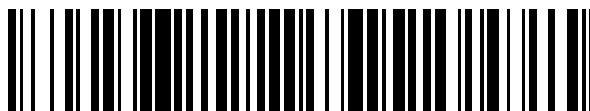


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 360**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.05.2015 PCT/EP2015/061921**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2015 WO15181342**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2015 E 15725043 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 3149042**

54 Título: **Anticuerpos contra PD-L1 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

29.05.2014 US 201462004572 P
28.10.2014 US 201462069420 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
08.04.2020

73 Titular/es:

SPRING BIOSCIENCE CORPORATION (100.0%)
4300 Hacienda Drive
Pleasanton, CA 94588, US

72 Inventor/es:

ZHU, YIFEI;
LIAO, ZHIMING y
COUTO, FERNANDO

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 753 360 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra PD-L1 y usos de los mismos

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 Esta divulgación se refiere a anticuerpos contra PD-L1 y a procedimientos para usar los mismos para detectar polipéptidos PD-L1 en una muestra biológica. Los anticuerpos contra PD-L1 también son útiles para evaluar la eficacia de un agente terapéutico particular en un sujeto al que se ha diagnosticado una afección médica relacionada con PD-L1.

Descripción de la técnica relacionada

15 La siguiente descripción se proporciona para ayudar a la comprensión del lector. Ni la información proporcionada ni las referencias citadas se admiten como técnica anterior.

20 El receptor muerte programada 1 (PD-1, por sus siglas en inglés) es miembro de la familia de receptores CD28, que incluye CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1 y BTLA. Los miembros iniciales de la familia, CD28 e ICOS, se descubrieron por efecto funcional sobre la intensificación de la proliferación de linfocitos T después de la adición de anticuerpos monoclonales (Hutloff *et al.*, *Nature* 397:263-266 (1999); Hansen *et al.* *Immunogenics* 10:247-260 (1980)). Se han identificado dos ligandos glucoproteicos de la superficie celular para PD-1, PD-L1 y PD-L2, y se ha demostrado que regulan a la baja la activación de linfocitos T y la secreción de citocinas tras su unión a PD-1 (Freeman *et al.*, *J Exp Med* 192:1027-34 (2000); Latchman *et al.*, *Nat Immunol* 2:261-8 (2001); Carter *et al.*, *Eur J Immunol* 32:634-43 (2002); Ohigashi *et al.*, *Clin Cancer Res* 11:2947-53 (2005)). Tanto PD-L1 (B7-H1) como PD-L2 (B7-DC) son homólogos de B7 que se unen a PD-1, pero no se unen a otros miembros de la familia CD28.

30 El PD-L1 humano codifica una proteína precursora de membrana de tipo I de 290 aminoácidos (aa) con un supuesto péptido señal de 18 aa, un dominio extracelular de 221 aa, una región transmembranaria de 21 aa y un dominio citoplasmático de 31 aa. El PD-L1 humano se expresa constitutivamente en varios órganos, tales como corazón, músculo esquelético, placenta y pulmón, y en cantidades más bajas en timo, bazo, riñón e hígado. La expresión de PD-L1 está regulada por incremento en una pequeña fracción de linfocitos T y B activados y en una fracción mucho mayor de monocitos activados. La expresión de PD-L1 también se induce en células dendríticas y queratinocitos después de la estimulación con IFN gamma.

35 La vía PD-L1-PD1 está involucrada en la regulación negativa de algunas respuestas inmunitarias y puede desempeñar un papel importante en la regulación de la tolerancia periférica. La interacción de PD-L1 con PD-1 da como resultado la inhibición de la proliferación mediada por RLT y la producción de citocinas. Se ha sugerido que PD-L1 desempeña un papel en la inmunidad tumoral al incrementar la apoptosis de los clones de linfocitos T específicos de antígeno (Dong *et al.* *Nat Med* 8:793-800 (2002)). De hecho, se ha encontrado la expresión de PD-L1 en varios cánceres murinos y humanos, incluidos el carcinoma humano de pulmón, ovario y colon y diversos mielomas (Iwai *et al.* *PNAS* 99:12293-7 (2002); Ohigashi *et al.* *Clin Cancer Res* 11:2947-53 (2005)). Por lo tanto, la medición de la cantidad de proteína PD-L1 en muestras biológicas puede ayudar en la detección temprana de patologías cancerosas y puede ayudar a evaluar la eficacia y durabilidad de los fármacos en fase de investigación clínica que inhiben la unión de la proteína PD-L1.

