2 ml de glicerol 20 % en PBS durante 30 segundos. Las células 293 se retiran después con medio sin suero, se añade medio nuevo y las células se incuban durante aproximadamente 5 días.
- 20 Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, el medio de cultivo se retira y se reemplaza con medio de cultivo (solo) o medio de cultivo que contiene ³⁵S-cisteína 200 µCi/ml y ³⁵S-metionina 200 µCi/ml. Después de una incubación de 12 horas, se recoge el medio acondicionado, se concentra en un filtro de centrífuga, y se carga en un gel de SDS 15 %. El gel procesado puede secarse y exponerse a película durante un periodo de tiempo seleccionado para revelar la presencia del anticuerpo. Los cultivos que contienen células transfectadas pueden experimentar incubación adicional (en medio sin suero) y el medio se ensaya en bioensayos seleccionados.
- 25 Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, el medio de cultivo se retira y se reemplaza con medio de cultivo (solo) o medio de cultivo que contiene ³⁵S-cisteína 200 µCi/ml y ³⁵S-metionina 200 µCi/ml. Después de una incubación de 12 horas, se recoge el medio acondicionado, se concentra en un filtro de centrífuga, y se carga en un gel de SDS 15 %. El gel procesado puede secarse y exponerse a película durante un periodo de tiempo seleccionado para revelar la presencia del anticuerpo. Los cultivos que contienen células transfectadas pueden experimentar incubación adicional (en medio sin suero) y el medio se ensaya en bioensayos seleccionados.
- 30 En una técnica alternativa, el anticuerpo puede introducirse en células 293 que usan de forma transitoria el método de dextrán sulfato descrito en Somparyrac *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 78: 7575 (1981). En un matraz de agitación se cultivan células 293 hasta la máxima densidad y se añaden 700 µg de ADN que codifica el anticuerpo de pRK5. Las células se concentran en primer lugar a partir del matraz agitador por centrifugación y se lavan con PBS. El precipitado de ADN-dextrano se incuba en el sedimento celular durante cuatro horas. Las células se tratan con glicerol 20 % durante 90 segundos, se lavan con medio de cultivo tisular y se vuelven a introducir en el matraz de agitación que contiene medio de cultivo tisular, insulina bovina 5 µg/ml y transferrina bovina 0,1 µg/ml. Después de aproximadamente cuatro días, el medio acondicionado se centrifuga y se filtra para retirar células y residuos. La muestra que contiene el anticuerpo expresado puede después concentrarse y purificarse por cualquier método seleccionado, tal como diáfiltración y/o cromatografía en columna.
- 35 En otra realización, el anticuerpo puede expresarse en células CHO. El ADN que codifica el anticuerpo ligado en pRK5 puede transfectarse a células CHO usando reactivos conocidos tales como CaPO₄ o DEAE-dextrano. Como se ha descrito anteriormente, los cultivos celulares pueden incubarse, y el medio reemplazarse con medio de cultivo (solo) o medio que contiene un radiomarcador tal como ³⁵S-metionina. Después de determinar la presencia del anticuerpo, el medio de cultivo puede reemplazarse con medio sin suero. Preferentemente, los cultivos se incuban durante aproximadamente 6 días, y después se recoge el medio acondicionado. El medio que contiene el anticuerpo expresado puede después concentrarse y purificarse por cualquier método seleccionado.
- 40 También pueden expresarse variantes marcadas con epítopos del anticuerpo en células CHO del hospedador. El ADN que codifica el anticuerpo ligado en pRK5 puede subclonarse fuera del vector pRK5. El inserto del subclón puede experimentar PCR para fusionarse en fase con un marcador epítópico seleccionado tal como un marcador de poli-his en un vector de expresión de Baculovirus. El ADN marcado con poli his que codifica el inserto de anticuerpo puede después subclonarse en un vector conducido por SV40 que contiene un marcador de selección tal como DHFR para selección de clones estables. Finalmente, las células CHO pueden transfectarse (como se ha descrito anteriormente) con el vector conducido por SV40. Puede realizarse marcaje, como se ha descrito anteriormente, para verificar la expresión. El medio de cultivo que contiene el anticuerpo marcado con poli His expresado puede después concentrarse y purificarse por cualquier método seleccionado, tal como por cromatografía de afinidad de Ni²⁺- quelado.
- 45 El anticuerpo también puede expresarse en células CHO y/o COS por un procedimiento de expresión transitoria o en células CHO por otro procedimiento de expresión estable.

La expresión estable en células CHO se realiza usando el siguiente procedimiento. Las proteínas se expresan como una construcción de IgG (inmunoadhesina), en la que las secuencias codificantes para las formas solubles (por ejemplo dominios extracelulares) de las proteínas respectivas se fusionan con una secuencia de región constante de IgG1 que contiene los dominios bisagra, CH2 y CH2 y/o es una forma marcada con poli His.

