

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 379**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 31/282 (2006.01)

A61K 31/513 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2013 PCT/US2013/043452**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13181452**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2013 E 13729174 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 2855528**

54 Título: **Procedimientos de tratamiento del cáncer usando antagonistas de unión al eje de PD-1 y antagonistas de VEGF**

30 Prioridad:

31.05.2012 US 201261653861 P

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

14.02.2020

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**MAECKER, HEATHER y
IRVING, BRYAN**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 742 379 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

Procedimientos de tratamiento del cáncer usando antagonistas de unión al eje de PD-1 y antagonistas de VEGF

5 La provisión de dos señales distintas a los linfocitos T es un modelo ampliamente aceptado para la activación de los linfocitos T en reposo por parte de células presentadoras de antígenos (APC). Lafferty *et al.*, Aust. J. Exp. Biol. Med. ScL 53: 27-42 (1975). Este modelo proporciona además la discriminación entre la tolerancia autoinmunitaria y no autoinmunitaria. Bretscher *et al.*, Science 169: 1042-1049 (1970); Bretscher, P.A., P.N.A.S. USA 96: 185-190 (1999); Jenkins *et al.*, J. Exp. Med. 165: 302-319 (1987). La señal primaria, o señal
10 específica de antígeno, se transduce a través del receptor de linfocitos T (TCR) después del reconocimiento del péptido del xenoantígeno presentado en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). La segunda señal o señal coestimuladora se envía a los linfocitos T a través de moléculas coestimuladoras expresadas en células presentadoras de antígenos (APC), e induce a los linfocitos T a promover la expansión clonal, la secreción de citocinas y la función efectora. Lenschow *et al.*, Ann. Rev. Immunol. 14:233 (1996). En
15 ausencia de coestimulación, los linfocitos T se pueden volver resistentes a la estimulación antigénica, no generan una respuesta inmunitaria eficaz y pueden dar como resultado un agotamiento o tolerancia a xenoantígenos.

En el modelo de dos señales, los linfocitos T reciben señales coestimuladoras secundarias positivas y negativas.
20 La regulación de dichas señales positivas y negativas es fundamental para maximizar las respuestas inmunitarias protectoras del huésped, mientras se mantiene la tolerancia inmunológica y se previene la autoinmunidad. Las señales secundarias negativas parecen necesarias para la inducción de la tolerancia de linfocitos T, mientras que las señales positivas promueven la activación de linfocitos T. Si bien el modelo simple de dos señales aún proporciona una explicación válida para los linfocitos indiferenciados, la respuesta
25 inmunitaria de un huésped es un proceso dinámico, y también se pueden proporcionar señales coestimuladoras a linfocitos T expuestos al antígeno. El mecanismo de coestimulación es de interés terapéutico porque la manipulación de las señales coestimuladoras ha demostrado proporcionar un medio para potenciar o terminar la respuesta inmunitaria basada en células. Recientemente se ha descubierto que la disfunción de los linfocitos T o anergia se produce simultáneamente con una expresión inducida y sostenida del receptor inhibitorio, el
30 polipéptido de muerte programada 1 (PD-1). Como resultado, las dianas terapéuticas de PD-1 y otras moléculas que envían señales a través de interacciones con PD-1, tales como el ligando de muerte programada 1 (PD-L1) y el ligando de muerte programada 2 (PD-L2), son un área de gran interés. Topalian (Current Op. Immun 2012, 24:207) revisa el papel de PD-1 y sus ligandos en el mantenimiento de un microentorno de tumor inmunosupresor. Los anticuerpos dirigidos contra PD-L1 o PD-1 son conocidos en la técnica y se divulgan en los
35 documentos WO 2006/121168, WO 2007/005874 o WO 2010/036959. El documento WO 2010/077634 divulga anticuerpos anti-PD-L1 y su uso para potenciar la función de los linfocitos T.

El PD-L1 está sobreexpresado en muchos tipos de cáncer y a menudo se asocia con un mal pronóstico (Okazaki
40 T *et al.*, Intern. Immun. 2007 19(7):813) (Thompson RH *et al.*, Cancer Res 2006, 66(7):3381). De forma interesante, la mayoría de los linfocitos T infiltrantes de tumores expresan predominantemente PD-1, en contraste con los linfocitos T en tejidos normales y los linfocitos T de sangre periférica, lo que indica que la regulación por incremento de PD-1 en linfocitos T reactivos al tumor puede contribuir al deterioro de las respuestas inmunitarias antitumorales (Blood 2009 114(8): 1537). Esto se puede deber a la explotación de la
45 señalización de PD-L1 mediada por células tumorales que expresan PD-L1 que interactúan con los linfocitos T que expresan PD-1 para dar como resultado la atenuación de la activación de los linfocitos T y la evasión de la vigilancia inmunológica (Sharpe *et al.*, Nat Rev 2002) (Keir ME *et al.*, 2008 Annu. Rev. Immunol. 26:677). Por lo tanto, la inhibición de la interacción PD-L1/PD-1 puede potenciar la muerte de tumores mediada por linfocitos T CD8+.

50 La inhibición de la señalización del eje de PD-1 a través de sus ligandos directos (por ejemplo, PD-L1, PD-L2) se ha propuesto como un medio para potenciar la inmunidad de los linfocitos T para el tratamiento del cáncer (por ejemplo, la inmunidad tumoral). Además, se han observado mejoras similares en la inmunidad de los linfocitos T al inhibir la unión de PD-L1 al ligando B7-1. El tratamiento terapéutico óptimo podría combinar el bloqueo de la interacción receptor/ligando PD-1 con otros agentes antineoplásicos. Sigue existiendo la necesidad de un
55 tratamiento óptimo para tratar, estabilizar, prevenir y/o retrasar el desarrollo de diversos cánceres.

En el presente documento se describe una politerapia que comprende oxaliplatino, leucovorina y 5-FU y un antagonista de unión al eje de PD-1 con o sin un antagonista de VEGF. En particular, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-PD-L1 que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y una de
60 cadena ligera, en el que

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

(i) la HVR-H1 es GFTFSDSWIH (SEQ ID NO:15);

(ii) la HVR-H2 es AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:16);

(iii) la 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

(iv) HVR-L1 es RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:17);

(v) SASFLYS (SEQ ID NO:18);

(vi) QQYLYHPAT (SEQ ID NO:19),

y en el que dicho anticuerpo anti-PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 tanto a PD-1 como a B7-1, para su uso en combinación con oxaliplatino, leucovorina, 5-FU y un anticuerpo anti-VEGF antagonista para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo, en el que el cáncer es melanoma, cáncer colorrectal, carcinoma pulmonar no microcítico, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de páncreas o carcinoma de células renales.

En el presente documento se divulgan procedimientos para tratar el cáncer o ralentizar la progresión del cáncer en un individuo, que comprenden administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-1 y oxaliplatino, leucovorina y 5-FU, en los que este procedimiento además comprende la administración de un antagonista de VEGF.

El cáncer puede ser un melanoma, un cáncer colorrectal, un cáncer pulmonar no microcítico, un cáncer de ovario, un cáncer de mama, un cáncer de próstata, un cáncer de páncreas o un carcinoma de células renales. El cáncer puede estar en estadio precoz o en estadio tardío. En algunos modos de realización, el sujeto tratado es un ser humano.

En algunos modos de realización, el tratamiento da como resultado una respuesta sostenida en el individuo después de la interrupción del tratamiento. En algunos modos de realización, el tratamiento produce una respuesta completa, una respuesta parcial o enfermedad estable en el sujeto.

El antagonista de unión al eje de PD-1 que se va a usar de acuerdo con la presente invención es un antagonista de unión a PD-L1 y el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1 y la unión de PD-L1 a B7-1. El antagonista de unión a PD-L1 puede ser un anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo YW243.55.S70 descrito en el presente documento), un fragmento de unión a antígeno del mismo, una inmunoadhesina, una proteína de fusión o un oligopéptido. También se describe en el presente documento que un antagonista de unión a PD-L2 inhibe la unión de PD-L2 a PD-1. El antagonista de unión a PD-L2 puede ser un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno del mismo, una inmunoadhesina, (por ejemplo, AMP-224 descrita en el presente documento), una proteína de fusión o un oligopéptido.

El antagonista de VEGF que se va a usar de acuerdo con la presente invención es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-VEGF se une al mismo epítipo que el anticuerpo anti-VEGF monoclonal A4.6.1 producido por el hibridoma ATCC HB 10709. El anticuerpo anti-VEGF puede ser un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-VEGF tiene una región variable de cadena pesada que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGV
INTYTGEPY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP
HYYGSSHWYF DVWGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO:22)

y una región variable de cadena ligera que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIIYF
TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ
GTKVEIKR (SEQ ID NO:23).

También se divulga un kit que comprende un antagonista de unión al eje de PD-1, oxaliplatino, leucovorina y 5-FU con o sin un antagonista de VEGF para tratar o retrasar la progresión de un cáncer en un individuo o potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer. El kit puede comprender un antagonista de unión al eje de PD-1 y un prospecto que comprende instrucciones para usar el antagonista de unión al eje de PD-1 en combinación con oxaliplatino, leucovorina y 5-FU con o sin un antagonista de VEGF para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo o potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer. El kit puede comprender un antagonista de VEGF y un prospecto que comprende instrucciones para

usar el antagonista de VEGF en combinación con un antagonista de unión al eje de PD-1 y oxaliplatino, leucovorina y 5-FU para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo o para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer. El kit puede comprender un antagonista de unión al eje de PD-1 y un antagonista de VEGF, y un prospecto que comprende instrucciones para usar el antagonista de unión al eje de PD-1 y el antagonista de VEGF para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo o para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **figura 1** es un gráfico que representa los cambios en el volumen del tumor con anticuerpos anti-PD-L1 y cotratamiento con FOLFOX. Los datos demuestran una reducción significativa del crecimiento tumoral y un efecto antitumoral sostenido en comparación con el tratamiento con anticuerpos anti-PD-L1 o con FOLFOX solos.

La **figura 2** es un gráfico que muestra los cambios en el peso corporal para los grupos de tratamiento que se muestran en la figura 1.

La **figura 3** es un gráfico que representa los cambios en el volumen del tumor con anticuerpos anti-PD-L1 en combinación con FOLFOX en comparación con anticuerpos anti-PD-L1 en combinación con FOLFOX y anticuerpo anti-VEGF. Los datos demuestran que la administración adicional de anticuerpo anti-VEGF redujo significativamente el crecimiento tumoral y dio como resultado un efecto antitumoral sostenido en comparación con el tratamiento con anticuerpos anti-PD-L1 en combinación con FOLFOX.

La **figura 4** es un gráfico que muestra los cambios en el peso corporal para los grupos de tratamiento que se muestran en la figura 3.

I. Técnicas generales

Las técnicas y los procedimientos descritos o a los que se hace referencia en el presente documento en general se comprenden bien y se emplean comúnmente usando una metodología convencional por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3.^a edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, *et al.* eds., (2003)); la serie *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames y G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, and *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather y P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths y D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis *et al.*, eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan *et al.*, eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C.A. Janeway y P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita *et al.*, eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

II. Definiciones

El término "*antagonista de unión al eje de PD-1*" es una molécula que inhibe la interacción de un ligando del eje de PD-1 con uno o más de sus ligandos, para eliminar la disfunción de los linfocitos T que resulta de la señalización en el eje de señalización de PD-1, siendo un resultado la restauración o potenciación de la función de los linfocitos T. Como se usa en el presente documento, un antagonista de unión al eje de PD-1 incluye un antagonista de unión a PD-1, un antagonista de unión a PD-L1 y un antagonista de unión a PD-L2.

El término "*antagonistas de unión a PD-1*" es una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-1 con uno o más de sus ligandos, tales como PD-L1, PD-L2. En algunos modos de realización, el antagonista de unión a PD-1 es una molécula que inhibe la unión de PD-1 a sus ligandos. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L1 y/o PD-L2. Por ejemplo, los antagonistas de unión a PD-1 incluyen anticuerpos anti-PD-1, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-1 con PD-L1 y/o PD-L2. En un modo de realización, un antagonista de unión a PD-1 reduce la señal coestimuladora negativa mediada por o a través de proteínas de la superficie celular expresadas en la

señalización mediada por linfocitos T a través de PD-1, de modo que hace que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional. En algunos modos de realización, el antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1. En un aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es MDX-1106 descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es Merck 3745 descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es CT-011 descrito en el presente documento.

El término "*antagonistas de unión a PD-L1*" es una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L1 con uno o más de sus ligandos, tales como PD-1, B7-1. En algunos modos de realización, un antagonista de unión a PD-L1 es una molécula que inhibe la unión de PD-L1 a sus ligandos. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1 y/o B7-1. En algunos modos de realización, los antagonistas de unión a PD-L1 incluyen anticuerpos anti-PD-L1, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L1 con uno o más de sus ligandos, tales como PD-1, B7-1.

En un modo de realización, un antagonista de unión a PD-L1 reduce la señal coestimuladora negativa mediada por o a través de proteínas de la superficie celular expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-L1, de modo que hace que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional. En algunos modos de realización, un antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1. En un aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es YW243.55.S70 descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MDX-1105 descrito en el presente documento.

El término "*antagonistas de unión a PD-L2*" es una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L2 con uno o más de sus ligandos, tal como PD-1. En algunos modos de realización, un antagonista de unión a PD-L2 es una molécula que inhibe la unión de PD-L2 a sus ligandos. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-L2 inhibe la unión de PD-L2 a PD-1. En algunos modos de realización, los antagonistas de PD-L2 incluyen anticuerpos anti-PD-L2, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L2 con uno o más de sus ligandos, tal como PD-1. En un modo de realización, un antagonista de unión a PD-L2 reduce la señal coestimuladora negativa mediada por o a través de proteínas de la superficie celular expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-L2, de modo que hace que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional. En algunos modos de realización, un antagonista de unión a PD-L2 es una inmunoadhesina de PD-L2. En un aspecto específico, una inmunoadhesina de PD-L2 es AMP-224 descrito en el presente documento.

Un "antagonista de VEGF" se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades de VEGF, incluyendo su unión a uno o más receptores de VEGF. Los antagonistas de VEGF incluyen anticuerpos anti-VEGF y sus fragmentos de unión a antígeno de los mismos, moléculas receptoras y derivados que se unen específicamente a VEGF, impidiendo su unión a uno o más receptores, anticuerpos anti-receptores de VEGF y antagonistas de receptores de VEGF tales como inhibidores de moléculas pequeñas de las tirosina cinasas de VEGFR.