40 Sin embargo, el uso de la expresión de la proteína PD-L1 como un factor pronóstico exacto para el cáncer y/o la eficacia de los tratamientos dirigidos anti-PD-1 y anti-PD-L1 sigue siendo un desafío. Muchos anticuerpos disponibles comercialmente dirigidos a PD-L1 reaccionan de forma cruzada con otras proteínas y/o presentan una tinción histológica no específica, lo que los hace reactivos de diagnóstico poco fiables. Véase <http://www.cellsignal.com/contents/science-cancer-research/pivotal-tumor-immunology-targets-pd-l1/pd-li-signaling>. Además, se han observado resultados contradictorios al comparar los anticuerpos contra PD-L1 dirigidos al dominio extracelular con los dirigidos al dominio intracelular (McLaughlin *et al.*, *J. Clin Oncol* 32:5 (2014)). Además, la evaluación de la expresión de PD-L1 en muestras de carcinoma de pulmón no microcítico usando anticuerpos disponibles comercialmente, tales como E1L3N® (Cell Signaling Technology, MA), 5H1 (Dong *et al.*, *Nat Med.* 8:793-800 (2002)) y E1J2J, produjo resultados discordantes (McLaughlin *et al.*, *J. Clin Oncol* 32:5 (2014)).

SUMARIO DE LA INVENCION

60 En el presente documento se proporciona un anticuerpo aislado que comprende una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada (HC) y una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera (LC), en el que la HC comprende (a) una HC CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos NHAIS (SEQ ID NO: 14); y (b) una HC CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos TINSDTHTYYATWPKG (SEQ ID NO: 15); y (c) una HC CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos RIFSSNI (SEQ ID NO: 16); y la LC comprende (a) una LC CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos QASQSIYNNWNLS (SEQ ID

NO: 17); y (b) una LC CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos LASTLAS (SEQ ID NO: 12); y (c) una LC CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos IGGESSNNDGIA (SEQ ID NO: 18), y en el que el anticuerpo se une a un epítipo de PD-L1 humano que comprende la secuencia de aminoácidos CGIQDTNSKKQSDTHLEET (SEQ ID NO: 1) y/o en el que la unión del anticuerpo al epítipo de PD-L1 humano tiene una concentración que produce la mitad del efecto máximo posible (CE₅₀) de al menos $1,5 \times 10^{-11}$ M.

En otro aspecto, (a) la HC del anticuerpo aislado comprende una secuencia consenso CDR3 **RX₁FSSX₂NI** (SEQ ID NO: 10), en la que X₁ es I o L, y X₂ es S o T; y/o (b) la LC del anticuerpo aislado comprende una secuencia consenso CDR3 **X₃GGESSX₄X₅DGIA** (SEQ ID NO: 13), en la que X₃ es L o I, X₄ es N o S, y X₅ es N, T o D; y/o (c) la HC del anticuerpo aislado comprende una secuencia consenso CDR3 **RX₁FSSX₂NI** (SEQ ID NO: 10), en la que X₁ es I o L, y X₂ es S o T, y en la que la LC del anticuerpo aislado comprende una secuencia consenso CDR3 **X₃GGESSX₄X₅DGIA** (SEQ ID NO: 13), en la que X₃ es L o I, X₄ es N o S, y X₅ es N, T o D.

Adicionalmente o de forma alternativa, en algunos aspectos del anticuerpo, la HC comprende además una secuencia consenso CDR2 **TINSDX₆HX₇YX₈ATWX₉KG** (SEQ ID NO: 9), en la que X₆ es T o S, X₇ es T o I, X₈ es Y o S, y X₉ es P o A.

Adicionalmente o de forma alternativa, en algunos aspectos del anticuerpo, la HC comprende además una secuencia consenso CDR1 **X₁₀X₁₁AIS** (SEQ ID NO: 8), en la que X₁₀ es N o S, y X₁₁ es H o D.

Adicionalmente o de forma alternativa, en algunos aspectos del anticuerpo, la LC comprende además una secuencia CDR2 **LASTLAS** (SEQ ID NO: 12).

Adicionalmente o de forma alternativa, en algunos aspectos del anticuerpo, la LC comprende además una secuencia consenso CDR1 **QASQSIYX₁₂X₁₃NWLS** (SEQ ID NO: 11), en la que X₁₂ es N o K y X₁₃ es N o D.

En algunos aspectos del anticuerpo, la HC comprende (a) una HC CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos **NHAIS** (SEQ ID NO: 14); y/o (b) una HC CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos **TINSDTHYYATWPKG** (SEQ ID NO: 15); y/o (c) una HC CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos **RIFSSNI** (SEQ ID NO: 16); y/o la LC comprende (a) una LC CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos **QASQSIYNNWLS** (SEQ ID NO: 17); y/o (b) una LC CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos **LASTLAS** (SEQ ID NO: 12); y/o (c) una LC CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos **IGGESSNNDGIA** (SEQ ID NO: 18).