- 5 Despues de amplificación por PCR, los ADN respectivos se subclonan en un vector de expresión de CHO usando técnicas convencionales como se describe en Ausubel *et al.*, Current Protocols of Molecular Biology, Unidad 3.16, John Wiley and Sons (1997). Se construyen vectores de expresión de CHO para que tengan sitios de restricción compatibles 5' y 3' del ADN de interés para permitir la reordenación conveniente de ADNc. El vector usado en expresión de células CHO es como se describe en Lucas *et al.*, Nucl. Acids Res. 24: 9 (1774-1779 (1996)) y usa el promotor/potenciador temprano de SV40 para conducir la expresión del ADNc de interés y dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de DHFR permite la selección para mantenimiento estable del plásmido después de la transfección.
- 10 Se introducen doce microgramos del ADN plasmídico deseado en aproximadamente 10 millones de células CHO usando reactivos de transfección disponibles en el mercado SUPERFECT® (Qiagen), DOSPER® o FUGENE® (Boehringer Mannheim). Las células se cultivan como se describe en Lucas *et al.*, mencionado anteriormente. Se congelan aproximadamente 3×10^7 células en una ampolla para crecimiento y producción adicional como se describe posteriormente.
- 15 Se introducen doce microgramos del ADN plasmídico deseado en aproximadamente 10 millones de células CHO usando reactivos de transfección disponibles en el mercado SUPERFECT® (Qiagen), DOSPER® o FUGENE® (Boehringer Mannheim). Las células se cultivan como se describe en Lucas *et al.*, mencionado anteriormente. Se congelan aproximadamente 3×10^7 células en una ampolla para crecimiento y producción adicional como se describe posteriormente.
- 20 Las ampollas que contienen el ADN plasmídico se descongelan por colocación en un baño de agua y se mezclan por agitación vortical. Los contenidos se pipetean en un tubo de centrifuga que contiene 10 ml de medio y se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se aspira y las células se resuspenden en 10 ml de medio selectivo (PS20 filtrado en 0,2 Φ m con 5 % de suero bovino fetal diafiltrado 0,2 Φ m). Las células se separan después en alícuotas en un agitador de 100 ml que contiene 90 ml de medio selectivo. Despues de 1-2 días, las células se transfieren a un agitador de 250 ml cargado con 150 ml de medio de cultivo selectivo y se incuban a 37 °C. Despues de otros 2-3 días, se siembran centrífugas de 250 ml, 500 ml y 2000 ml con 3×10^5 células/ml. El medio celular se intercambia con medio nuevo por centrifugación y resuspensión en medio de producción. Aunque puede emplearse cualquier medio de CHO adecuado, puede usarse de hecho un medio de producción descrito en la Patente de Estados Unidos n.º 5.122.469, expedida el 16 de junio de 1992. Se siembra un centrifugador de producción de 3 l a $1,2 \times 10^6$ células/ml. El día 0, se determina el número de células y pH. El día 1, se toman muestras del centrifugador y se inicia el rociado con aire filtrado. El día 2, se toma muestra de centrifugador, la temperatura se desplaza hasta 33 °C, y se toman 30 ml de glucosa 500 g/l y 0,6 ml de antiespumante 10 % (por ejemplo, emulsión de polidimetilsiloxano al 35 %, emulsión de uso médico Dow Corning 365). A lo largo de la producción, el pH se ajusta según sea necesario para mantenerlo a aproximadamente 7,2. Despues de 10 días, o hasta que la viabilidad descendió por debajo del 70 %, el cultivo celular se recogió por centrifugación y se filtró a través de un filtro de 0,22 Φ m. El filtrado se almacenó a 4 °C o se cargó inmediatamente en columnas para purificación.
- 25 Para las construcciones marcadas con poli His, las proteínas se purifican usando una columna Ni-NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añade imidazol al medio acondicionado a una concentración de 5 mM. El medio acondicionado se bombea en una columna de Ni-NTA de 6 ml equilibrada a 4 °C, en tampón Hepes 20 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 0,3 M e imidazol 5 mM a un caudal de 4-5 ml/min. Despues de la carga, la columna se lava con tampón de equilibrado adicional y la proteína se eluye con tampón de equilibrado que contiene imidazol 0,25 M. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en un tampón de almacenamiento que contiene Hepes 10 mM, NaCl 0,14 M y manitol 4 %, pH 6,8, con una columna Superfina G25 de 25 ml (Pharmacia) y se almacena a -80 °C.
- 30 Se purifican construcciones de inmunoadhesina (que contienen Fc) a partir del medio acondicionado de la siguiente manera. El medio acondicionado se bombea a una columna de Proteína A de 5 ml (Pharmacia) que se había equilibrado en tampón de fosfato Na 20 mM, pH 6,8. Despues de cargar, la columna se lava exhaustivamente con tampón de equilibrado antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluida se neutraliza inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 Φ l de tampón de Tris 1 M, pH 9. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en tampón de almacenamiento como se ha descrito anteriormente para las proteínas marcadas con poli His. La homogeneidad se evalúa mediante geles de poliacrilamida SDS y mediante secuenciación de aminoácidos aminoterminales por degradación de Edman.
- 35 Se purifican construcciones de inmunoadhesina (que contienen Fc) a partir del medio acondicionado de la siguiente manera. El medio acondicionado se bombea a una columna de Proteína A de 5 ml (Pharmacia) que se había equilibrado en tampón de fosfato Na 20 mM, pH 6,8. Despues de cargar, la columna se lava exhaustivamente con tampón de equilibrado antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluida se neutraliza inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 Φ l de tampón de Tris 1 M, pH 9. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en tampón de almacenamiento como se ha descrito anteriormente para las proteínas marcadas con poli His. La homogeneidad se evalúa mediante geles de poliacrilamida SDS y mediante secuenciación de aminoácidos aminoterminales por degradación de Edman.
- 40 Se purifican construcciones de inmunoadhesina (que contienen Fc) a partir del medio acondicionado de la siguiente manera. El medio acondicionado se bombea a una columna de Proteína A de 5 ml (Pharmacia) que se había equilibrado en tampón de fosfato Na 20 mM, pH 6,8. Despues de cargar, la columna se lava exhaustivamente con tampón de equilibrado antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluida se neutraliza inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 Φ l de tampón de Tris 1 M, pH 9. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en tampón de almacenamiento como se ha descrito anteriormente para las proteínas marcadas con poli His. La homogeneidad se evalúa mediante geles de poliacrilamida SDS y mediante secuenciación de aminoácidos aminoterminales por degradación de Edman.
- 45 Se purifican construcciones de inmunoadhesina (que contienen Fc) a partir del medio acondicionado de la siguiente manera. El medio acondicionado se bombea a una columna de Proteína A de 5 ml (Pharmacia) que se había equilibrado en tampón de fosfato Na 20 mM, pH 6,8. Despues de cargar, la columna se lava exhaustivamente con tampón de equilibrado antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluida se neutraliza inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 Φ l de tampón de Tris 1 M, pH 9. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en tampón de almacenamiento como se ha descrito anteriormente para las proteínas marcadas con poli His. La homogeneidad se evalúa mediante geles de poliacrilamida SDS y mediante secuenciación de aminoácidos aminoterminales por degradación de Edman.
- 50 Se purifican construcciones de inmunoadhesina (que contienen Fc) a partir del medio acondicionado de la siguiente manera. El medio acondicionado se bombea a una columna de Proteína A de 5 ml (Pharmacia) que se había equilibrado en tampón de fosfato Na 20 mM, pH 6,8. Despues de cargar, la columna se lava exhaustivamente con tampón de equilibrado antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluida se neutraliza inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 Φ l de tampón de Tris 1 M, pH 9. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en tampón de almacenamiento como se ha descrito anteriormente para las proteínas marcadas con poli His. La homogeneidad se evalúa mediante geles de poliacrilamida SDS y mediante secuenciación de aminoácidos aminoterminales por degradación de Edman.
- 55 Se purifican construcciones de inmunoadhesina (que contienen Fc) a partir del medio acondicionado de la siguiente manera. El medio acondicionado se bombea a una columna de Proteína A de 5 ml (Pharmacia) que se había equilibrado en tampón de fosfato Na 20 mM, pH 6,8. Despues de cargar, la columna se lava exhaustivamente con tampón de equilibrado antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluida se neutraliza inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 Φ l de tampón de Tris 1 M, pH 9. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en tampón de almacenamiento como se ha descrito anteriormente para las proteínas marcadas con poli His. La homogeneidad se evalúa mediante geles de poliacrilamida SDS y mediante secuenciación de aminoácidos aminoterminales por degradación de Edman.
- 60 Expresión del anticuerpo anti PD-L1 en *E. coli*

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma no glucosilada del anticuerpo anti PD-L1 por expresión recombinante en *E. coli*.