El término "VEGF" o "VEGF-A" se usa para referirse al factor de crecimiento de células endoteliales vasculares humano de 165 aminoácidos y los factores de crecimiento de células endoteliales vasculares humanos de 121, 145, 189 y 206 aminoácidos relacionados, como se describe, por ejemplo, por Leung *et al.* Science, 246:1306 (1989), y Houck *et al.* Mol. Endocrin., 5:1806 (1991), junto con las formas alélicas naturales y procesadas de los mismos. VEGF-A es parte de una familia de genes que incluye VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F y PlGF. VEGF-A se une principalmente a dos tirosina cinasas receptoras de alta afinidad, VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (Flk-1/KDR), siendo este último el principal transmisor de las señales mitogénicas de las células endoteliales vasculares de VEGF-A. Adicionalmente, se ha identificado la neuropilina-1 como un receptor para las isoformas de VEGF-A que se unen a la heparina y puede desempeñar un papel en el desarrollo vascular. El término "VEGF" o "VEGF-A" también se refiere a VEGF de especies no humanas, tales como ratón, rata o primate. A veces, el VEGF de una especie específica se indica con términos tales como hVEGF para VEGF humano o mVEGF para VEGF murino. El término "VEGF" también se usa para referirse a formas truncadas o fragmentos del polipéptido que comprenden los aminoácidos 8 a 109 o 1 a 109 del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares humano de 165 aminoácidos. Se puede identificar la referencia a cualquiera de dichas formas de VEGF en la presente solicitud, por ejemplo, mediante "VEGF (8-109)", "VEGF (1-109)" o "VEGF165". Las posiciones de aminoácidos para un VEGF natural "truncado" se numeran como se indica en la secuencia de VEGF natural. Por ejemplo, la posición del aminoácido 17 (metionina) en el VEGF natural truncado también es la posición 17 (metionina) en el VEGF natural. El VEGF natural truncado tiene afinidad de unión por los receptores KDR y Flt-1 en comparación con el VEGF natural.

Un "anticuerpo anti-VEGF" es un anticuerpo que se une a VEGF con suficiente afinidad y especificidad. El anticuerpo seleccionado normalmente tendrá una afinidad de unión por VEGF, por ejemplo, el anticuerpo se puede unir a hVEGF con un valor de Kd de entre 100 nM-1 pM. Las afinidades de anticuerpos se pueden

- determinar mediante un ensayo basado en resonancia de plasmón de superficie (tal como el ensayo BIAcore como se describe en la publicación de la solicitud PCT n.º WO2005/012359); ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA); y ensayos de competencia (por ejemplo, RIA), por ejemplo. En determinados modos de realización, el anticuerpo anti-VEGF de la invención se puede usar como un agente terapéutico para dirigirse a e interferir en enfermedades o afecciones en las que está implicada la actividad de VEGF. Además, el anticuerpo se puede someter a otros ensayos de actividad biológica, por ejemplo, para evaluar su eficacia como agente terapéutico. Dichos ensayos son conocidos en la técnica y dependen del antígeno diana y del uso previsto del anticuerpo. Los ejemplos incluyen el ensayo de inhibición con HUVEC; ensayos de inhibición del crecimiento de células tumorales (como se describe en el documento WO 89/06692, por ejemplo); ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad mediada por complemento (CDC) (patente de EE. UU. n.º 5.500.362); y ensayos de actividad agonista o hematopoyesis (véase el documento WO 95/27062). En general, un anticuerpo anti-VEGF no se unirá a otros homólogos de VEGF tales como VEGF-B o VEGF-C, ni a otros factores de crecimiento tales como PIGF, PDGF o bFGF.
- 15 Una "proteína quimérica receptora de VEGF" es una molécula receptora de VEGF que tiene secuencias de aminoácidos derivadas de al menos dos proteínas diferentes, al menos una de las cuales es una proteína receptora de VEGF. En determinados modos de realización, la proteína quimérica receptora de VEGF es capaz de unirse a e inhibir la actividad biológica de VEGF.
- 20 Un "agente antiangiogénico" o "inhibidor de la angiogénesis" se refiere a una sustancia de bajo peso molecular, un polinucleótido, un polipéptido, una proteína aislada, una proteína recombinante, un anticuerpo, o conjugados o proteínas de fusión de los mismos, que inhibe la angiogénesis, la vasculogénesis o la permeabilidad vascular indeseable, ya sea directa o indirectamente. Se debe entender que el agente antiangiogénico incluye aquellos agentes que se unen y bloquean la actividad angiogénica del factor angiogénico o su receptor. Por ejemplo, un agente antiangiogénico es un anticuerpo u otro antagonista de un agente angiogénico como se define anteriormente, por ejemplo, anticuerpos contra VEGF-A o contra el receptor de VEGF-A (por ejemplo, receptor KDR o receptor Flt-1), inhibidores anti-PDGFR tales como Gleevec™ (mesilato de imatinib). Los agentes antiangiogénicos también incluyen inhibidores naturales de la angiogénesis, por ejemplo, angiostatina, endostatina, etc. Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991); Streit y Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003) (por ejemplo, la Tabla 3 que enumera el tratamiento antiangiogénico en el melanoma maligno); Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5:1359-1364 (1999); Tonini *et al.*, *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) (por ejemplo, la Tabla 2 que enumera los factores antiangiogénicos conocidos); y Sato. *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003) (por ejemplo, la Tabla 1 que enumera los agentes antiangiogénicos usados en ensayos clínicos).
- 35 El término "disfunción", en el contexto de la disfunción inmunológica, se refiere a un estado de sensibilidad inmunitaria reducida a la estimulación antigénica. El término incluye los elementos comunes de *agotamiento y/o anergia* en los que puede ocurrir el reconocimiento de antígenos, pero la respuesta inmunitaria resultante es ineficaz para controlar la infección o el crecimiento tumoral.
- 40 "Potenciar la función de los linfocitos T" significa inducir, causar o estimular que un linfocito T tenga una función biológica sostenida o amplificada, o renovar o reactivar linfocitos T agotados o inactivos. Los ejemplos de potenciación de la función de linfocitos T incluyen: aumento de la secreción de interferón y desde los linfocitos T CD8⁺, aumento de la proliferación, aumento de la sensibilidad a antígenos (por ejemplo, eliminación vírica o patógena) en relación con dichos niveles antes de la intervención. En un modo de realización, el nivel de potenciación es al menos un 50 %, de forma alternativa un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 120 %, 150 %, 200 %. El experto en la técnica conoce la manera de medir esta potenciación.
- 45 Un "trastorno disfuncional de linfocitos T" es un trastorno o afección de los linfocitos T caracterizado por una sensibilidad disminuida a la estimulación antigénica. En un modo de realización particular, un trastorno disfuncional de linfocitos T es un trastorno que se asocia específicamente con un incremento inadecuado de la señalización a través de PD-1. En otro modo de realización, un trastorno disfuncional de linfocitos T es uno en el que los linfocitos T son anérgicos o tienen una capacidad disminuida de secretar citocinas, proliferar o ejecutar actividad citolítica. En un aspecto específico, la disminución de la sensibilidad da como resultado un control ineficaz de un patógeno o tumor que expresa un inmunógeno. Los ejemplos de trastornos disfuncionales de linfocitos T caracterizados por la disfunción de linfocitos T incluyen infección aguda no resuelta, infección crónica e inmunidad tumoral.
- 50 "Inmunidad tumoral" se refiere al proceso en el que los tumores evaden el reconocimiento y la eliminación por parte del sistema inmunitario. 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 tumoral incluyen unión al tumor, contracción del tumor y eliminación del tumor.
- 55 "Inmunogenicidad" se refiere a la capacidad de una sustancia particular de provocar una respuesta inmunitaria. Los tumores son inmunogénicos y la potenciación de la inmunogenicidad tumoral ayuda en la eliminación de las células tumorales mediante la respuesta inmunitaria. Los ejemplos de potenciación de la inmunogenicidad

tumoral incluyen el tratamiento con anticuerpos anti-PDL, oxaliplatino, leucovorina y 5-FU con o sin un antagonista de VEGF.

5 "*Respuesta sostenida*" se refiere al efecto sostenido en la reducción del crecimiento tumoral después de la interrupción de un tratamiento. Por ejemplo, el tamaño del tumor puede permanecer igual o más pequeño en comparación con el tamaño al *comienzo* de la fase de administración. En algunos modos de realización, la respuesta sostenida tiene una duración al menos igual a la duración del tratamiento, al menos 1,5, 2,0, 2,5 o 3,0 veces la duración del tratamiento.

10 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 anticuerpo (por ejemplo, Fab, F(ab')₂ y Fv). El término "*inmunoglobulina*" (Ig) se usa de manera intercambiable con "*anticuerpo*" en el presente documento.

15 La unidad de anticuerpo de 4 cadenas básica 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 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 se pueden polimerizar para formar ensamblajes polivalentes en combinación con la cadena J. En el caso de las IgG, la unidad de 4 cadenas es, en general, de aproximadamente 150.000 dalton. Cada cadena L se une a una cadena H 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 puentes disulfuro intracatenarios regularmente espaciados. Cada cadena H tiene, en el extremo N, 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 los isotipos μ y ε. Cada cadena L tiene, en el extremo N, 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 residuos de aminoácido particulares forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada. El emparejamiento de un V_H y un V_L conjuntamente forma un sitio de unión a antígeno individual. 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. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y capítulo 6. La cadena L de cualquier especie de vertebrado se puede asignar a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (CH), las inmunoglobulinas se pueden asignar 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 además en subclases basadas en diferencias relativamente menores en la secuencia y función de CH, por ejemplo, los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

40 La "*región variable*" o "*dominio variable*" de un anticuerpo se refiere a los dominios aminotermiales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera se pueden denominar "*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 a antígeno.

45 El término "*variable*" se refiere al hecho de que determinados segmentos de los dominios variables difieren ampliamente en las secuencias 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 a lo largo del alcance completo de los dominios variables. En cambio, se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables (HVR), en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones estructurales (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β, que se conectan mediante tres HVR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β. Las HVR de cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad mediante las regiones FR y, con las HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los 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 de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

60 El término "*anticuerpo monoclonal*", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales y/o modificaciones postraduccionales (por ejemplo, isomerizaciones, amidaciones) que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un sitio antigénico

único. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante del antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se sintetizan por el cultivo de hibridoma, no contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden producir mediante una variedad de técnicas, que incluyen, por ejemplo, el procedimiento del hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies: 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, NY, 1981)), procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, patente de EE. UU. n.º 4.816.567), tecnologías de presentación de 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 similares en animales que tienen parte o la totalidad de los loci de inmunoglobulina humana o genes que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, los 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); las patentes de EE. UU. 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).

El término "*anticuerpo no marcado*" se refiere a un anticuerpo que no está conjugado a un resto citotóxico o radiomarcador.

Los términos "*anticuerpo de longitud completa*", "*anticuerpo intacto*" y "*anticuerpo completo*" se usan de forma intercambiable para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, en lugar de un fragmento de anticuerpo. Específicamente, los anticuerpos completos incluyen aquellos con cadenas pesadas y ligeras que incluyen una región Fc. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia natural (por ejemplo, dominios constantes de secuencia natural humana) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos. En algunos casos, el anticuerpo intacto puede tener una o más funciones efectoras.

Un "*fragmento de anticuerpo*" comprende una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión a antígeno y/o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (véase la patente de EE. UU. n.º 5.641.870, ejemplo 2; Zapata *et al.*, *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. La digestión con papaína de los anticuerpos produjo dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L completa junto con el dominio de la 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 unidos por puente disulfuro que tiene diferente actividad de unión a antígeno y que todavía se puede reticular con el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por tener unos pocos residuos adicionales en el extremo carboxílico 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 un Fab' en el que el o los residuos 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.

El fragmento Fc comprende las porciones carboxiterminales de ambas cadenas H mantenidas juntas por puentes disulfuro. Las funciones efectoras de los anticuerpos están determinadas por secuencias en la región Fc, la región que también reconocen los receptores Fc (FcR) encontrados en determinados tipos de células.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de unión a y de reconocimiento de antígeno. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio de la región variable de una cadena pesada y una ligera en estrecha asociación no covalente. Del plegamiento de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (3 bucles de cada una de las cadenas H y L) que aportan los residuos aminoácidos para la 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 solo tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

"Fv monocatenario", también abreviado como "sFv" o "scFv", son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados en una única cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido sFv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de los sFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

Los "fragmentos funcionales" de los anticuerpos de la invención comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que en general incluye la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto o la región Fc de un anticuerpo que retiene o ha modificado la capacidad de unión a FcR. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños preparados construyendo fragmentos sFv (véase el párrafo anterior) con conectores cortos (de aproximadamente 5-10 residuos) entre los dominios V_H y V_L de modo que se logra el 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 "entrecruzados" en los que los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. Los diacuerpos se describen con más detalle, por ejemplo, en el documento EP 404.097; documento WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993).

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos (inmunoglobulinas) "quiméricos" en los que una porción 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 las cadenas es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (véase la patente de EE. UU. n.º 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. 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 se deriva de un anticuerpo producido, por ejemplo, por la inmunización de monos 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 una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En un modo de realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los residuos de una HVR (definida a continuación en el presente documento) del receptor se reemplazan por residuos de una HVR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos estructurales ("FR") de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se pueden realizar para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo, tal como la afinidad de unión. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente al menos uno, y típicamente 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 residuos de FR individuales que mejoran el rendimiento del anticuerpo, tal como la afinidad de unión, la isomerización, la inmunogenicidad, etc. El número de estas sustituciones aminoacídicas en la FR es típicamente de no más de 6 en la cadena H y de no más de 3 en la cadena L. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, 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. Alergia, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurlé y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); y las patentes de EE. UU. n.º 6.982.321 y 7.087.409.

Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde 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 divulga en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente a un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo colecciones 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 los procedimientos descritos en Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 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). Los anticuerpos humanos se pueden preparar administrando el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a la exposición antigénica, pero cuyos loci endógenos se han desactivado, por ejemplo, xenorratones inmunizados (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 6.075.181 y 6.150.584 con respecto a la tecnología XENOMOUSE™). Véase también, por ejemplo, Li *et al. Proc. Natl Acad Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) con respecto a anticuerpos humanos generados a través de una tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos.

El término "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 naturales, H3 y L3 presentan la mayor diversidad de las seis HVR, y se cree que H3 en particular desempeña un papel exclusivo al conferir una especificidad precisa a los anticuerpos. Véanse, por ejemplo, Xu *et al., Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson y Wu, en *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). De hecho, los anticuerpos de camélido naturales que consisten en una cadena pesada solamente son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera. Véanse, por ejemplo, Hamers-Casterman *et al., Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff *et al., Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

Varias delimitaciones de HVR están en uso y se engloban en el presente documento. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las más comúnmente usadas (Kabat *et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). En cambio, Chothia se refiere a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las HVR de AbM representan un término medio entre las HVR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se usan en el programa informático de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las HVR de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los residuos 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	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (Numeración de Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (Numeración de Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las HVR pueden comprender "HVR extendidas" como sigue: 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 residuos del dominio variable se numeran de acuerdo con Kabat *et al., supra* para cada una de estas definiciones.