En algunos aspectos del anticuerpo, la HC comprende (a) una HC CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos **SNAIS** (SEQ ID NO: 19); y/o (b) una HC CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos **TINSDSHIYATWAKG** (SEQ ID NO: 20); y/o (c) una HC CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos **RLFSTNI** (SEQ ID NO: 21); y/o la LC comprende (a) una LC CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos **QASQSIYKDNWLS** (SEQ ID NO: 22); y/o (b) una LC CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos **LASTLAS** (SEQ ID NO: 12); y/o (c) una LC CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos **LGGESSDDGIA** (SEQ ID NO: 23).

En algunos aspectos del anticuerpo, la HC comprende (a) una HC CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos **SHAIS** (SEQ ID NO: 24); y/o (b) una HC CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos **TINSDSHTYYATWAKG** (SEQ ID NO: 25); y/o (c) una HC CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos **RIFSSNI** (SEQ ID NO: 16); y/o la LC comprende (a) una LC CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos **QASQSIYNNWLS** (SEQ ID NO: 17); y/o (b) una LC CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos **LASTLAS** (SEQ ID NO: 12); y/o (c) una LC CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos **IGGESSNTDGIA** (SEQ ID NO: 26).

En algunos aspectos del anticuerpo, la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de HC comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6.

En algunos aspectos del anticuerpo, la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7.

En algunos aspectos del anticuerpo, la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de HC comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6, y la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7.

En algunos aspectos, el anticuerpo comprende además un marcador detectable.

En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento un fragmento de unión a antígeno de los anticuerpos divulgados en el presente documento, en el que el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo de Fab, F(ab')₂, Fab', scFv o Fv.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento una composición que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se divulga en el presente documento unido a un péptido que comprende la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, una proteína PD-L1 humana o un fragmento de la misma. En un aspecto, el péptido que comprende la SEQ ID NO: 1 está asociado con una célula. Por ejemplo, la composición puede comprender una muestra de células desagregadas marcadas con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo como se divulga en el presente documento, siendo útil dicha composición, por ejemplo, en procedimientos de cromatografía de afinidad para aislar células o para el análisis celular basado en citometría de flujo o la separación de células. Como otro ejemplo, la composición puede comprender una muestra de tejido fijada o un frotis celular marcado con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo como se divulga en el presente documento, siendo útil dicha composición, por ejemplo, en el análisis inmunohistoquímico o citológico. En otro aspecto, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se une a un soporte sólido, que es útil en, por ejemplo: ELISA; procedimientos de cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación para aislar proteínas PD-L1 o fragmentos de las mismas, células positivas para PD-L1 o complejos que contienen PD-L1 y otros componentes celulares. En otro aspecto, el péptido que comprende la SEQ ID NO: 1 está unido a un soporte sólido. Por ejemplo, el péptido se puede unir al soporte sólido por medio de un anticuerpo secundario específico para el péptido, que es útil, por ejemplo, en ELISA en sándwich. Como otro ejemplo, el péptido se puede unir a una columna de cromatografía, que es útil, por ejemplo, en el aislamiento o la purificación de anticuerpos de acuerdo con la presente invención. En otro aspecto, el péptido se dispone en una solución, tal como una solución de lisis o una solución que contiene una fracción subcelular de una célula fraccionada, que es útil, por ejemplo, en ELISA y procedimientos de cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación para aislar proteínas PD-L1 o fragmentos de las mismas o complejos que contienen PD-L1 y otros componentes celulares. En otro aspecto, el péptido se asocia con una matriz, tal como, por ejemplo, un gel de electroforesis en gel o una matriz comúnmente usada para inmunoelectrotransferencia (tal como membranas hechas de nitrocelulosa o poli(difluoruro de vinilideno)), siendo útiles dichas composiciones para técnicas electroforéticas y/o de inmunotransferencia, tal como inmunoelectrotransferencia.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento un procedimiento para detectar PD-L1 en una muestra biológica que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que más aún consiste en, poner en contacto la muestra con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se divulga en el presente documento, y detectar un complejo formado por la unión del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a PD-L1. En un aspecto, el procedimiento comprende además, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o más aún consiste en, aislar la muestra antes de poner la muestra en contacto con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.

En algunos aspectos del procedimiento, la muestra comprende una célula o una muestra de tejido.