- 65 La secuencia de ADN que codifica el anticuerpo anti PD-L1 se amplifica inicialmente usando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores deberían contener sitios de restricción que corresponden a los sitios de

- enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado. Pueden emplearse una diversidad de vectores de expresión. Un ejemplo de un vector adecuado es pBR322 (derivado de *E. coli*, véase Bolívar *et al.*, Gene, 2: 95 (1977)) que contiene genes para resistencia a ampicilina y tetraciclina. El vector se digiere con enzima de restricción y se desfosforila. Las secuencias amplificadas por PCR se ligan después en el vector. El vector incluirá preferentemente secuencias que codifican un gen de resistencia a antibióticos, un promotor trp, un líder de poli his (que incluye los seis primeros codones de STII, secuencia de poli his y sitio de escisión de enteroquinasa), la región codificante de NPOR, terminador de la transcripción lambda y un gen de argU.
- La mezcla de ligamiento se usa después para transformar una cepa de *E. coli* seleccionada usando los métodos descritos en Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente. Los transformantes se identifican por su capacidad para crecer en placas LB y después se seleccionan colonias resistentes a antibióticos. El ADN plasmídico puede aislarse y confirmarse por análisis de restricción y secuenciación de ADN.
- Los clones seleccionados pueden cultivarse durante una noche en medio de cultivo líquido tal como caldo de cultivo LB complementado con antibióticos. El cultivo de una noche puede posteriormente usarse para inocular un cultivo a mayor escala. Las células se cultivan después hasta una densidad óptica deseada, durante lo cual se activa el promotor de expresión.
- Después de cultivar las células durante varias horas más, las células pueden recogerse por centrifugación. El sedimento celular obtenido por la centrifugación puede solubilizarse usando diversos agentes conocidos en la técnica, y el anticuerpo solubilizado puede después purificarse usando una columna quelante metálica en condiciones que permiten la unión estrecha del anticuerpo.
- También puede expresarse anticuerpo anti PD-L1 en *E. coli* en una forma marcada con poli His, usando el siguiente procedimiento. El ADN que codifica el anticuerpo se amplifica inicialmente usando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores contienen sitios de enzimas de restricción que corresponden a los sitios de enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado, y otras secuencias útiles que posibilitan un inicio de la traducción eficaz y rápido, purificación rápida en una columna de quelación metálica y retirada proteolítica con enterokinasa. Las secuencias marcadas con poli His amplificadas por PCR se ligan después en un vector de expresión, que se usa para transformar un hospedador de *E. coli* basado en la cepa 52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(laclq)). Los transformantes se cultivan en primer lugar en LB que contiene barbenicilina 50 mg/ml a 30 °C con agitación hasta que se alcanza una D.O.600 de 3-5. Los cultivos se diluyen después 50-100 veces en medio CRAP (preparado mezclando 3,57 g de (NH₄)₂SO₄, 0,71 g de citrato sódico A2H2O, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levadura Difco, 5,36 g de hicasa SF de Sheffield en 500 ml de agua, así como MPOS 110 mM, pH 7,3, glucosa 0,55 % (p/v) y MgSO₄ 7 mM) y se cultivan durante aproximadamente 20-30 horas a 30 °C con agitación. Las muestras se retiran para verificar la expresión por análisis de SDS-PAGE, y el cultivo a granel se centrifuga para sedimentar las células. Los sedimentos celulares se congelan hasta su purificación y replegamiento.
- Se resuspende pasta de *E. coli* de fermentaciones de 0,5 a 1 l (sedimentos de 6-10 g) en 10 volúmenes (p/v) en guanidina 7 M, Tris 20 mM, tampón de pH 8. Se añade sulfito sódico sólido y tetracionato sódico para preparar concentraciones finales de 0,1 M y 0,02 M, respectivamente, y la solución se agita durante una noche a 4 °C. Esta etapa da como resultado una proteína desnaturalizada con todos los restos de cisteína bloqueados por sulfitolización. La solución se centrifuga a 40.000 rpm en una Ultracentrifugadora de Beckman durante 30 min. El sobrenadante se diluye con 3-5 volúmenes de tampón de columna de quelado metálico (guanidina 6 M, Tris 20 mM, pH 7,4) y se filtran a través de filtros de 0,22 micrómetros para clarificar. Dependiendo de la condición, el extracto clarificado se carga en una columna de quelado metálico de Ni-NTA Qiagen de 5 ml equilibrada en el tampón de columna de quelado metálico. La columna se lava con tampón adicional que contiene imidazol 50 mM (Calbiochem, uso en Utrol), pH 7,4. La proteína se eluye con tampón que contiene imidazol 250 mM. Las fracciones que contienen la proteína deseada se agruparon y se almacenaron a 4 °C. La concentración de proteína se estimó por su absorbancia a 280 nm usando el coeficiente de extinción calculado basándose en su secuencia de aminoácidos.
- Las proteínas se repliegan por dilución de muestra lentamente en tampón de replegamiento recién preparado que consiste en: Tris 20 mM, pH 8,6, NaCl 0,3 M, urea 2,5 M, cisteína 5 mM, glicina 20 mM y EDTA 1 mM. Los volúmenes de replegamiento se eligen para que la concentración de proteína final sea de entre 50 y 100 microgramos/ml. La solución de replegamiento se agita suavemente a 4 °C durante 12-36 horas. La reacción de replegamiento se detiene por la adición de TFA hasta una concentración final de 0,4 % (pH de aproximadamente 3). Antes de la purificación adicional de la proteína, la solución se filtra a través de un filtro de 0,22 micrómetros y se añade acetonitrilo a una concentración final de 2-10 %. La proteína replegada se somete a chromatografía en una columna de fase inversa Poros R1/H usando un tampón móvil de TFA 0,1 % con elución con un gradiente de acetonitrilo de 10 a 80 %. Se analizan alícuotas de fracciones con absorbancia A280 en geles de poliacrilamida SDS y se agrupan fracciones que contienen proteína replegada homogénea. En general, la especie replegada apropiadamente de la mayoría de las proteínas se eluye a las concentraciones más bajas de acetonitrilo ya que esas especies son las más compactas con sus interiores hidrófobos protegidos de interacción con la resina de fase inversa. Las especies agregadas se eluyen habitualmente a concentraciones más altas de acetonitrilo. Además de resolver formas plegadas erróneamente de proteínas de la forma deseada, la etapa de fase inversa también retira endotoxina de las muestras.