La expresión "numeración de residuos de dominio variable según Kabat" o "numeración de posición de aminoácidos según Kabat", y las variaciones de la misma, 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., supra*. Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales 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 único inserto de aminoácido (residuo 52a de acuerdo con Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del residuo 82 de FR de cadena pesada. La numeración de residuos de Kabat se puede determinar para un anticuerpo dado por alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada según Kabat "estándar".

Los residuos "estructurales" o "FR" son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de HVR, como se definen en el presente documento.

Una "secuencia estructural consenso humana" o "estructura humana aceptora" es una estructura que representa los residuos aminoacídicos que aparecen más comúnmente en una selección de secuencias estructurales 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. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo según Kabat *et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Los ejemplos incluyen, para el VL, que el subgrupo pueda ser el subgrupo kappa I, kappa II, kappa III o kappa IV según Kabat *et al., supra*. Adicionalmente, para el VH, el subgrupo puede ser el subgrupo I, subgrupo II o subgrupo III según Kabat *et al., supra*. De forma alternativa, una secuencia estructural consenso humana se puede derivar de lo anterior, en la que se seleccionan residuos

particulares, tal como cuando se selecciona un residuo estructural humano en función de su homología con la estructura de donante alineando la secuencia estructural de donante con una colección de varias secuencias estructurales humanas. Una estructura humana aceptora "derivada de" una estructura de inmunoglobulina humana o una secuencia estructural consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos preexistentes. En algunos modos de realización, el número de cambios de aminoácidos preexistentes es 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.

Una "secuencia estructural consenso del subgrupo III de VH" comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo III de cadena variable pesada de Kabat *et al.*, *supra*. En un modo de realización, la secuencia de aminoácidos de la secuencia estructural consenso del subgrupo III de VH comprende al menos una parte o la totalidad de cada una de las siguientes secuencias: EVQLVESGGGLVQPFGGSLRLSCAAS WVRQAPGKGLEWV (HC-FR1) (SEQ ID NO:30), (HC-FR2) (SEQ ID NO:31), RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (HC-FR3) (SEQ ID NO:32), WGQGTLVTVSA (HC-FR4) (SEQ ID NO:33).

Una "secuencia estructural consenso de kappa I de VL" comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo kappa I de cadena variable ligera de Kabat *et al.*, *supra*. En un modo de realización, la secuencia de aminoácidos de la secuencia estructural consenso del subgrupo I de VH comprende al menos una parte o la totalidad de cada una de las siguientes secuencias: DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (LC-FR1) (SEQ ID NO:34), WYQQKPGKAPKLLIY (LC-FR2) (SEQ ID NO:35), GVPSRFGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYC (LC-FR3) (SEQ ID NO:36), FGQGTKVEIKR (LC-FR4) (SEQ ID NO:37).

Una "modificación de aminoácido" en una posición específica, por ejemplo de la región Fc, se refiere a la sustitución o delección del residuo especificado, o la inserción de al menos un residuo de aminoácido adyacente al residuo especificado. La inserción "adyacente" a un residuo específico significa la inserción a una distancia de uno o dos residuos del mismo. La inserción puede ser N terminal o C terminal para el residuo especificado. La modificación de aminoácido preferente en el presente documento es una sustitución.

Un anticuerpo "de afinidad madurada" es uno con una o más alteraciones en una o más HVR del mismo que dan como resultado una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo original que no posee dichas alteraciones. En un modo de realización, un anticuerpo de afinidad madurada tiene afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos de afinidad madurada se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describe la maduración de la afinidad mediante barajado de los dominios de VH y VL. La mutagénesis aleatoria de residuos de la HVR y/o de la región estructural se describe, por ejemplo, en: Barbas *et al. Proc Nat. 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).

Como se usa en el presente documento, la expresión "se une específicamente a" o "es específico para" se refiere a interacciones medibles y reproducibles, tal como la 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 a una diana (que puede ser un epítipo) es un anticuerpo que se une a esta diana con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o durante mayor duración que con la que se une a otras dianas. En un modo de realización, el grado de unión de un anticuerpo a una diana no relacionada es inferior a aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo a la diana medida, por ejemplo, mediante un radioinmunoanálisis (RIA). En determinados modos de realización, un anticuerpo que se une específicamente a una diana tiene una constante de disociación (Kd) 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 determinados modos de realización, un anticuerpo se une específicamente a un epítipo en una proteína que se conserva entre la proteína de diferentes especies. En otro modo de realización, la unión específica puede incluir, pero no requiere, una unión exclusiva.

Como se usa en el presente documento, el término "inmuno adhesina" designa moléculas de tipo anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada, que es distinta de la del sitio de unión y reconocimiento antigénico de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmuno adhesina es típicamente una secuencia de aminoácidos contiguos que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmuno adhesina se puede obtener a partir 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 incluyen preferentemente la sustitución de un dominio de un polipéptido o anticuerpo descrito en el presente documento en lugar de al menos una región variable dentro de una molécula de Ig. En un aspecto en particular preferente, la fusión de inmunoglobulina incluye las regiones bisagra, CH2 y CH3 o las regiones bisagra, CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulina, véase también la patente de EE. UU. n.º 5.428.130 expedida el 27 de junio de 1995. Por ejemplo, las inmunoadhesinas útiles como segundos medicamentos útiles para la politerapia descrito en el presente documento incluyen polipéptidos que comprenden las porciones de unión a PD-1 o extracelulares de PD-L1 o PD-L2 o las porciones de unión a PD-L1 o PD-L2 o extracelulares de PD-1, fusionadas a un dominio constante de una secuencia de inmunoglobulina, tal como un PD-L1 ECD - Fc, un PD-L2 ECD - Fc y un PD-1 ECD - Fc, respectivamente. Las combinaciones de inmunoadhesinas de Ig Fc y ECD de receptores de superficie celular a veces se denominan receptores solubles.

Una "*proteína de fusión*" y un "*polipéptido de fusión*" se refieren a un polipéptido que tiene dos porciones unidas covalentemente, en el que cada una de las porciones es un polipéptido que tiene una propiedad diferente. La propiedad puede ser una propiedad biológica, tal como actividad *in vitro* o *in vivo*. La propiedad también puede ser una propiedad química o física simple, tal como unión a una molécula diana, catálisis de una reacción, etc. Las dos porciones se pueden unir directamente mediante un enlace peptídico único o mediante un conector peptídico, pero están en el marco de lectura entre sí.

Un "*oligopéptido PD-1*", "*oligopéptido PD-L1*" u "*oligopéptido PD-L2*" es un oligopéptido que se une, preferentemente de manera específica, a un polipéptido coestimulador negativo PD-1, PD-L1 o PD-L2, respectivamente, incluyendo un receptor, ligando o componente de señalización, respectivamente, como se describe en el presente documento. Dichos oligopéptidos se pueden sintetizar químicamente usando una metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o se pueden preparar y purificar usando tecnología recombinante. Dichos oligopéptidos suelen tener al menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, de forma alternativa 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 se pueden identificar usando técnicas bien conocidas. A este respecto, se observa que las técnicas para cribar colecciones de oligopéptidos para seleccionar oligopéptidos que sean capaces de unirse específicamente a una diana polipeptídica son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 5.403.484, 5.571.689, 5.663.143; publicaciones PCT n.º WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**:3998-4002 (1984); Geysen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**:178-182 (1985); Geysen *et al.*, in *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).

Un anticuerpo "*de bloqueo*" o un anticuerpo "*antagonista*" es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. En algunos modos de realización, los anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno. Por ejemplo, un anticuerpo antagonista específico de VEGF se une a VEGF e inhibe la capacidad de VEGF para inducir la proliferación de células endoteliales vasculares o para inducir la permeabilidad vascular. Los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención bloquean la señalización a través de PD-1 para restaurar una respuesta funcional de los linfocitos T desde un estado disfuncional a la estimulación antigénica.

Un anticuerpo "*agonista*" o activador es uno que potencia o inicia la señalización por el antígeno al que se une. En algunos modos de realización, los anticuerpos agonistas causan o activan la señalización sin la presencia del ligando natural.

El término "*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 natural y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define normalmente para que se extienda desde un residuo aminoacídico en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxiterminal de la misma. La lisina C terminal (residuo 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc se puede retirar, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o genomanipulando 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 residuos K447 retirados, poblaciones de anticuerpos sin residuos K447 retirados y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447. Las regiones Fc de secuencia natural adecuadas para uso en los anticuerpos de la invención incluyen IgG1, IgG2 (IgG2A, IgG2B), IgG3 e IgG4 humanas.

El "*receptor de Fc*" o "*FcR*" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferente

es un FcR humano de secuencia natural. Además, un FcR preferente es aquel que se une a un anticuerpo contra IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas empalmadas de forma alternativa de estos receptores, los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor de activación") y FcγRIIB (un "receptor de inhibición"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor de inhibición FcγRIIB contiene un motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (véase M. Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* **15**:203-234 (1997). Los FcR se revisan 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, se engloban por el término "FcR" en el presente documento.

El término "receptor de Fc" o "FcR" también incluye el receptor neonatal, *FcRn*, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto. Guyer *et al.*, *J. Immunol.* **117** : 587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* **24**: 249 (1994). Se conocen procedimientos de medición de la unión a 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); el documento WO 2004/92219 (Hinton *et al.*). Se pueden someter a ensayo la unión al FcRn *in vivo* y la semivida en suero de polipéptidos de unión de alta afinidad a FcRn humanos, por ejemplo, en líneas celulares humanas transfectadas o de ratones transgénicos que expresan el 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 anticuerpo con unión mejorada o disminuida a los FcR. Véase también, por ejemplo, Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* **276**: 6591-6604 (2001).

La frase "sustancialmente reducida" o "sustancialmente diferente", como se usa en el presente documento, indica un grado suficientemente alto de diferencia entre dos valores numéricos (en general, uno asociado con una molécula y el otro asociado con una molécula de referencia/comparadora), de modo que un experto en la técnica consideraría que la diferencia entre los dos valores tiene significación estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de Kd). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, superior a aproximadamente un 10 %, superior a aproximadamente un 20 %, superior a aproximadamente un 30 %, superior a aproximadamente un 40 % y/o superior a aproximadamente un 50 % como una función del valor de la molécula de referencia/comparadora.

La expresión "sustancialmente similar" o "sustancialmente igual", como se usa en el presente documento, indica un grado suficientemente alto de similitud 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 técnica consideraría que la diferencia entre los dos valores es de poca o ninguna significación biológica y/o estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de Kd). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, inferior a aproximadamente un 50 %, inferior a aproximadamente un 40 %, inferior a aproximadamente un 30 %, inferior a aproximadamente un 20 % y/o inferior a aproximadamente un 10 % como una función del valor del anticuerpo de referencia/comparador.

Los "vehículos", como se usan en el presente documento, incluyen vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o mamífero que está expuesto a los mismos en las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa de pH tamponado. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como seroalbúmina, 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 azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.

Un "prospecto" se refiere a las instrucciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de medicamentos que contienen información sobre las indicaciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de medicamentos que contienen información sobre indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones, otros medicamentos que se van a combinar con el producto envasado, y/o advertencias sobre el uso de dichos medicamentos, etc.

Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" se refiere a la intervención clínica diseñada para alterar la evolución natural del individuo o la célula que se está tratando durante la evolución de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen disminuir la tasa de progresión de la enfermedad, mejorar o paliar el estado de enfermedad, y la remisión o mejora del pronóstico. Por ejemplo, un individuo se "trata" con éxito si uno o más síntomas asociados con el cáncer se mitigan o eliminan, lo que incluye, pero no se limita a, reducir la proliferación de (o destruir) las células cancerosas, disminuir los síntomas resultantes de la

enfermedad, aumentar la calidad de vida de quienes padecen la enfermedad, disminuir la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, retrasar la progresión de la enfermedad y/o prolongar la supervivencia de los individuos.

5 Como se usa en el presente documento, "retrasar la progresión de una enfermedad" significa diferir, dificultar, ralentizar, retardar, estabilizar y/o posponer el desarrollo de la enfermedad (tal como el cáncer). Este retraso puede tener diferentes duraciones, dependiendo del historial de la enfermedad y/o del individuo tratado. Como es evidente para un experto en la técnica, un retraso suficiente o significativo puede, en efecto, abarcar la prevención, ya que el individuo no desarrolla la enfermedad. Por ejemplo, se puede retrasar un cáncer en
10 estadio tardío, tal como el desarrollo de metástasis.

Una "*cantidad eficaz*" es al menos la concentración mínima requerida para conseguir una mejora o prevención medible de un trastorno particular. En el presente documento, una cantidad eficaz puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del paciente y la capacidad del
15 anticuerpo de provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del tratamiento se ve compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Para uso profiláctico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados tales como eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retrasar la aparición de la enfermedad, incluyendo los síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y los fenotipos
20 patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Para uso terapéutico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados clínicos tales como la disminución de uno o más síntomas resultantes de la enfermedad, el aumento de la calidad de vida de aquellos que padecen la enfermedad, la disminución de la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, la potenciación del efecto de otro medicamento, tal como mediante direccionamiento, el retraso de la progresión de
25 la enfermedad y/o la prolongación de la supervivencia. En el caso de cáncer o tumor, una cantidad eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y de forma deseable detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y de forma deseable detener) la metástasis tumoral; inhibir en cierta medida el crecimiento tumoral; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. Se
30 puede administrar una cantidad eficaz en una o más administraciones. Para los fines de la presente invención, una cantidad eficaz de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para llevar a cabo un tratamiento profiláctico o terapéutico directa o indirectamente. Como se entiende en el contexto clínico, una cantidad eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica se puede lograr o no junto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por lo tanto, una "cantidad eficaz" se puede considerar en el
35 contexto de la administración de uno o más agentes terapéuticos, y se puede considerar que un solo agente se administra en una cantidad eficaz si, junto con uno o más agentes adicionales, se puede lograr o se logra un resultado deseable.

40 Como se usa en el presente documento, "junto con" se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento además de otra modalidad de tratamiento. Como tal, "junto con" se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento antes, durante o después de la administración de la otra modalidad de tratamiento al individuo.

45 Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. En esta definición se incluyen los cánceres benignos y malignos, así como los tumores latentes o micrometástasis. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón (incluido el carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma pulmonar de células escamosas),
50 cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o cáncer de estómago (incluido el cáncer gastrointestinal), cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello, así como
55 linfoma de células B (incluido el linfoma no Hodgkin (LNH) folicular/de grado bajo; LNH linfocítico pequeño (LP); LNH folicular/de grado intermedio; LNH difuso de grado intermedio; LNH inmunoblástico de grado alto; LNH linfoblástico de grado alto; LNH de células pequeñas no escindidas de grado alto; LNH voluminoso; linfoma de células de manto; linfoma relacionado con el SIDA; y macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (LLC); leucemia linfocítica aguda (LLA); leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crónica; y el trastorno linfoproliferativo postrasplante (TLPT), así como la proliferación vascular anormal asociada con las
60 facomatosis, el edema (como el asociado con los tumores cerebrales) y el síndrome de Meigs.