En algunos aspectos del procedimiento, la muestra se obtiene de un sujeto al que se ha diagnosticado que tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de tener cáncer.

En algunos aspectos del procedimiento, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinoma de células transicionales de vejiga, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma ductal de mama, linfoma de Hodgkin, adenocarcinoma de páncreas, adenocarcinoma de próstata, carcinoma de células escamosas de cuello uterino, carcinoma de células escamosas de piel y carcinoma de pulmón no microcítico.

En algunos aspectos del procedimiento, la detección comprende uno o más de inmunohistoquímica (IHC), inmunoelectrotransferencia, citometría de flujo o ELISA.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento un procedimiento para detectar una célula patológica en una muestra aislada de un sujeto, que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que más aún consiste en: (a) detectar el nivel de PD-L1 en una muestra biológica del sujeto mediante la detección de un complejo formado por un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente divulgación que se une a PD-L1 en la muestra; y (b) comparar los niveles de PD-L1 observados en la etapa (a) con los niveles de PD-L1 observados en una muestra biológica de control; en el que la célula patológica se detecta cuando el nivel de PD-L1 está elevado en comparación con el observado en la muestra biológica de control y la célula patológica no se detecta cuando el nivel de PD-L1 no está elevado en comparación con el observado en la muestra biológica de control.

En algunos aspectos del procedimiento, la muestra biológica del sujeto comprende una o más de una muestra aislada de pulmón, riñón, vejiga, mama, páncreas, próstata, cuello uterino o piel.

En algunos aspectos del procedimiento, la detección comprende uno o más de inmunohistoquímica (IHC), inmunoelectrotransferencia, citometría de flujo o ELISA.

Adicionalmente o de forma alternativa, en algunos aspectos, los procedimientos divulgados en el presente documento comprenden además aislar la muestra biológica del sujeto antes de realizar los procedimientos.

Adicionalmente o de forma alternativa, en algunos aspectos de los procedimientos, el sujeto es un mamífero. En algunos aspectos, el mamífero se selecciona del grupo de: murino, felino, cánido, ovino, bovino, simio y humano.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento un anticuerpo específico de PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene la misma especificidad de epítipo que un anticuerpo como se divulga en el presente documento.

En un último aspecto, se proporciona en el presente documento un kit para detectar PD-L1 que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se divulga en el presente documento que opcionalmente comprende instrucciones de uso.

En un aspecto, se proporciona en el presente documento un procedimiento para detectar PD-L1 en una muestra de tumor que comprende (a) poner en contacto la muestra con un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo, en el que el anticuerpo comprende una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada (HC) y una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera (LC), en el que el anticuerpo se une a un epítipo de PD-L1 humano que comprende la secuencia de aminoácidos **CGIQDTNSKKQSDTHLEET** (SEQ ID NO: 1) y/o tiene una concentración que produce la mitad del efecto máximo posible (CE_{50}) de al menos $1,5 \times 10^{-11}M$, en el que la HC comprende (i) una HC CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos **NHAIS** (SEQ ID NO: 14); (ii) una HC CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos **TINSDTHTYYATWPKG** (SEQ ID NO: 15); y (iii) una HC CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos **RIFSSNI** (SEQ ID NO: 16); y la LC comprende (i) una LC CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos **QASQSIYNNWLS** (SEQ ID NO: 17); (ii) una LC CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos **LASTLAS** (SEQ ID NO: 12); y (iii) una LC CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos **IGGESSNNDGIA** (SEQ ID NO: 18); y (b) detectar un complejo formado por la unión del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a PD-L1.

Además se proporciona un polipéptido aislado que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que más aún consiste en, la secuencia de aminoácidos **CGIQDTNSKKQSDTHLEET** (SEQ ID NO: 1), que son útiles para generar anticuerpos que se unen a PD-L1. En un aspecto, los polipéptidos aislados comprenden además un marcador y/o secuencias de polipéptidos contiguos (por ejemplo, proteína portadora de hemocianina de lapa californiana (KLH)) acopladas funcionalmente al extremo amino o carboxilo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra un procedimiento para generar los anticuerpos monoclonales contra PD-L1 de la presente divulgación.

La figura 2A es una imagen que muestra los resultados de inmunohistoquímica (IHC) en una sección de tejido placentario fijado con formol e incluido en parafina (FFPE) usando el anticuerpo anti-PD-L1 SP263. La figura 2B es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido de amígdalas FFPE usando el anticuerpo anti-PD-L1 SP263. La figura 2C es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido de linfoma de Hodgkin FFPE usando el anticuerpo anti-PD-L1 SP263. La figura 2D es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido de carcinoma de células escamosas de pulmón FFPE usando el anticuerpo anti-PD-L1 SP263. La fila superior es una fotografía en color y la fila inferior es una fotografía en escala de grises. La tinción del anticuerpo aparece marrón en las fotografías en color. La tinción de PD-L1 aparece como regiones más oscuras en las fotografías en escala de grises. Las flechas en las fotografías en escala de grises indican ejemplos de tinción del anticuerpo en los tejidos respectivos.