Las fracciones que contienen los anticuerpos anti PD-L1 plegados deseados se agrupan y se retira el acetonitrilo usando una corriente suave de nitrógeno dirigida a la solución. Las proteínas se formulan en Hepes 20 mM, pH 6,8 con cloruro sódico 0,14 M y manitol 4 % por diálisis o por filtración en gel usando resinas Superfinas G25 (Pharmacia) equilibradas en el tampón de formulación y esterilizadas por filtración.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo de longitud completa anti PD-L1 aislado, bloqueante, que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y una de cadena ligera, en el que:
- (a) la cadena pesada comprende una HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en la que además:
- (i) la secuencia de HVR-H1 es GFTFSX₁SWIH (SEQ ID NO:1)
 - (ii) la secuencia de HVR-H2 es AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG (SEQ ID NO:2);
 - (iii) la secuencia de HVR-H3 es RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 3); y
- (b) la cadena ligera comprende una HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, en la que además:
- (iv) la secuencia de HVR-L1 es RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A (SEQ ID NO:8);
 - (v) la secuencia de HVR-L2 es SASX₉LX₁₀S (SEQ ID NO:9);
 - (vi) la secuencia de HVR-L3 es QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T (SEQ ID NO:10);
- en la que X₁= D, X₂=S y X₃ =T, X₄ = D, X₅ =V, X₆=S, X₇ =A y X₈ =V, X₉= F y X₁₀=Y, X₁₁ =Y, X₁₂= L ,X₁₃= Y, X₁₄ = H y X₁₅ = A, y que además comprende:
- (c) secuencias marco conservadas de cadena pesada de región variable yuxtapuestas entre las HVR de acuerdo con la fórmula: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), y
- (d) secuencias marco conservadas de cadena ligera de región variable yuxtapuestas entre las HVR de acuerdo con la fórmula: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4),
- en el que las secuencias marco conservadas de (c) y (d) derivan de secuencias marco conservadas consenso humanas, en el que la secuencia marco conservada de VH consenso es una secuencia marco conservada consenso del subgrupo III de Kabat y la secuencia marco conservada de VL consenso es una secuencia marco conservada consenso kappa I de Kabat.
2. Una composición que comprende el anticuerpo anti-PD-L1 aislado, bloqueante, de la reivindicación 1 y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Coestimulación de la Familia B7