Por "metástasis" se entiende la diseminación del <http://en.wikipedia.org/wiki/Cancer> cáncer desde su sitio primario a otras partes del cuerpo. Las células cancerosas se pueden separar de un tumor primario, penetrar en los vasos linfáticos y sanguíneos, circular a través de la circulación sanguínea y crecer en un foco a distancia (metastatizar) en los tejidos normales de cualquier parte del cuerpo. Las metástasis pueden ser locales o a

distancia. La metástasis es un proceso secuencial, dependiente de que las células tumorales se separen del tumor primario, se desplacen a través de la circulación sanguínea y se detengan en un sitio a distancia. En el nuevo sitio, las células establecen un riego sanguíneo y pueden crecer para formar una masa potencialmente mortal. Tanto las vías moleculares estimuladoras como las inhibitoras en la célula tumoral regulan este comportamiento, y las interacciones entre la célula tumoral y las células huésped en el sitio a distancia también son significativas.

Por "sujeto" se entiende un mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, un mamífero humano o no humano, tal como bovino, equino, canino, ovino o felino. Preferentemente, el sujeto es un ser humano. Los pacientes también son sujetos en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, "respuesta completa" o "RC" se refiere a la desaparición de todas las lesiones diana; "respuesta parcial" o "RP" se refiere a al menos una disminución de un 30 % en la suma de los diámetros más largos (SDML) de las lesiones diana, tomando como referencia la SDML de referencia; y "enfermedad estable" o "ES" se refiere a una contracción no suficiente de las lesiones diana para calificarla como RP o a un aumento no suficiente para calificarlo como EP, tomando como referencia la SDML más pequeña desde que comenzó el tratamiento.

Como se usa en el presente documento, "enfermedad progresiva" o "EP" se refiere a al menos un aumento de un 20 % en la SDML de las lesiones diana, tomando como referencia la SDML más pequeña registrada desde que comenzó el tratamiento o la presencia de una o más lesiones nuevas.

Como se usa en el presente documento, "supervivencia sin progresión" (SSP) se refiere a la cantidad de tiempo durante y después del tratamiento durante el cual la enfermedad que se está tratando (por ejemplo, cáncer) no empeora. La supervivencia sin progresión puede incluir la cantidad de tiempo en la que los pacientes han experimentado una respuesta completa o una respuesta parcial, así como la cantidad de tiempo en la que los pacientes han experimentado una enfermedad estable.

Como se usa en el presente documento, "tasa de respuesta global" (TRG) se refiere a la suma de la tasa de respuesta completa (RC) y la tasa de respuesta parcial (RP).

Como se usa en el presente documento, "supervivencia global" se refiere al porcentaje de individuos de un grupo que probablemente estén vivos después de un periodo de tiempo particular.

Un "*agente quimioterápico*" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclosfosfamida (CYTOXAN®); sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilmelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (en especial, bullatacina y bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluido el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; pemetrexed; callistatina; CC-1065 (incluidos sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluidos sus análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; TLK-286; CDP323, un inhibidor oral de alfa-4 integrina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, en especial, caliqueamicina gamma11 y caliqueamicina omega11 (véase, por ejemplo, Nicolaou *et al.*, *Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); dinemina, incluyendo dinemina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos antibióticos de cromoproteína enediina relacionados, aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azerasina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, inyección de doxorrubicina HCl en liposomas (DOXIL®) y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxiluridina, enocitabina, floxuridina e imatinib (un derivado de 2-fenilaminopirimidina), así como otros inhibidores de c-kit; antisuprarrenales tales como aminogluteftimida, mitotano, trilostano; refuerzo de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina bestrabucilo;

bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina diaziquna; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiaurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidracida; procarbazona; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoquina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquna; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (en especial, toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulación en nanopartículas de paclitaxel unido a albúmina (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®); oxaliplatino; leucovorina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores, así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como el CHOP, una abreviatura de un tratamiento combinado de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina.

También se incluyen en esta definición los agentes antihormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer, y que a menudo son tratamientos sistémicos o de todo el organismo. Pueden ser las propias hormonas. Los ejemplos incluyen antiestrógenos y moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno (EVISTA®), droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (FARESTON®); antiprogesteronas; reguladores por disminución de receptores de estrógenos (ERD); antagonistas de receptores de estrógenos tales como fulvestrant (FASLODEX®); agentes que funcionan suprimiendo o paralizando los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) tales como acetato de leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterelina; antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de la aromatasasa que inhiben la enzima aromatasasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol (MEGASE®), exemestano (AROMASIN®), formestano, fadrozol, vorozol (RIVISOR®), letrozol (FEMARA®) y anastrozol (ARIMIDEX®). Además, dicha definición de agentes quimioterápicos incluye bifosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®) o risedronato (ACTONEL®); así como troxacitabina (un análogo 1,3-dioxolano de nucleósido citosina); oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en vías de señalización implicadas en una proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas de genoterapia, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la 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 la tirosina cinasa); inhibidor de EGFR tal como erlotinib o cetuximab; un inhibidor anti-VEGF tal como bevacizumab; irinotecán; rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); lapatinib y lapatinib ditosilato (un inhibidor doble de molécula pequeña de ErbB-2 y EGFR de tirosina cinasa también conocido como GW572016); 17AAG (derivado de geldanamicina que es un veneno de la proteína de choque térmico (Hsp) 90) y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Como se usa en el presente documento, el término "*citocina*" se refiere genéricamente a proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares o tienen un efecto autocrino sobre las células que producen las proteínas. Los ejemplos de tales citocinas incluyen linfocinas, monocinas; interleucinas ("IL") tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17A-F, IL-18 a IL-29 (por ejemplo, IL-23), IL-31, incluyendo rIL-2 PROLEUKIN®; un factor de necrosis tumoral tal como TNF- α o TNF- β , TGF- β 1-3; y otros factores polipeptídicos que incluyen el factor inhibidor de la leucemia ("LIF"), el factor neurotrófico ciliar ("CNTF"), la citocina de tipo CNTF ("CLC"), la cardiotrofina ("CT") y el ligando de Kit ("KL").

Como se usa en el presente documento, el término "quimiocina" se refiere a factores solubles (por ejemplo, citocinas) que tienen la capacidad de inducir selectivamente la quimiotaxia y la activación de leucocitos. También desencadenan procesos de angiogénesis, inflamación, cicatrización y oncogénesis. Los ejemplos de quimiocinas incluyen IL-8, un homólogo humano de factor quimiotáctico de queratinocitos (KC) murino.

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/a", "o" y "el/la" incluyen las referencias plurales a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo.

La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) variaciones que están dirigidas a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, la descripción que se refiere a

"aproximadamente X" incluye la descripción de "X".

La frase "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un compuesto de la invención. Las sales ejemplares incluyen, pero no se limitan a, sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato "mesilato", etanosulfonato, bencenosulfonato, *p*-toluenosulfonato, pamoato (es decir, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)), sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio y potasio), sales de metales alcalinotérreos (por ejemplo, magnesio) y sales de amonio. Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ion acetato, un ion succinato u otro contraion. El contraion puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que establezca la carga en el compuesto original. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos en los que múltiples átomos cargados forman parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. Por lo tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

Si el compuesto es una base, la sal farmacéuticamente aceptable deseada se puede preparar mediante cualquier procedimiento adecuado disponible en la técnica, por ejemplo, el tratamiento de la base libre con un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido metanosulfónico, ácido fosfórico y similares, o con un ácido orgánico, tal como ácido acético, ácido maleico, ácido succínico, ácido mandélico, ácido fumárico, ácido malónico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido salicílico, un ácido piranosídico tal como ácido glucurónico o ácido galacturónico, un alfa hidroxiaácido tal como ácido cítrico o ácido tartárico, un aminoácido tal como ácido aspártico o ácido glutámico, un ácido aromático tal como ácido benzoico o ácido cinámico, un ácido sulfónico tal como ácido *p*-toluenosulfónico o ácido etanosulfónico o similares.

Si el compuesto es un ácido, la sal farmacéuticamente aceptable deseada se puede preparar mediante cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo, el tratamiento del ácido libre con una base inorgánica u orgánica, tal como una amina (primaria, secundaria o terciaria), un hidróxido de metal alcalino o hidróxido de metal alcalinotérreo o similares. Los ejemplos ilustrativos de sales adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sales orgánicas derivadas de aminoácidos tales como glicina y arginina, amoniaco, aminas primarias, secundarias y terciarias y aminas cíclicas tales como piperidina, morfolina y piperazina y sales inorgánicas derivadas de sodio, calcio, potasio, magnesio, manganeso, hierro, cobre, cinc, aluminio y litio.

La frase "farmacéuticamente aceptable" indica que la sustancia o composición debe ser química y/o toxicológicamente compatible con los otros ingredientes que comprende una formulación y/o con el mamífero al que se está tratando con la misma.

Se entiende que los aspectos y variaciones de la invención descrita en el presente documento incluyen "que consisten en" y/o "que consisten esencialmente en" aspectos y variaciones.

III. Procedimientos

Los procedimientos como se describen en el presente documento y los usos farmacéuticos de la presente invención pueden encontrar uso en el tratamiento de afecciones en las que se desea una inmunogenicidad potenciada, tal como una inmunogenicidad tumoral creciente para el tratamiento del cáncer. Se pueden tratar una variedad de cánceres o se puede retrasar su progresión.

En algunos modos de realización, el individuo tiene melanoma. El melanoma puede estar en estadio precoz o en estadio tardío. En algunos modos de realización, el individuo tiene cáncer colorrectal. El cáncer colorrectal puede estar en estadio precoz o en estadio tardío. En algunos modos de realización, el individuo tiene carcinoma de pulmón no microcítico. El carcinoma de pulmón no microcítico puede estar en estadio precoz o en estadio tardío. En algunos modos de realización, el individuo tiene cáncer de páncreas. El cáncer de páncreas puede estar en estadio precoz o en estadio tardío. En algunos modos de realización, el individuo tiene una neoplasia hemática. La neoplasia hemática puede estar en estadio precoz o en estadio tardío. En algunos modos de realización, el individuo tiene cáncer de ovario. El cáncer de ovario puede estar en estadio precoz o en estadio tardío. En algunos modos de realización, el individuo tiene cáncer de mama. El cáncer de mama puede estar en estadio precoz o en estadio tardío. En algunos modos de realización, el individuo tiene carcinoma de células renales. El carcinoma de células renales puede estar en estadio precoz o en estadio tardío.

En algunos modos de realización, el sujeto tratado es un ser humano.

El politerapia de la invención comprende la administración de un antagonista de unión al eje de PD-1 y oxaliplatino, leucovorina, 5-FU y un anticuerpo anti-VEGF antagonista. La invención proporciona una politerapia que comprende la administración de (I) un antagonista de unión al eje de PD-1, en el que dicho antagonista es

un anticuerpo anti-PD-L1 que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y una de cadena ligera, en la que

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

(i) la HVR-H1 es GFTFSDSWIH (SEQ ID NO: 5);

(ii) la HVR-H2 es AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:16);

(iii) la 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

(iv) HVR-L1 es RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:17);

(v) SASFLYS (SEQ ID NO:18);

(vi) QQYLYHPAT (SEQ ID NO:19),

y en el que dicho anticuerpo anti-PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 tanto a PD-1 como a B7-1, (II) un anticuerpo anti-VEGF antagonista y (III) oxaliplatino, leucovorina y 5-FU. El antagonista de unión al eje de PD-1 y el anticuerpo anti-VEGF se pueden administrar de cualquier manera adecuada conocida en la técnica. Por ejemplo, el antagonista de unión al eje de PD-1 y el antagonista de VEGF se pueden administrar secuencialmente (en diferentes momentos) o concurrentemente (al mismo tiempo).

En algunos modos de realización, los métodos de la invención pueden comprender además administrar un tratamiento adicional. El tratamiento adicional puede ser radioterapia, cirugía (por ejemplo, lumpectomía y mastectomía), quimioterapia, genoterapia, terapia de ADN, terapia antivírica, terapia de ARN, inmunoterapia, trasplante de médula ósea, nanoterapia, terapia con anticuerpos monoclonales o una combinación de lo anterior. El tratamiento adicional puede ser en forma de tratamiento adyuvante o neoadyuvante. En algunos modos de realización, el tratamiento adicional es la administración de un inhibidor enzimático de moléculas pequeñas o agente antimetastático. En algunos modos de realización, el tratamiento adicional es la administración de agentes limitantes de efectos secundarios (por ejemplo, agentes destinados a disminuir la aparición y/o la gravedad de los efectos secundarios del tratamiento, tales como agentes antieméticos, etc.). En algunos modos de realización, el tratamiento adicional es radioterapia. En algunos modos de realización, el tratamiento adicional es cirugía. En algunos modos de realización, el tratamiento adicional es una combinación de radioterapia y cirugía. El tratamiento adicional puede ser uno o más de los agentes quimioterápicos descritos anteriormente en el presente documento.

Cualquiera de los antagonistas de unión al eje de PD-1 y los antagonistas de VEGF descritos a continuación se pueden usar en los procedimientos divulgados en el presente documento.

Antagonistas de unión al eje de PD-1

En el presente documento se proporciona un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-1 en combinación con oxaliplatino, leucovorina y 5-FU y con la administración de un antagonista de VEGF. El antagonista de unión al eje de PD-1 es un antagonista de unión a PD-L1.

El antagonista de unión a PD-1 es una molécula que inhibe la unión de PD-L1 a PD-1 y B7-1. El antagonista puede ser un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno del mismo, una inmunoadhesina, una proteína de fusión u oligopéptido.

De acuerdo con la presente invención, el antagonista de unión a PD-L1 puede ser YW243.55.S70. El anticuerpo YW243.55.S70 (SEQ ID NO: 20) es un anti-PD-L1 descrito en el documento WO 2010/077634 A1. MDX-1106, también conocido como MDX-1106-04, ONO-4538 o BMS-936558, es un anticuerpo anti-PD-1 descrito en el documento WO2006/121168. Merck 3745, también conocido como MK-3475 o SCH-900475, es un anticuerpo anti-PD-1 descrito en el documento WO2009/114335. CT-011, también conocido como hBAT o hBAT-1, es un anticuerpo anti-PD-1 descrito en el documento WO2009/101611. AMP-224, también conocido como B7-DCIg, es un receptor soluble de fusión de PD-F2-Fc descrito en los documentos WO2010/027827 y WO2011/066342.