La figura 3 es una inmunoelectrotransferencia que muestra la expresión de PD-L1 en lisados celulares de una línea celular de adenocarcinoma de pulmón NIH H820 (expresión alta), una línea celular HEK293 (expresión débil), una línea celular de adenocarcinoma de pulmón Calu-3 (control negativo), una línea celular de carcinoma de mama humano ZR75-1 (control negativo), una línea celular de carcinoma de mama humano MCF7 (control negativo) y una línea celular de carcinoma de mama humano T47D (control negativo) usando el anticuerpo anti-PD-L1 SP263.

La figura 4 ilustra el marcado mediante IHC de diversos tejidos usando SP263, J45H2L4 y J27H6L4. La columna izquierda es una fotografía en color y la columna derecha es la escala de grises correspondiente. La tinción del anticuerpo es marrón en las fotografías en color y se ilustra por flechas en las fotografías en escala de grises. La figura 4A es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido placentario FFPE usando el anticuerpo anti-PD-L1 SP263. La figura 4B es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido de colon FFPE usando el anticuerpo anti-PD-L1 SP263. La figura 4C es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido estomacal FFPE usando el anticuerpo anti-PD-L1 SP263. La figura 4D

es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido de placenta FFPE usando el clon de anticuerpo anti-PD-L1 J45H2L4. La figura 4E es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido de colon FFPE usando el clon de anticuerpo anti-PD-L1 J45H2L4. Se observa tinción nuclear no específica. La figura 4F es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido estomacal FFPE usando el clon de anticuerpo anti-PD-L1 J45H2L4. Se observa tinción nuclear no específica. La figura 4G es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido de placenta FFPE usando el clon de anticuerpo anti-PD-L1 J27H6L4. Se observa una tinción débil en los trofoblastos placentarios. La figura 4H es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido de colon FFPE usando el clon de anticuerpo anti-PD-L1 J27H6L4. La figura 4I es una imagen que muestra los resultados de IHC en una sección de tejido estomacal FFPE usando el clon de anticuerpo anti-PD-L1 J27H6L4.

La figura 5 contiene imágenes que muestran los resultados de IHC en una sección de tejido placentario FFPE usando las concentraciones indicadas de anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N o SP263. Las filas superiores para cada anticuerpo son imágenes en color y las filas inferiores son imágenes en escala de grises. La tinción del anticuerpo aparece marrón en las imágenes en color.

La figura 6 contiene imágenes que muestran los resultados de IHC en un epitelio estomacal o secciones de tejido nervioso FFPE usando las concentraciones indicadas de anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N o SP263. Las filas superiores para cada combinación de anticuerpo/tejido son imágenes en color y las filas inferiores son imágenes en escala de grises. La tinción del anticuerpo aparece marrón en las imágenes en color.

La figura 7 contiene imágenes que muestran los resultados de IHC en un epitelio estomacal y secciones de tejido FFPE de riñón, carcinoma de células transicionales de vejiga (TCC), carcinoma ductal de mama (Ca) y carcinoma de células escamosas de pulmón usando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N o SP263. Las filas superiores para cada combinación de anticuerpo/tejido son imágenes en color y las filas inferiores son imágenes en escala de grises. La tinción del anticuerpo aparece marrón en las imágenes en color.

La figura 8 contiene imágenes que muestran los resultados de IHC usando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N o SP263 en las siguientes secciones de tejido FFPE: (A) amígdalas; (B) carcinoma de células escamosas (SCC) de cuello uterino; (C) linfoma de Hodgkin (linfoma HK); (D) adenocarcinoma pancreático; (E) adenocarcinoma de próstata; y (F) SCC de piel. Las filas superiores para cada combinación de anticuerpo/tejido son imágenes en color y las filas inferiores son imágenes en escala de grises. La tinción del anticuerpo aparece marrón en las imágenes en color.

Las figuras 9A-9E muestran los resultados de IHC en secciones de tejido FFPE de pacientes con CPNM usando el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N. Las figuras 9F-9J muestran los resultados de IHC en secciones de tejido FFPE de pacientes con CPNM usando el anticuerpo anti-PD-L1 SP263. Las filas superiores para cada combinación de anticuerpo/tejido son imágenes en color y las filas inferiores son imágenes en escala de grises. La tinción del anticuerpo aparece marrón en las imágenes en color.