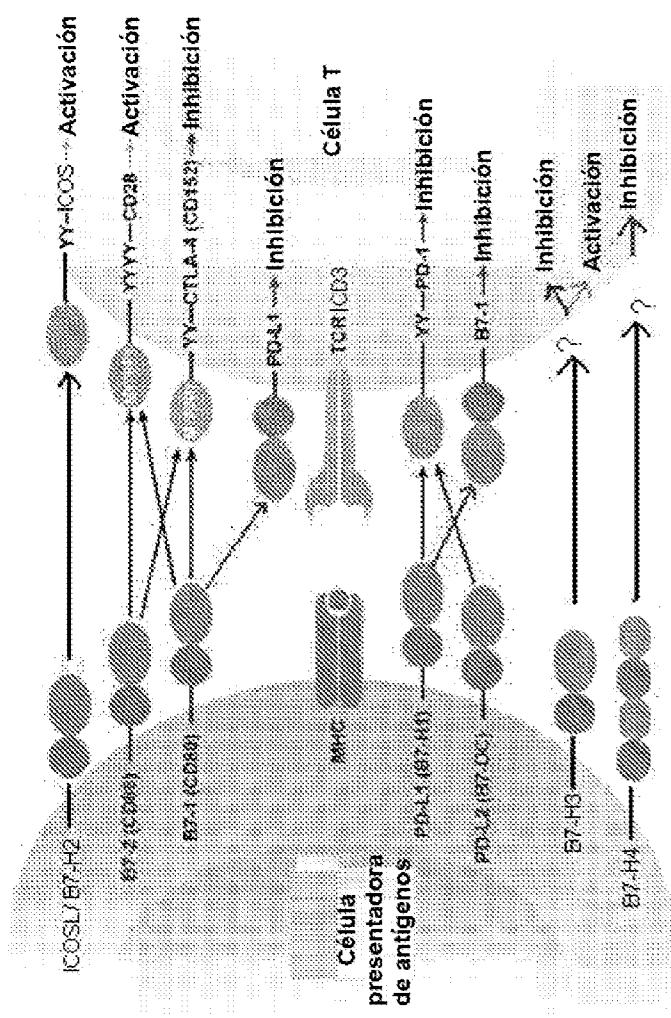


Figura 1

Ensayo *in vitro* de PMEL/B16

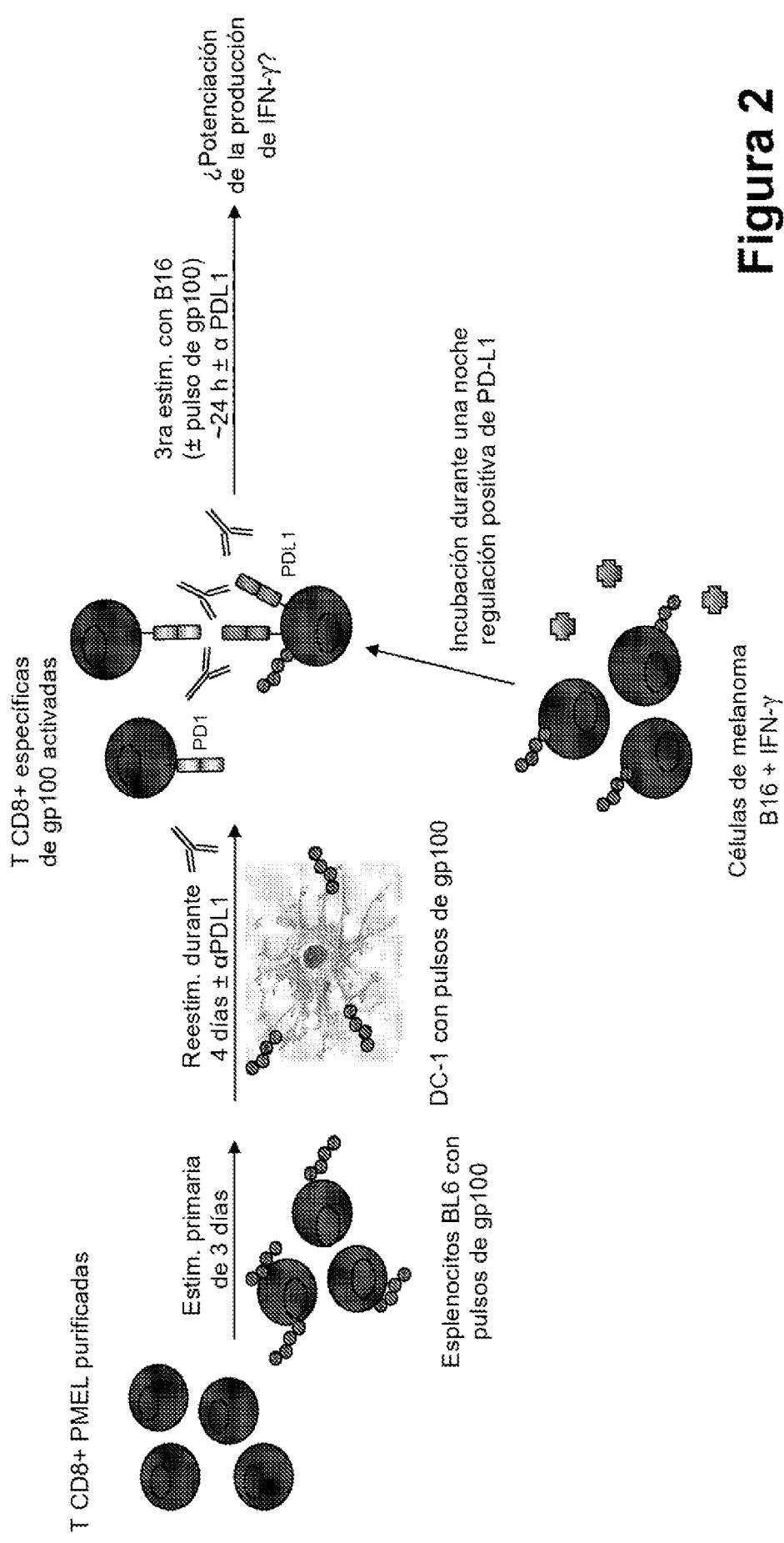


Figura 2

Efecto del anticuerpo Anti-PDL1 sobre la producción de IFN- γ mediante células T CD8+ PMEL

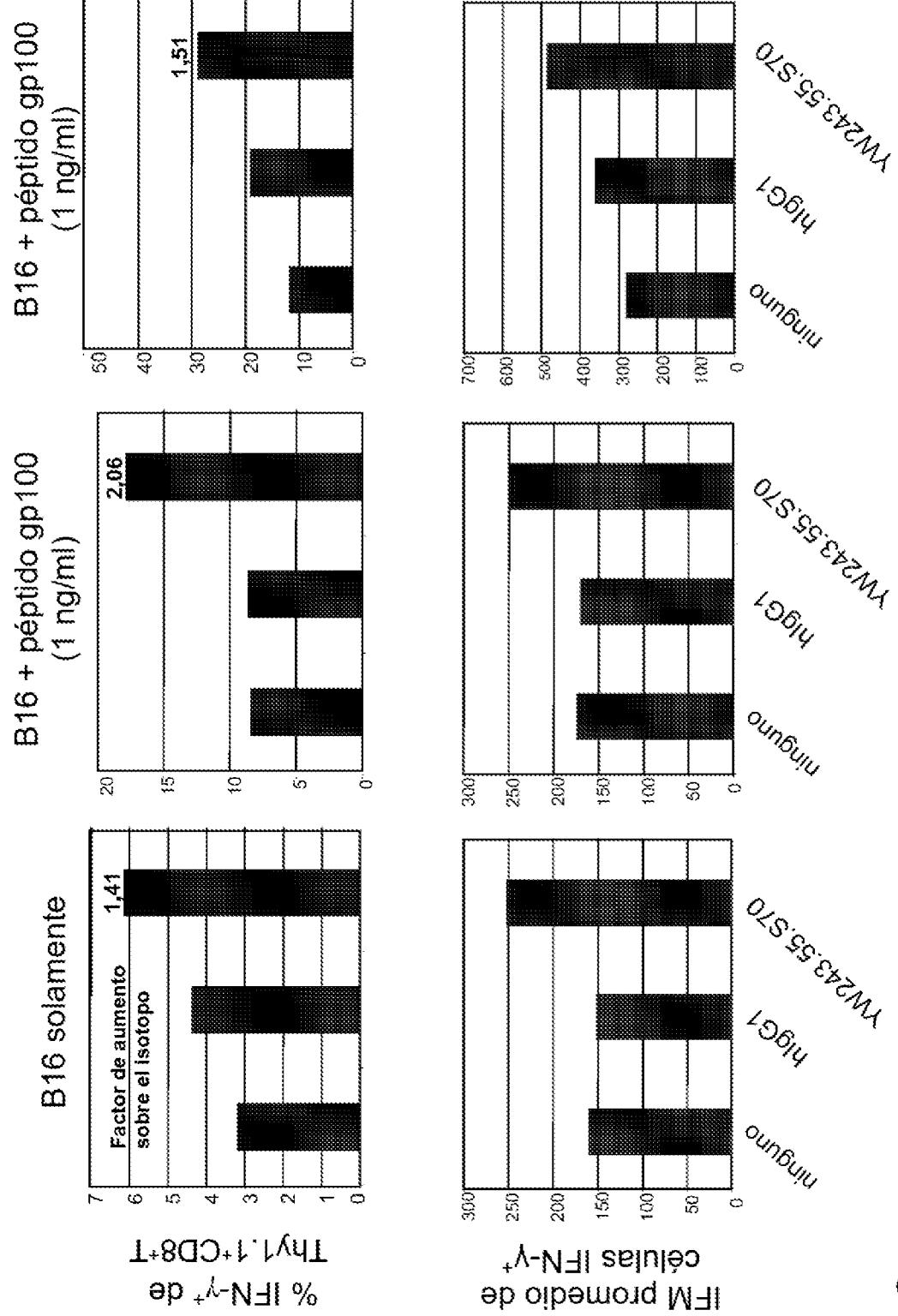


Figura 3

Efecto del anticuerpo anti-PD-L1 sobre la proliferación de células T CD4 sometidas a estimulación secundaria

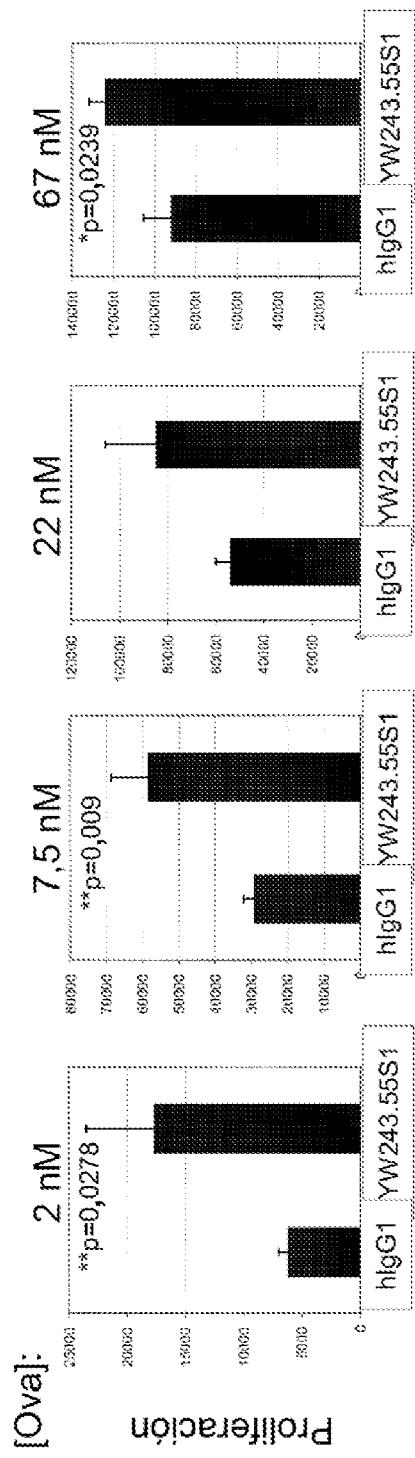


Figura 4

Efecto del anticuerpo anti-PD-L1 sobre la proliferación de células T CD8 humanas en reacción de linfocitos mixta