En la solicitud de patente PCT WO 2010/077634 A1 se describen ejemplos de anticuerpos anti-PD-L1 útiles para los usos farmacéuticos de la presente invención y procedimientos para llevar a cabo los mismos.

De acuerdo con la presente invención, el antagonista de unión al eje de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1 que

es capaz de inhibir la unión entre PD-L1 y PD-1 y entre PD-L1 y B7-1. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal. En un modo de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en fragmentos Fab, Fab'-SH, Fv, scFv o (Fab')₂. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo humanizado. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo humano.

Los anticuerpos anti-PD-L1 útiles en la presente invención, incluyendo composiciones que contienen dichos anticuerpos, tales como las descritos en el documento WO 2010/077634 A1, se pueden usar en combinación con oxaliplatino, leucovorina, 5-FU y con un antagonista de VEGF para tratar el cáncer.

En un modo de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 contiene un polipéptido de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en la que:

- (a) la secuencia de HVR-H1 es GFTFSX₁SWIH (SEQ ID NO:1);
- (b) la secuencia de HVR-H2 es AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG (SEQ ID NO:2);
- (c) la secuencia de HVR-H3 es RHWPGGFDY (SEQ ID NO:3);

en la que además: X₁ es D o G; X₂ es S o L; X₃ es T o S.

En un aspecto específico, X₁ es D; X₂ es S y X₃ es T. En otro aspecto, el polipéptido comprende además secuencias estructurales 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). Aún en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. En otro aspecto, las secuencias estructurales son la secuencia estructural consenso de subgrupo III de VH. En otro aspecto más, al menos una de las secuencias estructurales es la siguiente:

HC-FR1 es EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:4)

HC-FR2 es WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:5)

HC-FR3 es RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:6)

HC-FR4 es WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:7).

En otro aspecto más, el polipéptido de cadena pesada se combina además con una cadena ligera de región variable que comprende un HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, en la que:

- (a) la secuencia de HVR-L1 es RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A (SEQ ID NO:8);
- (b) la secuencia de HVR-L2 es SASX₉LX₁₀S (SEQ ID NO:9);
- (c) la secuencia de HVR-L3 es QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T (SEQ ID NO:10);

en la que además: X₄ es D o V; X₅ es V o I; X₆ es S o N; X₇ es A o F; X₈ es V o L; X₉ es F o T; X₁₀ es Y o A; X₁₁ es Y, G, F o S; X₁₂ es L, Y, F o W; X₁₃ es Y, N, A, T, G, F o I; X₁₄ es H, V, P, T o I; X₁₅ es A, W, R, P o T.

En otro aspecto más, X₄ es D; X₅ es V; X₆ es S; X₇ es A; X₈ es V; X₉ es F; X₁₀ es Y; X₁₁ es Y; X₁₂ es L; X₁₃ es Y; X₁₄ es H; X₁₅ es A. En otro aspecto más, la cadena ligera comprende además secuencias estructurales 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 otro aspecto más, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. En otro aspecto más, las secuencias estructurales son una secuencia estructural consenso de kappa I de VL.

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

LC-FR1 es DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTC (SEQ ID NO:11)

LC-FR2 es WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:12)

LC-FR3 es GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:13)

LC-FR4 es FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:14).

ES 2 742 379 T3

En otro modo de realización se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado o un fragmento de unión a antígeno que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y una de cadena ligera, en el que:

- 5 (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)
- 10 (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:
- 15 (i) la secuencia de HVR-L1 es RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A (SEQ ID NOs:8)
- (ii) la secuencia de HVR-L2 es SASX₉LX₁₀S (SEQ ID NOs:9) y
- (iii) la secuencia de HVR-L3 es QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T (SEQ ID NOs:10)
- 20

En la que además: X₁ es D o G; X₂ es S o L; X₃ es T o S; X₄ es D o V; X₅ es V o I; X₆ es S o N; X₇ es A o F; X₈ es V o L; X₉ es F o T; X₁₀ es Y o A; X₁₁ es Y, G, F o S; X₁₂ es L, Y, F o W; X₁₃ es Y, N, A, T, G, F o I; X₁₄ es H, V, P, T o I; X₁₅ es A, W, R, P o T.

- 25 En un aspecto específico, X₁ es D; X₂ es S y X₃ es T. En otro aspecto, X₄ es D; X₅ es V; X₆ es S; X₇ es A; X₈ es V; X₉ es F; X₁₀ es Y; X₁₁ es Y; X₁₂ es L; X₁₃ es Y; X₁₄ es H; X₁₅ es A. Aún en otro aspecto, X₁ es D; X₂ es S y X₃ es T, X₄ es D; X₅ es V; X₆ es S; X₇ es A; X₈ es V; X₉ es F; X₁₀ es Y; X₁₁ es Y; X₁₂ es L; X₁₃ es Y; X₁₄ es H y X₁₅ es A.

- 30 En otro aspecto, la región variable de cadena pesada comprende una o más secuencias estructurales 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 estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). En otro aspecto más, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. En otro aspecto más, las secuencias estructurales de la cadena pesada se derivan de una secuencia del subgrupo I, II o III de Kabat. En otro aspecto más, la secuencia estructural de la cadena pesada es una secuencia estructural consenso de subgrupo III de VH. En otro aspecto más, una o más de las secuencias estructurales de cadena pesada es la siguiente:
- 35

40 HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:4)

HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:5)

HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:6)

- 45 HC-FR4 WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:7).

En otro aspecto más, las secuencias estructurales de la cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo kappa I, II, III o IV de Kabat. En otro aspecto más, las secuencias estructurales de la cadena ligera son una secuencia estructural consenso de kappa I de VL. En otro aspecto más, una o más de las secuencias estructurales de cadena ligera es la siguiente:

50

LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:11)

LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:12)

- 55 LC-FR3 GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:13)

LC-FR4 FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:14).

- 60 En otro aspecto específico más, el anticuerpo comprende además una región constante humana o murina. En otro aspecto más, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. En otro aspecto específico más, la región constante humana es IgG1. En otro aspecto más, la región constante murina se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. En otro aspecto más, la

región constante murina es IgG2A. En otro aspecto específico más, el anticuerpo tiene una función efectora reducida o minimizada. En otro aspecto específico más, la función efectora minimizada es el resultado de una "mutación de Fc sin efector" o aglucosilación. En otro modo de realización más, la mutación de Fc sin efector es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

5 En otro modo de realización más se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y una de cadena ligera, en el que:

10 (a) la cadena pesada comprende además una secuencia de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con GFTFSDSWIH (SEQ ID NO:15), AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:16) y RHWPGGFDY (SEQ ID NO:3), respectivamente, o

15 (b) la cadena ligera comprende además una secuencia de HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:17), SASFLYS (SEQ ID NO:18) y QQYLYHPAT (SEQ ID NO:19), respectivamente.

20 En un aspecto específico, la identidad de secuencia es un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 %. En otro aspecto, la región variable de cadena pesada comprende una o más secuencias estructurales 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 estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Aún en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. En otro aspecto más, las secuencias estructurales de la cadena pesada se derivan de una secuencia del subgrupo I, II o III de Kabat. En otro aspecto más, la secuencia estructural de la cadena pesada es una secuencia estructural consenso de subgrupo III de VH. En otro aspecto más, una o más de las secuencias estructurales de cadena pesada es la siguiente:

HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:4)

30 HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:5)

HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:6)

35 HC-FR4 WGQGTLLVTVSA (SEQ ID NO:7).

40 En otro aspecto más, las secuencias estructurales de la cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo kappa I, II, III o IV de Kabat. En otro aspecto más, las secuencias estructurales de la cadena ligera son una secuencia estructural consenso de kappa I de VL. En otro aspecto más, una o más de las secuencias estructurales de cadena ligera es la siguiente:

LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:11)

LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:12)

45 LC-FR3 GVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:13)

LC-FR4 FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:14).

50 En otro aspecto específico más, el anticuerpo comprende además una región constante humana o murina. En otro aspecto más, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. En otro aspecto específico más, la región constante humana es IgG1. En otro aspecto más, la región constante murina se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. En otro aspecto más, la región constante murina es IgG2A. En otro aspecto específico más, el anticuerpo tiene una función efectora reducida o minimizada. En otro aspecto específico más, la función efectora minimizada es el resultado de una "mutación de Fc sin efector" o aglucosilación. En otro modo de realización más, la mutación de Fc sin efector es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

60 En otro modo de realización más se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y una de cadena ligera, en el que:

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWIS
 PYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPG GFDYWGQGLVTVSA
 (SEQ ID NO:20), o

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

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY SASF LYSGVPSRFSGSGSGTD
 FTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIK R (SEQ ID NO:21).

10 En un aspecto específico, la identidad de secuencia es un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 %. En otro aspecto, la región variable de cadena pesada comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), y las regiones variables de
 15 cadena ligera comprenden una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Aún en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. En otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena pesada se derivan de una secuencia del subgrupo I, II o III de Kabat. En otro aspecto más, la secuencia estructural de la cadena pesada es una secuencia estructural consenso de subgrupo III de VH. En otro aspecto
 20 más, una o más de las secuencias estructurales de cadena pesada es la siguiente:

HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:4)

HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:5)

HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:6)

HC-FR4 WGQGLVTVSA (SEQ ID NO:7).

30 En otro aspecto más, las secuencias estructurales de la cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo kappa I, II, III o IV de Kabat. En otro aspecto más, las secuencias estructurales de la cadena ligera son una secuencia estructural consenso de kappa I de VL. En otro aspecto más, una o más de las secuencias estructurales de cadena ligera es la siguiente:

35 LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (SEQ ID NO:11)

LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:12)

LC-FR3 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:13)

40 LC-FR4 FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:14)

En otro aspecto específico más, el anticuerpo comprende además una región constante humana o murina. En otro aspecto más, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. En otro aspecto específico más, la región constante humana es IgG1. En otro aspecto más, la región constante murina se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. En otro aspecto más, la región constante murina es IgG2A. En otro aspecto específico más, el anticuerpo tiene una función efectora reducida o minimizada. En otro aspecto específico más, la función efectora minimizada es el resultado de la producción en células procariotas. En otro aspecto específico más, la función efectora minimizada es el resultado
 50 de una "mutación de Fc sin efector" o aglucosilación. En otro modo de realización más, la mutación de Fc sin efector es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

En otro modo de realización más, la invención proporciona composiciones que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 descritos anteriormente en combinación con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
 55

En otro modo de realización más se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una secuencia de región variable de cadena ligera o una de cadena pesada de un anticuerpo anti-PD-L1, en el que:

60 (a) la cadena pesada comprende además una secuencia de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con GFTFSDSWIH (SEQ ID NO:15), AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:16) y RHWPGGFDY (SEQ ID NO:3), respectivamente, y

(b) la cadena ligera comprende además una secuencia de HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:17), SASFLYS (SEQ ID NO:18) y QQYLYHPAT (SEQ ID NO:19), respectivamente.

5 En un aspecto específico, la identidad de secuencia es un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 %. En un aspecto, la región variable de cadena pesada comprende una o más secuencias estructurales 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 estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Aún en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. En otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena pesada se derivan de una secuencia del subgrupo I, II o III de Kabat. En otro aspecto más, la secuencia estructural de la cadena pesada es una secuencia estructural consenso de subgrupo III de VH. En otro aspecto más, una o más de las secuencias estructurales de cadena pesada es la siguiente:

15 HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:4)

HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:5)

20 HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:6)

HC-FR4 WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:7).

25 En otro aspecto más, las secuencias estructurales de la cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo kappa I, II, III o IV de Kabat. En otro aspecto más, las secuencias estructurales de la cadena ligera son una secuencia estructural consenso de kappa I de VL. En otro aspecto más, una o más de las secuencias estructurales de cadena ligera es la siguiente:

30 LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:11)

LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:12)

LC-FR3 GVPSRFGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:13)

35 LC-FR4 FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:14).

En otro aspecto específico más, el anticuerpo comprende además una región constante humana o murina. En otro aspecto más, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. En otro aspecto específico más, la región constante humana es IgG1. En otro aspecto más, la región constante murina se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. En otro aspecto más, la región constante murina es IgG2A. En otro aspecto específico más, el anticuerpo tiene una función efectora reducida o minimizada. En otro aspecto específico más, la función efectora minimizada es el resultado de la producción en células procariontas. En otro aspecto específico más, la función efectora minimizada es el resultado de una "mutación de Fc sin efector" o aglucosilación. En otro aspecto más, la mutación de Fc sin efector es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

50 En otro aspecto más, el ácido nucleico comprende además un vector adecuado para la expresión del ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 descritos previamente. En otro aspecto específico más, el vector comprende además una célula huésped adecuada para la expresión del ácido nucleico. En otro aspecto específico más, la célula huésped es una célula eucariota o una célula procarionta. En otro aspecto específico más, la célula eucariota es una célula de mamífero, tal como la de ovario de hámster chino (CHO).

55 El anticuerpo anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo se puede preparar usando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante un procedimiento que comprende cultivar una célula huésped que contiene ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno descritos previamente en una forma adecuada para la expresión, en condiciones adecuadas para producir dicho anticuerpo o fragmento, y recuperar el anticuerpo o fragmento.

60 En otro modo de realización más, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se proporciona en el presente documento y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Antagonistas de VEGF

La invención proporciona procedimientos para tratar el cáncer o ralentizar la progresión del cáncer en un individuo, que comprenden administrar una cantidad eficaz de un antagonista de la vía de PD-1 y un antagonista de VEGF en combinación con oxaliplatino, leucovorina y 5-FU. Se pretende cualquier antagonista de VEGF conocido.

5

(i) Antígeno de VEGF

El antígeno de VEGF que se va a usar para la producción de anticuerpos puede ser, por ejemplo, la molécula VEGF₁₆₅, así como otras isoformas de VEGF o un fragmento de la misma que contenga el epítipo deseado. Otras formas de VEGF útiles para generar anticuerpos anti-VEGF de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica.

10

El VEGF humano se obtuvo al cribar primeramente una colección de ADNc preparada a partir de células humanas, usando ADNc de VEGF bovino como una sonda de hibridación. Leung *et al.* (1989) *Science*, 246:1306. Un ADNc identificado de este modo codifica una proteína de 165 aminoácidos con más del 95 % de homología con VEGF bovino; esta proteína de 165 aminoácidos se denomina típicamente VEGF humano (hVEGF) o VEGF₁₆₅. La actividad mitogénica de VEGF humano se confirmó expresando el ADNc de VEGF humano en células huésped de mamífero. Los medios condicionados por células transfectadas con el ADNc de VEGF humano promovieron la proliferación de células endoteliales capilares, mientras que las células de control no lo hicieron. Leung *et al.* (1989) *Science, supra*.