La figura 10 muestra los resultados de un ensayo ELISA que implica la unión de SP263 a un inmunógeno peptídico inmovilizado (aa 272-290 de PD-L1).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Se debe entender que esta divulgación no se limita a los aspectos particulares descritos, ya que, por supuesto, pueden variar. También se debe entender que la terminología usada en el presente documento se proporciona solo para el propósito de describir aspectos particulares y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente divulgación estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el significado entendido habitualmente por un experto en la técnica a la que pertenece la presente divulgación. Aunque cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento se puede usar en la práctica o prueba de la presente divulgación, ahora se describen los procedimientos, dispositivos y materiales preferentes. Nada de lo contenido en el presente documento se debe interpretar como una admisión de que la divulgación no tiene derecho a anteceder dicha divulgación en virtud de una divulgación previa.

La práctica de la presente tecnología empleará, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de cultivo tisular, inmunología, biología molecular, microbiología, biología celular y ADN recombinante, que se encuentran dentro del estado de la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook and Russell eds. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3.ª edición; la serie Ausubel et al. eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*; la serie *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson et al. (1991) *PCR 1: A Practical Approach* (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson et al. (1995) *PCR 2: A Practical Approach*; Harlow and Lane eds. (1999) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Freshney (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5.ª edición; Gait ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; patente de EE. UU. N.º 4.683.195; Hames and

Higgins eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Anderson (1999) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins eds. (1984) *Transcription and Translation; Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press (1986)); Perbal (1984) *A Practical Guide to Molecular Cloning*; Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*; Mayer and Walker eds. (1987) *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, London); y Herzenberg *et al.* eds (1996) *Weir's Handbook of Experimental Immunology*.

Todas las designaciones numéricas, por ejemplo, pH, temperatura, tiempo, concentración y peso molecular, incluyendo los intervalos, son aproximaciones que varían (+) o (-) en incrementos de 1,0 o 0,1, según corresponda, o de forma alternativa en una variación de +/-15%, o de forma alternativa un 10%, o de forma alternativa un 5% o de forma alternativa un 2%. Se debe entender, aunque no siempre se indique explícitamente, que todas las designaciones numéricas van precedidas por el término "aproximadamente". También se debe entender, aunque no siempre se indique explícitamente, que los reactivos descritos en el presente documento son meramente ejemplares y que en la técnica son conocidos equivalentes de los mismos.

Se debe inferir sin que se mencione explícitamente y, a menos que se pretenda de otro modo, que cuando la divulgación se refiere a un polipéptido, proteína, polinucleótido o anticuerpo, se pretende incluir dentro del alcance de esta divulgación un equivalente o un equivalente biológico de los mismos.

Como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la" incluyen las referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células, incluyendo mezclas de las mismas.

Como se usa en el presente documento, la "administración" de un agente o fármaco a un sujeto o sujeto incluye cualquier vía de introducción o administración de un compuesto a un sujeto para realizar su función pretendida. Las formulaciones de dosificación adecuadas y los procedimientos de administración de los agentes son conocidos en la técnica. También se puede determinar la vía de administración, y el procedimiento para determinar la vía de administración más eficaz es conocido por los expertos en la técnica y variará con la composición usada para el tratamiento, el propósito del tratamiento, el estado de salud o la fase de la enfermedad del sujeto que se va a tratar y la célula o tejido diana. Ejemplos no limitantes de la vía de administración incluyen administración oral, vaginal, administración nasal, inyección, aplicación tópica y por supositorio. La administración incluye la autoadministración y la administración por parte de otro. También se apreciará que los diversos modos de tratamiento o prevención de afecciones médicas, como se describe, son "sustanciales", lo que incluye tratamiento o prevención total pero también menos del total, y en el que se logra algún resultado biológico o médicamente relevante.

La administración se puede efectuar en una sola dosis, de forma continua o intermitente a lo largo del curso del tratamiento. Los procedimientos para determinar los medios y la dosis de administración más eficaces son conocidos por los expertos en la materia y variarán con la composición usada para el tratamiento, el propósito del tratamiento, la célula diana que se está tratando y el sujeto que se está tratando. Se pueden realizar administraciones únicas o múltiples con el nivel de dosis y el patrón seleccionados por el médico responsable del tratamiento.