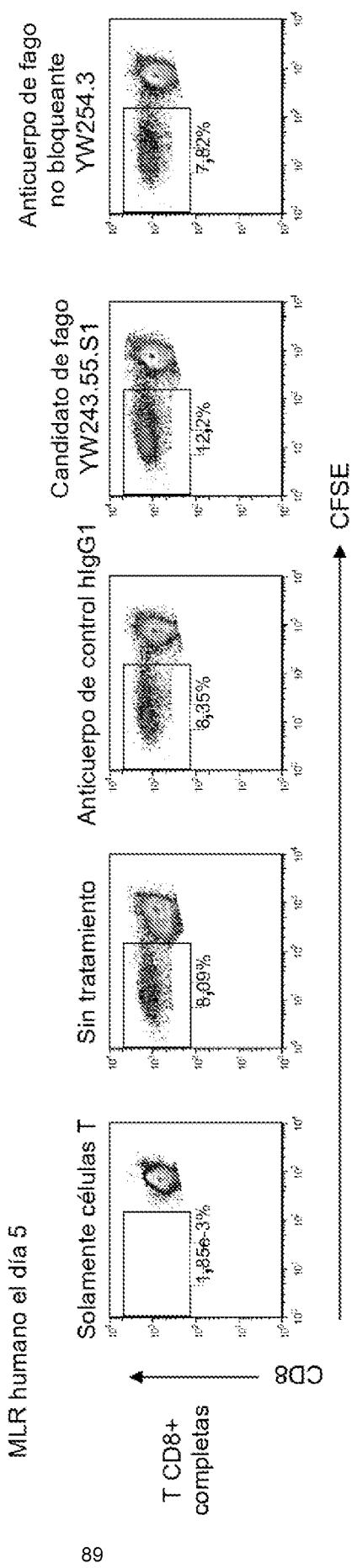


Figura 5

Anti-PDL1 en infección por virus de la Coriomeningitis linfocítica crónica (LCMV) (Clon

Grupos:

- Cepa crónica de LCMV clon 13 (2E6/ratón)
 - 1. Control de IgG1; n= 5 ratones
 - 2. Anti-PD-L1 YM243.55.S70 H/m; n= 5 ratones
- LCMV de cepa aguda Armstrong (2E6/ratón)
- No infectados

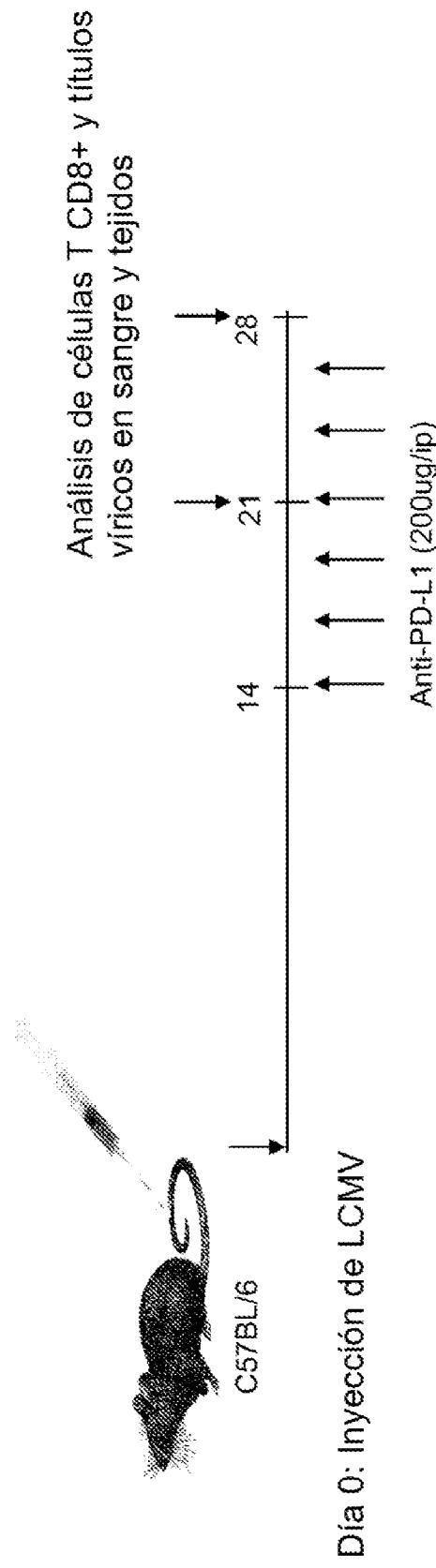


Figura 6

Efecto del anticuerpo anti-PD-L1 sobre la función efectora CD8 en ratones tratados con anti-PD-L1