15

20

Aunque un factor de crecimiento de células endoteliales vasculares se podría aislar y purificar de fuentes naturales para un uso terapéutico posterior, las concentraciones relativamente bajas de la proteína en las células foliculares y el alto costo, tanto en términos de esfuerzo como de gasto, de recuperar el VEGF demostraron ser comercialmente no válidos. En consecuencia, se realizaron nuevos esfuerzos para clonar y expresar VEGF a través de técnicas de ADN recombinante. (Véase, por ejemplo, Ferrara, *Laboratory Investigation* 72: 615-618 (1995), y las referencias allí citadas).

25

El VEGF se expresa en una variedad de tejidos como múltiples formas homodiméricas (121, 145, 165, 189 y 206 aminoácidos por monómero) que resultan de un empalme de ARN alternativo. VEGF₁₂₁ es un mitógeno soluble que no se une a la heparina; las formas más largas de VEGF se unen a la heparina con una afinidad progresivamente más alta. Las formas de unión a la heparina de VEGF se pueden escindir en el extremo carboxiterminal por plasmina para liberar una forma o formas difusibles de VEGF. La secuenciación de aminoácidos del péptido carboxiterminal identificado después de la escisión con plasmina es Arg₁₁₀-Ala₁₁₁. La proteína "núcleo" aminoterminal, VEGF (1-110) aislada como homodímero, se une a los anticuerpos monoclonales neutralizantes (tales como los anticuerpos denominados 4.6.1 y 3.2E3.1.1) y las formas solubles de los receptores de VEGF con afinidad similar en comparación con el homodímero VEGF₁₆₅ intacto.

30

35

También se han identificado varias moléculas relacionadas estructuralmente con VEGF, incluyendo el factor de crecimiento de la placenta (PlGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E. Ferrara y Davis-Smyth (1987) *Endocr. Rev.*, *supra*; Ogawa *et al. J. Biological Chem.* 273: 31273-31281 (1998); Meyer *et al. EMBO J.*, 18: 363-374 (1999). Una tirosina cinasa receptora, Flt-4 (VEGFR-3), ha sido identificada como el receptor para VEGF-C y VEGF-D. Joukov *et al. EMBO. J.* 15: 1751 (1996); Lee *et al. Proc. Natl Acad Sci. USA* 93: 1988-1992 (1996); Achen *et al. (1998) Proc. Natl Acad Sci. USA* 95:548-553. Se ha demostrado que VEGF-C está involucrado en la regulación de la angiogénesis linfática. Jeltsch *et al. Science* 276:1423-1425(1997).

40

45

Se han identificado dos receptores de VEGF, Flt-1 (también llamado VEGFR-1) y KDR (también llamado VEGFR-2). Shibuya *et al.* (1990) *Oncogene* 8:519-527; de Vries *et al.* (1992) *Science* 255:989-991; Terman *et al.* (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187:1579-1586. Se ha demostrado que la neuropilina-1 es un receptor selectivo de VEGF, capaz de unirse a las isoformas de VEGF de unión a heparina (Soker *et al.* (1998) *Cell* 92:735-45). Tanto Flt-1 como KDR pertenecen a la familia de las tirosina cinasas receptoras (RTK). Las RTK comprenden una gran familia de receptores transmembrana con diversas actividades biológicas. En la actualidad, se han identificado al menos diecinueve (19) subfamilias de RTK distintas. La familia de tirosina cinasas receptoras (RTK) incluye receptores que son cruciales para el crecimiento y diferenciación de una variedad de tipos de células (Yarden y Ullrich (1988) *Ann. Rev. Biochem.* 57:433-478; Ullrich y Schlessinger (1990) *Cell* 61:243-254). La función intrínseca de las RTK se activa con la unión del ligando, lo que resulta en la fosforilación del receptor y sustratos celulares múltiples, y posteriormente en una variedad de respuestas celulares (Ullrich y Schlessinger (1990) *Cell* 61:203-212). Por lo tanto, la transducción de señales mediada por tirosina cinasas receptoras se inicia mediante la interacción extracelular con un factor de crecimiento específico (ligando), seguido típicamente por la dimerización del receptor, la estimulación de la actividad de la proteína tirosina cinasa intrínseca y la trans-fosforilación del receptor. Los sitios de unión se crean de este modo para las moléculas de transducción de señales intracelulares y conducen a la formación de complejos con un espectro de moléculas de señalización citoplásmica que facilitan la respuesta celular apropiada (por ejemplo, división celular, diferenciación, efectos metabólicos, cambios en el microentorno extracelular); véase Schlessinger y Ullrich (1992) *Neuron* 9:1-20. Estructuralmente, tanto Flt-1 como KDR tienen siete dominios similares a inmunoglobulinas en el dominio extracelular, una sola región transmembrana y una secuencia consenso de

50

55

60

65

tirosina cinasa que está interrumpida por un dominio de inserción de cinasa. Matthews *et al.* (1991) *Proc. Natl Acad Sci. USA* 88:9026-9030; Terman *et al.* (1991) *Oncogene* 6:1677-1683.

(ii) Anticuerpos anti-VEGF

Los anticuerpos anti-VEGF que son útiles en los usos farmacéuticos de la invención incluyen cualquier anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se una con suficiente afinidad y especificidad a VEGF y pueda reducir o inhibir la actividad biológica de VEGF. Un anticuerpo anti-VEGF normalmente no se unirá a otros homólogos de VEGF, tales como VEGF-B o VEGF-C, ni a otros factores de crecimiento tales como PIGF, PDGF o bFGF.

En determinados modos de realización de la invención, los anticuerpos anti-VEGF incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo monoclonal que se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal anti-VEGF A4.6.1 producido por el hibridoma ATCC HB 10709; un anticuerpo monoclonal anti-VEGF humanizado recombinante generado de acuerdo con Presta *et al.* (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599. En un modo de realización, el anticuerpo anti-VEGF es "Bevacizumab (BV)", también conocido como "rhuMAb VEGF" o "AVASTIN®". Comprende regiones estructurales de IgG1 humana mutadas y regiones determinantes de complementariedad de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal anti-hVEGF murino A.4.6.1 que bloquea la unión de VEGF humano a sus receptores. Aproximadamente el 93 % de la secuencia de aminoácidos de bevacizumab, incluyendo la mayoría de las regiones estructurales, se deriva de la IgG1 humana, y aproximadamente el 7 % de la secuencia se deriva del anticuerpo murino A4.6.1.

Bevacizumab y otros anticuerpos anti-VEGF humanizados se describen adicionalmente en la patente de EE. UU. n.º 6.884.879 expedida el 26 de febrero de 2005. Los anticuerpos adicionales incluyen los anticuerpos de las series G6 o B20 (por ejemplo, G6-31, B20-4.1), como se describe en la publicación PCT n.º WO2005/012359, la publicación PCT n.º WO2005/044853 y la solicitud de patente de EE. UU. 60/991.302, el contenido de estas solicitudes de patente se incorporan expresamente en el presente documento como referencia. Para anticuerpos adicionales, véanse las patentes de EE. UU. n.º 7.060.269, 6.582.959, 6.703.020; 6.054.297; los documentos WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1; las publicaciones de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2006009360, 20050186208, 20030206899, 20030190317, 20030203409 y 20050112126; y Popkov *et al.*, *Journal of Immunological Methods* 288:149-164 (2004). Otros anticuerpos incluyen aquellos que se unen a un epítipo funcional en el VEGF humano que comprende los residuos F17, M18, D19, Y21, Y25, Q89, I91, K101, E103 y C104 o, de forma alternativa, que comprenden los residuos F17, Y21, Q22, Y25, D63, I83 y Q89.

En un modo de realización de la invención, el anticuerpo anti-VEGF comprende una región variable de cadena pesada que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGV
INTYTGPEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP
HYYGSSHWFYF DVWGQGTLVT VSS (SEQ ID NO:22).

y una región variable de cadena ligera que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCSASQDIS NYLNWYQQKPKAPKVLIIYF
TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ

GTKVEIKR (SEQ ID NO:23).

En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-VEGF comprende una CDRH1 que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: GYTFTNYGMN (SEQ ID NO:24), una CDRH2 que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: WINTYTGPEPTYAADFKR (SEQ ID NO:25), una CDRH3 que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: YPHYYGSSHWFYFDV (SEQ ID NO:26), una CDRL1 que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: SASQDISNYLN (SEQ ID NO:27), una CDRL2 que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: FTSSLHS (SEQ ID NO:28) y una CDRL3 que comprende la secuencia de aminoácidos: QQYSTVPWT (SEQ ID NO:29).

Un "anticuerpo de la serie G6", de acuerdo con la presente invención, es un anticuerpo anti-VEGF que se deriva de una secuencia de un anticuerpo G6 o un anticuerpo derivado de G6 de acuerdo con una cualquiera de las figuras 7, 24-26 y 34-35 de la publicación de PCT n.º WO2005/012359, cuya divulgación completa se incorpora expresamente en el presente documento como referencia. Véase también la publicación de PCT n.º WO2005/044853, cuya divulgación completa se incorpora expresamente en el presente documento como referencia. En un modo de realización, el anticuerpo de la serie G6 se une a un epítipo funcional en VEGF humano que comprende los residuos F17, Y21, Q22, Y25, D63, I83 y Q89.

Un "anticuerpo de la serie B20" de acuerdo con la presente invención es un anticuerpo anti-VEGF que se deriva de una secuencia del anticuerpo B20 o un anticuerpo derivado de B20 de acuerdo con una cualquiera de las figuras 27-29 de la publicación de PCT n.º WO2005/012359, cuya divulgación completa se incorpora expresamente en el presente documento como referencia. Véase también la publicación de PCT n.º

5 WO2005/044853 y la solicitud de patente de EE. UU. 60/991.302, el contenido de estas solicitudes de patente se incorpora expresamente en el presente documento como referencia. En un modo de realización, el anticuerpo de la serie B20 se une a un epítipo funcional en VEGF humano que comprende los residuos F17, M18, D19, Y21, Y25, Q89, I91, K101, E103 y C104.

10 Un "epítipo funcional" de acuerdo con la presente invención se refiere a residuos de aminoácidos de un antígeno que contribuyen energéticamente a la unión de un anticuerpo. La mutación de cualquiera de los residuos del antígeno que contribuyen energéticamente (por ejemplo, la mutación del VEGF natural por la alanina o mutación homóloga) interrumpirá la unión del anticuerpo de modo que la proporción de afinidad relativa (IC50 de VEGF mutante/ IC50 de VEGF natural) del anticuerpo será mayor que 5 (véase el ejemplo 2 del documento

15 WO2005/012359). En un modo de realización, la proporción de afinidad relativa se determina mediante ELISA con presentación en fagos de unión en solución. En resumen, las inmunoplasmas Maxisorp de 96 pocillos (NUNC) se recubren durante la noche a 4 °C con una forma Fab del anticuerpo que se va a ensayar a una concentración de 2 µg/ml en PBS y se bloquean con PBS, BSA al 0,5 % y Tween20 al 0,05 % (PBT) durante 2 h a temperatura ambiente. Las diluciones en serie de fagos que muestran mutantes en el punto de alanina de hVEGF (residuos

20 8-109 de la forma) o hVEGF natural (8-109) en PBT se incuban primero en las placas recubiertas con Fab durante 15 minutos a temperatura ambiente, y las placas se lavan con PBS, Tween20 al 0,05 % (PBST). El fago unido se detecta con un conjugado de anticuerpo monoclonal anti-M13 y peroxidasa de rábano picante (Amersham Pharmacia) diluido 1:5000 en PBT, se revela con sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Kirkegaard & Perry Labs, Gaithersburg, MD) durante aproximadamente 5 minutos, se inactiva con H3PO4 1,0 M

25 y se lee espectrofotométricamente a 450 nm. La proporción de los valores de IC50 (IC50,ala/IC50,wt) representa el factor de reducción en la afinidad de unión (la afinidad de unión relativa).

(iii) Moléculas receptoras de VEGF

30 Los dos receptores de VEGF mejor caracterizados son VEGFR1 (también conocido como Flt-1) y VEGFR2 (también conocido como KDR y FLK-1 para el homólogo murino). La especificidad de cada receptor para cada miembro de la familia de VEGF varía, pero VEGF-A se une tanto a Flt-1 como a KDR. El receptor Flt-1 de longitud completa incluye un dominio extracelular que tiene siete dominios Ig, un dominio transmembrana y un dominio intracelular con actividad tirosina cinasa. El dominio extracelular está involucrado en la unión de VEGF y

35 el dominio intracelular está involucrado en la transducción de señales.

Las moléculas receptoras de VEGF, o fragmentos de las mismas, que se unen específicamente a VEGF se pueden usar en los procedimientos de la invención para unirse y secuestrar la proteína VEGF, impidiendo así su señalización. En determinados modos de realización, la molécula receptora de VEGF, o su fragmento de unión a

40 VEGF, es una forma soluble, tal como sFlt-1. Una forma soluble del receptor ejerce un efecto inhibitor sobre la actividad biológica de la proteína VEGF al unirse a VEGF, evitando de este modo que se una a sus receptores naturales presentes en la superficie de las células diana. También se incluyen las proteínas de fusión del receptor de VEGF, cuyos ejemplos se describen a continuación.

45 Una proteína receptora de VEGF quimérica es una molécula receptora que tiene secuencias de aminoácidos derivadas de al menos dos proteínas diferentes, al menos una de las cuales es una proteína receptora de VEGF (por ejemplo, el receptor flt-1 o KDR), que es capaz de unirse a e inhibir la actividad biológica del VEGF. En determinados modos de realización, las proteínas receptoras de VEGF quiméricas de la invención consisten en secuencias de aminoácidos derivadas de solo dos moléculas receptoras de VEGF diferentes; sin embargo, las

50 secuencias de aminoácidos que comprenden uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o los siete dominios similares a Ig de la región de unión al ligando extracelular del receptor flt-1 y/o KDR se pueden vincular a secuencias de aminoácidos de otras proteínas no relacionadas, por ejemplo, secuencias de inmunoglobulina. Otras secuencias de aminoácidos en las que se combinan los dominios similares a Ig serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Los ejemplos de proteínas receptoras de VEGF quiméricas incluyen, por ejemplo, Flt-1/Fc soluble,

55 KDR/Fc, o Flt-1/KDR/Fc (también conocido como VEGF Trap o bloqueador de VEGF). (Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud PCT n.º WO97/44453).

Una proteína receptora de VEGF soluble o proteínas receptoras de VEGF quiméricas de la invención incluyen proteínas receptoras de VEGF que no están fijadas a la superficie de las células a través de un dominio transmembrana. Como tales, las formas solubles del receptor de VEGF, incluyendo las proteínas receptoras quiméricas, aunque son capaces de unirse a e inactivar el VEGF, no comprenden un dominio transmembrana y, por tanto, en general no se asocian con la membrana celular de las células en las que se expresa la molécula.