Como se usa en el presente documento, el término "animal" se refiere a organismos vertebrados pluricelulares vivos, una categoría que incluye, por ejemplo, mamíferos y aves. El término mamífero incluye mamíferos tanto humanos como no humanos. De forma similar, el término "sujeto" o "paciente" incluye sujetos tanto humanos como animales, por ejemplo, humanos, primates no humanos, perros, gatos, ovejas, ratones, caballos y vacas.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere conjuntamente a inmunoglobulinas o moléculas similares a inmunoglobulinas, incluyendo, a modo de ejemplo y sin limitación, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, combinaciones de las mismas, y moléculas similares producidas durante una respuesta inmunitaria en cualquier vertebrado, por ejemplo, en mamíferos tales como humanos, cabras, conejos y ratones, así como especies no mamíferas, tales como inmunoglobulinas de tiburón. El término "anticuerpo" incluye inmunoglobulinas intactas y "fragmentos de anticuerpo" o "fragmentos de unión a antígeno" que se unen específicamente a una molécula de interés (o un grupo de moléculas de interés altamente similares) para la exclusión sustancial de la unión a otras moléculas (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que tienen una constante de unión por la molécula de interés que es de al menos 10^3 M^{-1} mayor, al menos 10^4 M^{-1} mayor o al menos 10^5 M^{-1} mayor que una constante de unión para otras moléculas en una muestra biológica. El término "anticuerpo" también incluye formas genomanipuladas, tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados) y anticuerpos heteroconjugados (tales como anticuerpos biespecíficos). Véase también Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.); Kubly, J., *Immunology*, 3.^a ed., W.H. Freeman & Co., New York, 1997.

Más en particular, "anticuerpo" se refiere a un ligando polipeptídico que comprende al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera o cadena pesada que reconoce específicamente y se une a un epítipo de un antígeno. Los anticuerpos se componen de una cadena pesada y una ligera, de las que cada una tiene una región variable, denominada la región pesada variable (V_H) y la región ligera variable (V_L). En conjunto, la región

V_H y la región V_L son responsables de la unión al antígeno reconocido por el anticuerpo.

Típicamente, una inmunoglobulina tiene cadenas pesadas (H) y cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Hay dos tipos de cadena ligera, lambda (λ) y kappa (κ). Existen cinco clases (o isotipos) principales de cadenas pesadas que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable (las regiones también son conocidas como "dominios"). En combinación, las regiones variables de la cadena pesada y la ligera se unen específicamente al antígeno. Las regiones variables de la cadena ligera y pesada contienen una región "estructural" interrumpida por tres regiones hipervariables, también llamadas "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR". Se ha definido la extensión de la región estructural y de las CDR (véase, Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). La base de datos de Kabat ahora se encuentra actualizada en línea. Las secuencias de las regiones estructurales de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas en una especie. La región estructural de un anticuerpo, es decir, las regiones estructurales combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, adoptan en gran medida una conformación de lámina β y las CDR forman bucles que se conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de la lámina β. Por tanto, las regiones estructurales actúan para formar un andamio que proporciona el posicionamiento de las CDR en la orientación correcta mediante interacciones intercatenarias y no covalentes.

Las CDR son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se denominan típicamente CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente comenzando desde el extremo N, y también se identifican típicamente por la cadena en la que se localiza la CDR particular. Por tanto, una V_H CDR3 se localiza en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una V_L CDR1 es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se encuentra. Un anticuerpo que se une a PD-L1 tendrá una región V_H específica y la secuencia de la región V_L, y por tanto secuencias CDR específicas. Los anticuerpos con diferentes especificidades (es decir, diferentes sitios de combinación para diferentes antígenos) tienen diferentes CDR. Aunque son las CDR las que varían de anticuerpo a anticuerpo, solo se implica directamente un número limitado de posiciones aminoacídicas en las CDR en la unión a antígeno. Estas posiciones en las CDR se llaman residuos determinantes de la especificidad (SDR).