**CD107a
Día 28**

**Ensayo de IFN γ
Día 28**

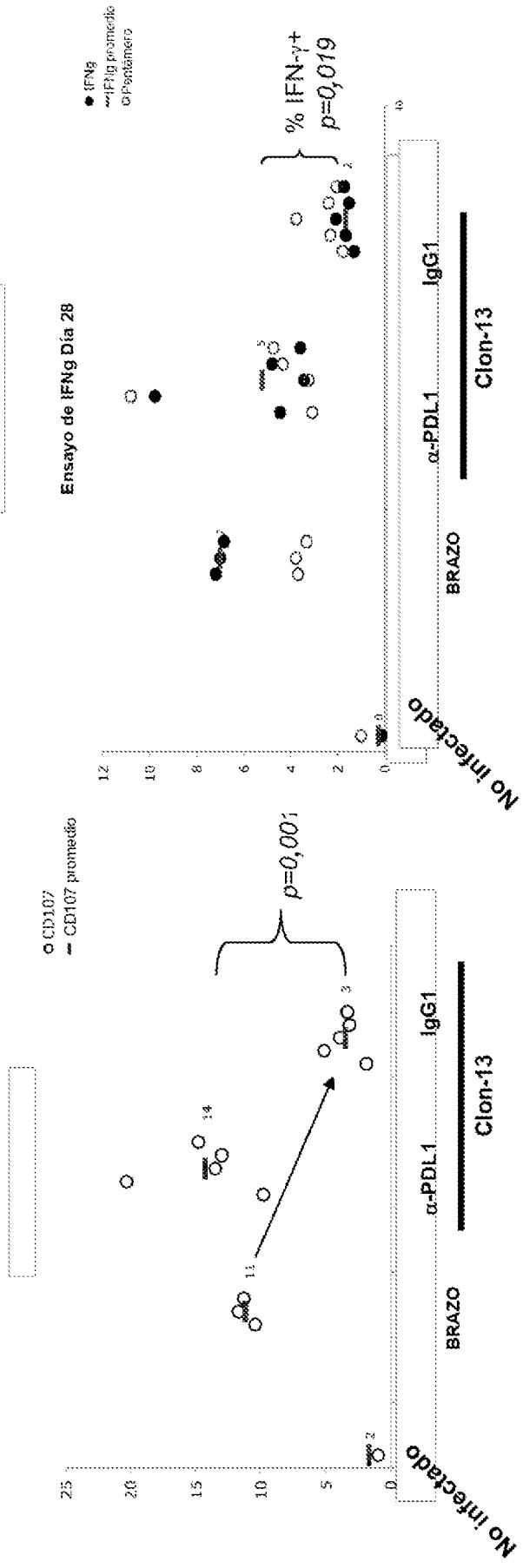


Figura 7A

Figura 7B

Reducción de títulos víricos en suero y tejidos en ratones tratados con a-**PD-L1**

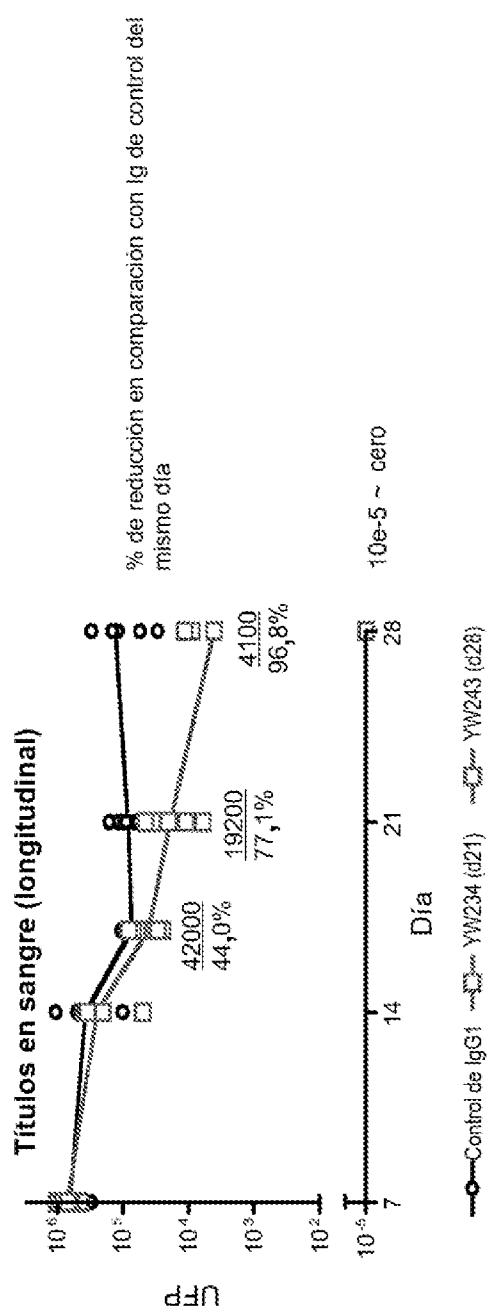
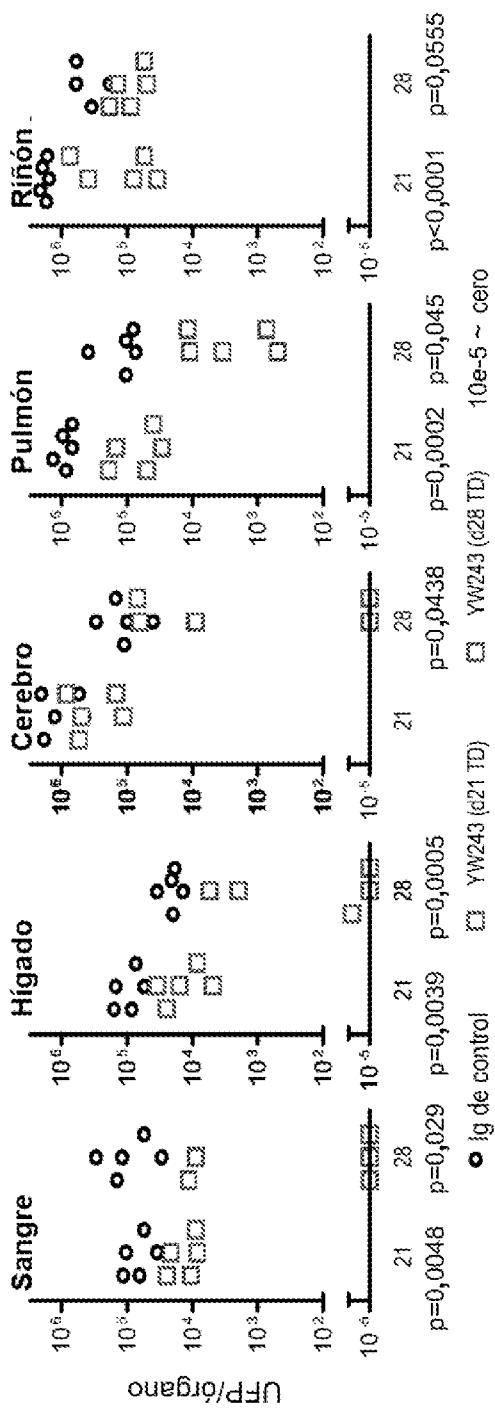


Figura 8

ES 3 019 734 T3

Efecto de intervención tardía con tratamiento anti-PD-L1 en modelo colorectal MC38. Ova