IV. Kits

65 Se divulga en el presente documento un kit que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1 y/o un

antagonista de VEGF para tratar o retrasar la progresión de un cáncer en un individuo o para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer. El kit puede comprender un antagonista de unión al eje de PD-1 y un prospecto que comprende instrucciones para usar el antagonista de unión al eje de PD-1 en combinación con oxaliplatino, leucovorina, 5-FU con o sin un antagonista de VEGF para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo, o potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer. El kit puede comprender oxaliplatino, leucovorina, 5-FU con o sin un antagonista de VEGF y un prospecto que comprende instrucciones para usar el oxaliplatino, leucovorina, 5-FU con o sin un antagonista de VEGF en combinación con un antagonista de unión al eje de PD-1 para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo o para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer. En algunos modos de realización, el kit comprende un antagonista de unión al eje de PD-1 y oxaliplatino, leucovorina, 5-FU con o sin un antagonista de VEGF, y un prospecto que comprende instrucciones para usar el antagonista de unión al eje de PD-1 y el oxaliplatino, leucovorina, 5-FU con o sin un antagonista de VEGF para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo o para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer. Cualquiera de los antagonistas de unión al eje de PD-1 y/o antagonistas de VEGF descritos en el presente documento se puede incluir en los kits.

EJEMPLOS

La invención se puede entender adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y que no pretenden limitar el alcance.

Ejemplo 1: FOLFOX con o sin anticuerpo anti-VEGF potenció la actividad antitumoral de anti-PD-L1

Para determinar si FOLFOX (oxaliplatino, leucovorina y 5-fluorouracilo) con o sin anticuerpo anti-VEGF potenció la actividad antitumoral de anti-PD-L1, modelos de ratón de cáncer colorrectal se trataron con las politerapias. En resumen, a ratones C57BL/6 hembra se les inocularon por vía subcutánea en la región torácica unilateral 100.000 células colorrectales murinas MC38 en 100 microlitros de HBSS:matrigel. Cuando los ratones alcanzaron un volumen tumoral medio de 220 mm³, se asignaron al azar a uno de los grupos de tratamiento descritos a continuación, en el día experimental 0. El tratamiento se inició el día experimental 1. Los ratones se pesaron y los tumores se midieron 2-3 veces por semana durante la duración del estudio.

Grupos experimentales:

- 1) Control (anticuerpo de control de isotipo (anticuerpo anti-gp120)), 10 mg/kg ip, 100 microlitros, administrados tres veces por semana durante tres semanas, n=10
- 2) Anticuerpo anti-PD-L1, 10 mg/kg ip, 100 microlitros, administrado tres veces por semana durante tres semanas, n=10
- 3) FOLFOX (ver más abajo), administrado una vez por semana durante dos semanas, n=10
- 4) FOLFOX (ver más abajo), administrado una vez por semana durante dos semanas + anticuerpo anti-PD-L1, 10 mg/kg ip, 100 microlitros, administrado tres veces por semana durante tres semanas, n=10
- 5) FOLFOX (ver más abajo), administrado una vez por semana durante dos semanas + anticuerpo anti-VEGF, 5 mg/kg ip, 100 microlitros, administrado dos veces por semana durante tres semanas, n=10
- 6) FOLFOX (ver más abajo), administrado una vez a la semana durante dos semanas + anticuerpo anti-VEGF, 5 mg/kg ip, 100 microlitros, administrado dos veces por semana durante tres semanas + anticuerpo anti-PD-L1, 10 mg/kg ip, 100 microlitros, administrados tres veces por semana durante tres semanas, n=10

ip = vía intraperitoneal

sc = vía subcutánea

Para estos estudios, la dosificación de FOLFOX se llevó a cabo de la siguiente manera: el día experimental 1 y el día experimental 8, a los ratones se les administró oxaliplatino, 5 mg/kg ip en 50 microlitros de agua inmediatamente seguido de leucovorina, 100 mg/kg ip en 250 microlitros de agua (administrada en tiempo = 0 horas) y 5-FU, 25 mg/kg ip inmediatamente seguido de 5-FU, 25 mg/kg sc (administrados en tiempo = 2 horas). El anticuerpo anti-PD-L1 y el anticuerpo anti-gp120 se dosificaron en los días experimentales 1, 3, 5, 8, 10, 12, 15, 17 y 19 (administrados en tiempo = 4 horas). El anticuerpo anti-VEGF se dosificó en los días experimentales 1, 4, 8, 11, 15, 18 (administrado en tiempo = 6 horas).

Se hizo un seguimiento de los ratones para determinar el crecimiento tumoral y los cambios de peso corporal. Los volúmenes de tumores se midieron usando calibradores UltraCal-IV (Modelo 54-10-111; Fred V. Fowler Company; Newton, MA). La siguiente fórmula se utilizó para calcular el volumen del tumor:

$$5 \quad \text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = (\text{Longitud} \times \text{Anchura}^2) \times 0,5$$

Las medidas de longitud y anchura eran perpendiculares entre sí. El peso corporal de los animales se midió usando una báscula Adventura Pro AV812 (Ohaus Corporation; Pine Brook, NJ). El porcentaje de cambio de peso corporal se calculó usando la siguiente fórmula:

$$10 \quad \text{Cambio de peso corporal (\%)} = [(\text{Peso}_{\text{día nuevo}} - \text{Peso}_{\text{día 0}}) / \text{Peso}_{\text{día 0}}] \times 100$$

Los datos se analizaron usando R, versión 2.9.2 (R Development Core Team 2008; R Foundation for Statistical Computing; Viena, Austria) y los modelos mixtos se ajustaron a R usando el paquete nlme, versión 3.1-96 (Pinheiro *et al.* 2009). La representación de los datos se realizó en Prism, versión 5.0b para Mac (GraphPad Software, Inc.; La Jolla, CA).

Se usó un enfoque de modelado mixto para analizar la medición repetida de volúmenes tumorales de los mismos animales a lo largo del tiempo (Pinheiro y Bates 2000). Este enfoque aborda las mediciones repetidas y los abandonos moderados antes de que finalizara el estudio por motivos estadísticamente clasificables como ausentes de manera aleatoria (AMA). Los cambios de efectos fijos en $\log_2(\text{volumen})$ por tiempo y dosis se modelan como la suma de los efectos principales y la interacción de una base de splines de regresión cúbica natural en el tiempo con una base de natural de splines autodeterminada en la dosis. Se asumió que las intersecciones y las tasas de crecimiento (pendientes) varían aleatoriamente por animal. La inhibición del crecimiento tumoral como porcentaje del grupo tratado con control (% ICT) se calculó como el porcentaje del área bajo la curva (ABC) ajustada para el grupo de tratamiento respectivo por día en relación con el control mientras que los ratones tratados con control todavía estaban en el estudio, usando la siguiente fórmula:

$$30 \quad \% \text{ ICT} = 100 \times (1 - \text{ABC}_{\text{dosis}} / \text{ABC}_{\text{vehículos}})$$

Para estos estudios, la respuesta completa (RC) se definió como un animal individual cuyo volumen tumoral cayó por debajo del límite de detección (LDD) en cualquier momento durante el estudio. La respuesta parcial (RP) se definió como un animal individual cuyo volumen tumoral disminuyó en un 50 % de su volumen tumoral inicial en cualquier momento durante el estudio. La tasa de respuesta global (TRG) se definió como la suma de las respuestas completas y parciales. El tiempo hasta la progresión 5X (THP5X) se definió como el tiempo en días para que el volumen tumoral ajustado de un grupo (basado en el análisis de modelado mixto descrito anteriormente) superara 5 veces el volumen inicial, redondeado al medio día más cercano y presentado como el THP5X para ese grupo. El análisis lineal de efectos mixtos también se empleó para analizar la medición repetida de los cambios de peso corporal en los mismos animales a lo largo del tiempo.

El bloqueo del eje de PD-1 usando el anticuerpo anti-PD-L1 fue eficaz como tratamiento de agente único para prevenir el crecimiento tumoral. El tratamiento combinado de anticuerpos anti-PD-L1 con oxaliplatino, leucovorina y 5-FU (FOLFOX) inhibió significativamente el crecimiento tumoral, lo que indica que esta combinación de quimioterapia potenció la actividad antitumoral de los anticuerpos anti-PD-L1 (figura 1). La adición de anti-VEGF a esta politerapia mejoró aún más esta actividad antitumoral y también la durabilidad de la respuesta antitumoral incluso después de la interrupción del tratamiento (figura 4).

Ejemplo 2: Estudio de fase 1b de MPDL3280A con bevacizumab con o sin FOLFOX-6 modificado

El objetivo principal del estudio es evaluar la seguridad, la farmacología y la eficacia preliminar de MPDL3280A administrado con bevacizumab (grupo A) y con bevacizumab + FOLFOX (específicamente, FOLFOX-6 modificado, o mFOLFOX-6; grupo B) en pacientes con tumores sólidos, incluyendo el cáncer colorrectal metastásico (CCRm). El grupo A evaluará MPDL3280A a 10 mg/kg (o un nivel de dosis seleccionado que no exceda el MTD o MAD de agente único) con bevacizumab (15 mg/kg) en una pauta cada 3 semanas (c3s) durante hasta un año. Los pacientes que no hayan recibido oxaliplatino por enfermedad metastásica se inscribirán en el grupo B para recibir MPDL3280A con bevacizumab y FOLFOX en una pauta cada 2 semanas (c2s). El régimen de mFOLFOX-6 consiste en lo siguiente: oxaliplatino (85 mg/m²) administrado por vía intravenosa (IV) simultáneamente con leucovorina (400 mg/m²) administrado por vía intravenosa durante aproximadamente 120 minutos, seguido de 5-FU (400 mg/m²) administrado como un bolo intravenoso, seguido de 2400 mg/m² administrados por infusión intravenosa continua a lo largo de 46 horas. Se administrará oxaliplatino durante hasta ocho ciclos. El tratamiento se puede continuar durante hasta un año.

ES 2 742 379 T3

Ala Trp Ile Xaa Pro Tyr Gly Gly Ser Xaa Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly

5 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 3
 Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr
 1 5

15 <210> 4
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

20 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

25 <210> 5
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 1 5 10

30 <210> 6
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 6
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

40 <210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 1 5 10

45 <210> 8
 <211> 11
 <212> PRT

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 10 <223> Tyr, Gly, Phe o Ser

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 15 <223> Leu, Tyr, Phe o Trp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 20 <223> Tyr, Asn, Ala, Thr, Gly, Phe o Ile

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 25 <223> His, Val, Pro, Thr o Ile

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 30 <223> Ala, Trp, Arg, Pro o Thr

<220>
 <223> véase la memoria descriptiva según ha sido solicitada para una descripción detallada de las sustituciones y los modos de realización preferentes

35 <400> 10
Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr
 1 5

40 <210> 11
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 11
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

50 <210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

55 <210> 13
 <211> 32
 <212> PRT

ES 2 742 379 T3

<213> Homo sapiens

<400> 13

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

5

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 14
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

15

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

20

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 15
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His
1 5 10

25

<210> 16
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 16
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

35

<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 17
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

45

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 18
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

5 <210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 19
Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr
 1 5

15 <210> 20
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 20
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
 20 25 30

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

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

25 **Leu Val Thr Val Ser Ala**
 115

<210> 21
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

35 <400> 21

ES 2 742 379 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

5 <210> 22
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 22
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15 <210> 23
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 742 379 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

5

<400> 23

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 24

<211> 10

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15

<400> 24

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
1 5 10

<210> 25

20 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 25

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg

30 <210> 26

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

ES 2 742 379 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 26
Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

5 <210> 27
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 27
Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10

15 <210> 28
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 28
Phe Thr Ser Ser Leu His Ser
 1 5

30 <210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 29
Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr
 1 5

40 <210> 30
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

45 **Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser**
 20 25

50 <210> 31
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 1 5 10

55 <210> 32

ES 2 742 379 T3

<211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 32
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 33
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 33
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 1 5 10

15 <210> 34
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 34
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

25 <210> 35
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 35
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

35 <210> 36
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

40 <210> 37
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 37
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

REIVINDICACIONES

5 1. Un anticuerpo anti-PD-L1 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

10 (i) la HVR-H1 es GFTFSDSWIH (SEQ ID NO:15);

(ii) la HVR-H2 es AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:16);

(iii) la HVR-H3 es RHWPGGFDY (SEC ID NO:3); y

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

(iv) HVR-L1 es RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:17);

20 (v) SASFLYS (SEQ ID NO:18);

(vi) QQYLYHPAT (SEQ ID NO:19),

y en el que dicho anticuerpo anti-PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 tanto a PD-1 como a B7-1,

25 para su uso en combinación con oxaliplatino, leucovorina, 5-FU y un anticuerpo anti-VEGF antagonista para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo, en el que el cáncer es melanoma, cáncer colorrectal, carcinoma de pulmón no microcítico, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de páncreas o carcinoma de células renales.

30 2. El anticuerpo anti-PD-L1 para su uso de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo anti-PD-L1 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21.

35 3. El anticuerpo anti-PD-L1 para su uso de la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo anti-PD-L1 es YW243.55.S70.

4. El anticuerpo anti-PD-L1 para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal.

40 5. El anticuerpo anti-PD-L1 para su uso de una cualquiera las reivindicaciones 1-4, en el que el anticuerpo anti-PD-L1 es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en fragmentos Fab, Fab'-SH, Fv, scFv y (Fab')₂.

45 6. El anticuerpo anti-PD-L1 para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo humanizado.

7. El anticuerpo anti-PD-L1 para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo humano.

50 8. El anticuerpo anti-PD-L1 para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el anticuerpo anti-VEGF antagonista es un anticuerpo humanizado.

9. El anticuerpo anti-PD-L1 para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el anticuerpo anti-VEGF antagonista es bevacizumab.

55 10. El anticuerpo anti-PD-L1 para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el anticuerpo anti-VEGF antagonista tiene una región variable de cadena pesada que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWRQA PGKGLEWVGW

60 INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP
HYYGSSHWFYF DVWGQGTLLVT VSS (SEQ ID NO:22)

y una región variable de cadena ligera que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIIYF
TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTKVEIKR
(SEQ ID NO:23).

- 5
11. El anticuerpo anti-PD-L1 para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el tratamiento da como resultado una respuesta sostenida en el individuo después de la interrupción del tratamiento.
 12. El anticuerpo anti-PD-L1 para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el sujeto tiene cáncer colorrectal.