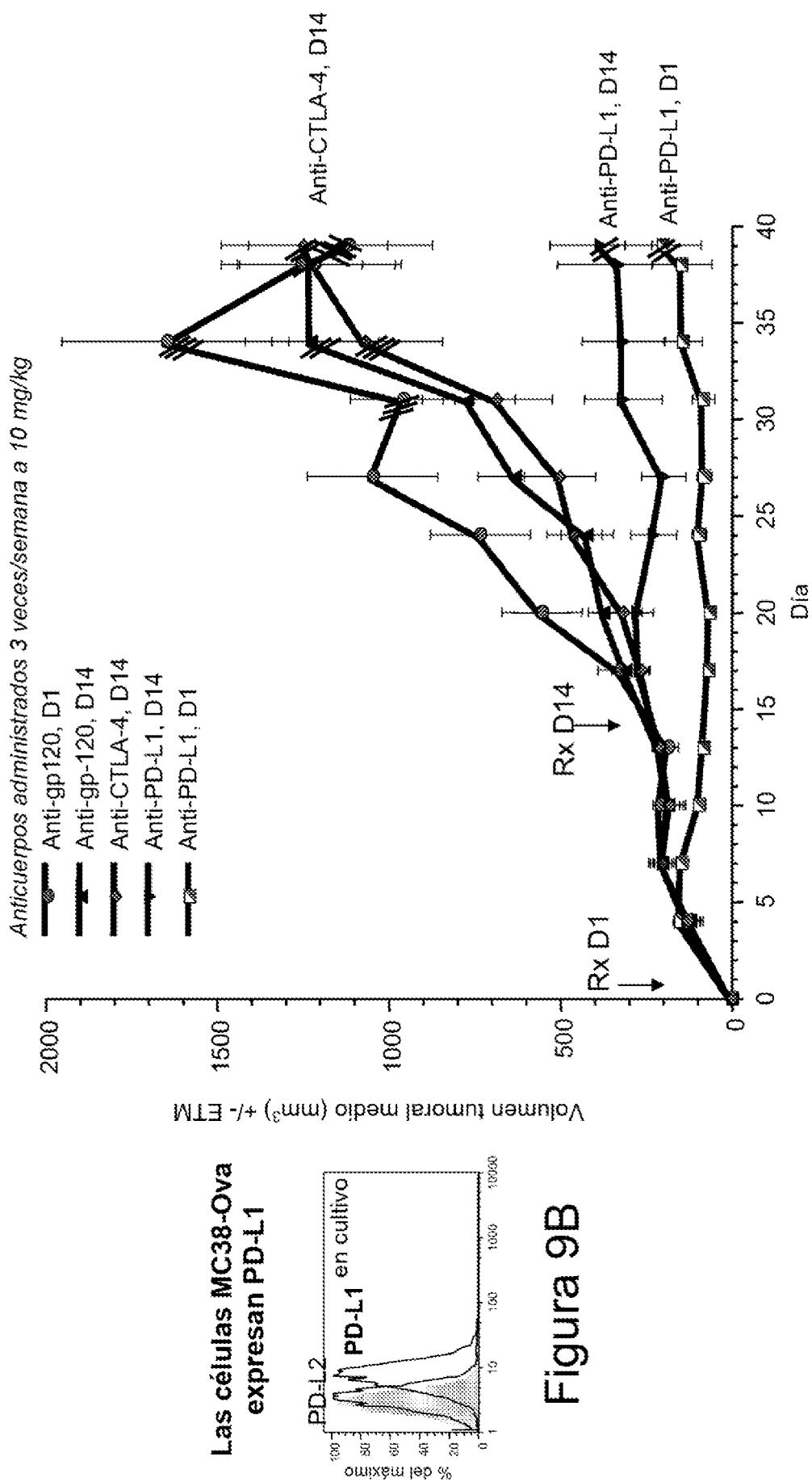
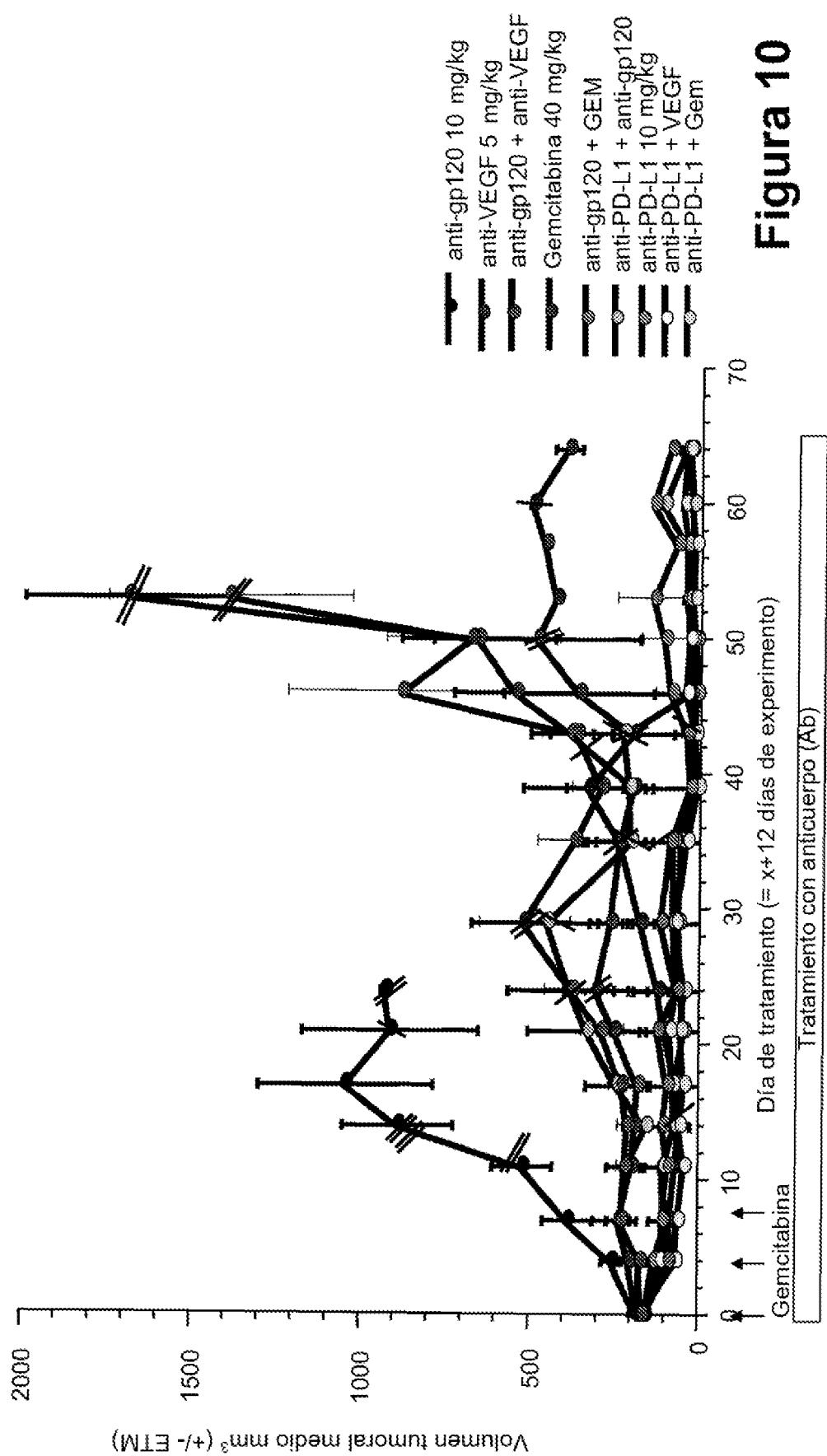


Figura 9B

Efecto de tratamiento de bloqueo de PD-L1 solamente y en combinación con anti-VEGF o Gemcitabina



ES 3 019 734 T3

Figura 11A

ES 3 019 734 T3

FIGURA 11B