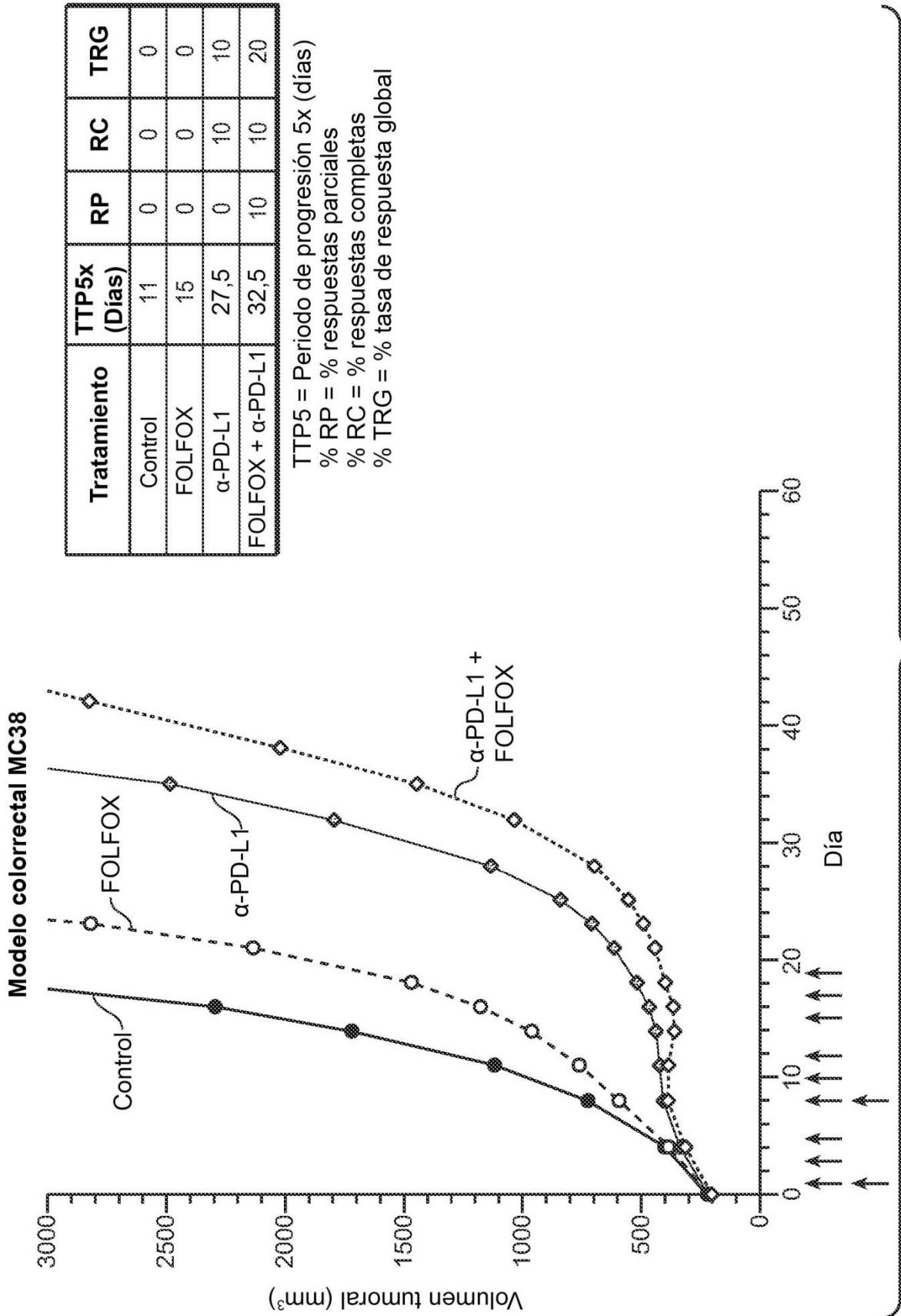


FIG. 1

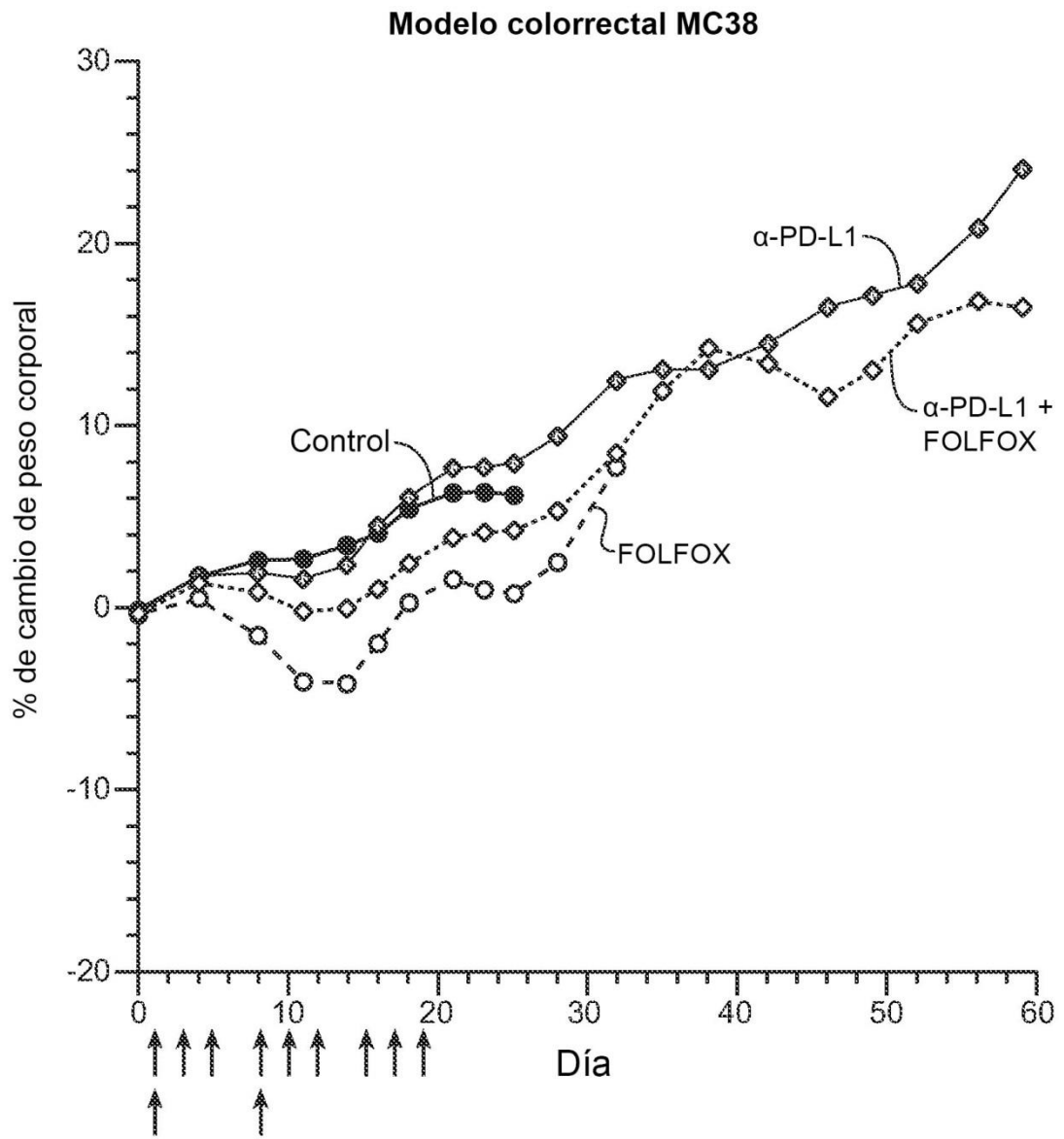
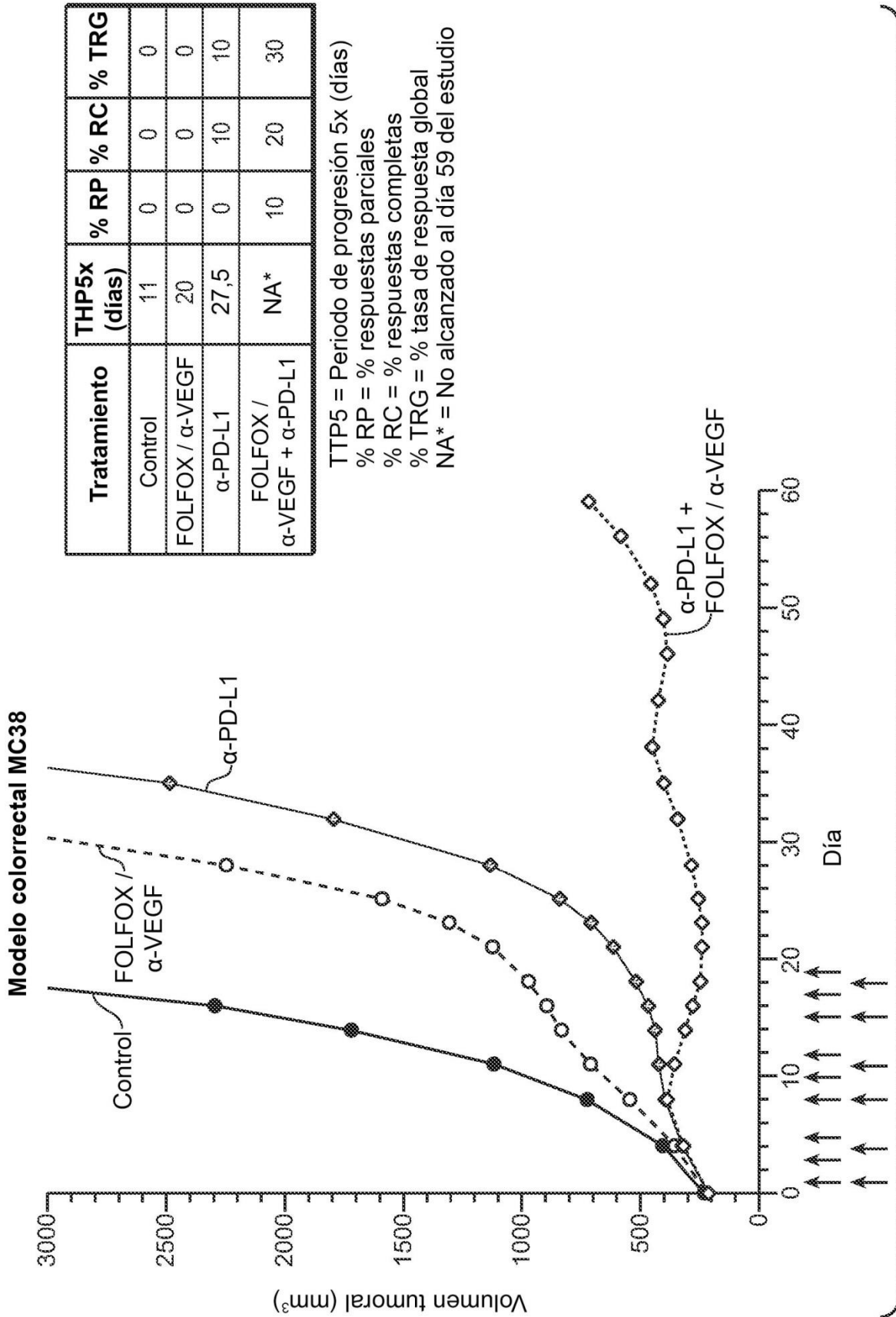


FIG. 2



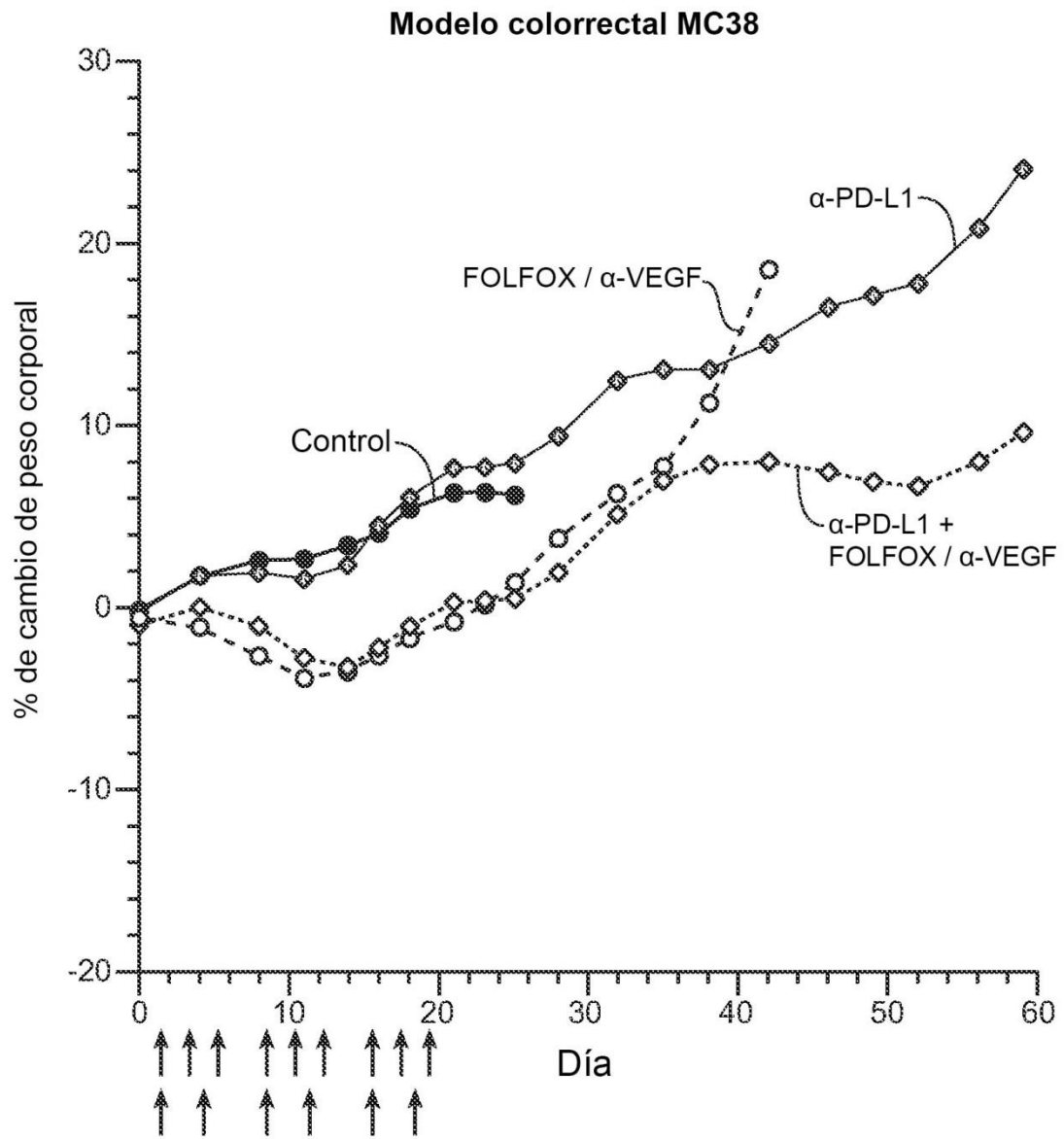


FIG. 4