El término "anticuerpo" pretende además englobar fragmentos de digestión, partes especificadas, derivados y variantes de los mismos, incluyendo miméticos de anticuerpos o comprendiendo partes de anticuerpos que imitan la estructura y/o función de un anticuerpo o fragmento o parte especificada del mismo, incluyendo anticuerpos monocaténarios y fragmentos de los mismos. Los ejemplos de fragmentos de unión englobados dentro del término "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L, V_H, C_L y C_H; un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento F_d que consiste en los dominios V_H y C_H; un fragmento F_v que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, un fragmento dAb (Ward *et al.* (1989) *Nature* 341: 544-546), que consiste en un dominio V_H; y una región determinante de la complementariedad aislada (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento F_v, V_L y V_H, están codificados por genes separados, se pueden unir, mediante procedimientos recombinantes, por un conector sintético que les permite formarse como una cadena proteica única en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como F_v monocaténario (scFv)). Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426 y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883. El término "fragmento de un anticuerpo" también pretende englobar los anticuerpos monocaténarios. Cualquiera de los fragmentos de anticuerpos mencionados anteriormente se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se criban para determinar la especificidad de unión y la actividad de neutralización de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Los "fragmentos de anticuerpos" o "fragmentos de unión a antígeno" incluyen fragmentos de anticuerpos proteolíticos (tales como fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab', fragmentos Fab'-SH y fragmentos Fab como son conocidos en la técnica), fragmentos de anticuerpos recombinantes (tales como fragmentos sF_v, fragmentos dsF_v, fragmentos sF_v biespecíficos, fragmentos dsF_v biespecíficos, fragmentos F(ab')₂, proteínas F_v monocaténarias ("scFv"), proteínas F_v estabilizadas con disulfuro ("dsFv"), diacuerpos y triacuerpos (como son conocidos en la técnica) y anticuerpos camélidos (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 6.015.695; 6.005.0795.874.541; 5.840.526; 5.800.988; y 5.759.808). Una proteína scFv es una proteína de fusión en la que una región variable de cadena ligera de una inmunoglobulina y una región variable de cadena pesada de una inmunoglobulina se unen por un conector, mientras que en dsFvs, las cadenas se han mutado para introducir un enlace disulfuro para estabilizar la asociación de las cadenas.

Como se usa en el presente documento, el término "derivado de anticuerpo" pretende englobar moléculas que se unen a un epítipo como se define en el presente documento y que son modificaciones o derivados de un anticuerpo contra PD-L1 aislado de esta divulgación. Los derivados incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, heteroespecíficos, triespecíficos, tetraspecíficos, multiespecíficos, diacuerpos, quiméricos, recombinantes y humanizados. Como se usa en el presente documento, el término "molécula biespecífica" pretende incluir cualquier agente, por ejemplo, una proteína, péptido o complejo de proteínas o péptidos, que tiene

dos especificidades de unión diferentes. Como se usa en el presente documento, el término "molécula multiespecífica" o "molécula heteroespecífica" pretende incluir cualquier agente, por ejemplo, una proteína, péptido o complejo de proteínas o péptidos, que tiene más de dos especificidades de unión diferentes. Como se usa en el presente documento, el término "heteroanticuerpos" se refiere a dos o más anticuerpos, fragmentos de unión de anticuerpos (por ejemplo, Fab), derivados de los mismos o regiones de unión a antígeno unidas entre sí, al menos dos de las cuales tienen especificidades diferentes.

El término "variante de anticuerpo" pretende incluir anticuerpos producidos en una especie distinta de un conejo. También incluye anticuerpos que contienen modificaciones postraduccionales de la secuencia polipeptídica lineal del anticuerpo o fragmento. Engloba además anticuerpos completamente humanos.

Como se usa en el presente documento, el término "antígeno" se refiere a un compuesto, composición o sustancia que puede estar específicamente unida por los productos de inmunidad humoral o celular específica, tales como una molécula de anticuerpo o un receptor de linfocitos T.

Los antígenos pueden ser cualquier tipo de molécula, incluyendo, por ejemplo, haptenos, metabolitos intermedios simples, glúcidos (por ejemplo, oligosacáridos), lípidos y hormonas, así como macromoléculas tales como carbohidratos complejos (por ejemplo, polisacáridos), fosfolípidos y proteínas. Las categorías comunes de antígenos incluyen, pero no se limitan a, antígenos víricos, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos de protozoos y otros parásitos, antígenos tumorales, antígenos implicados en enfermedades autoinmunitarias, alergia y rechazo de injertos, toxinas y otros antígenos diversos.

Como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la tendencia de una molécula a unirse (típicamente de forma no covalente) con otra molécula, tal como la tendencia de un miembro de un par de unión específica por otro miembro de un par de unión específica. Una afinidad de unión se puede medir como una constante de unión, cuya afinidad de unión por un par de unión específico (tal como un par de anticuerpo/antígeno) puede ser al menos 1×10^{-5} M, al menos 1×10^{-6} M, al menos 1×10^{-7} M, al menos 1×10^{-8} M, al menos 1×10^{-9} M, al menos 1×10^{-10} M, al menos 1×10^{-11} M o al menos 1×10^{-12} M. En un aspecto, la afinidad de unión se calcula mediante una modificación del procedimiento Scatchard descrito por Frankel *et al.*, *Mol. Immunol.*, 16:101-106, 1979. En otro aspecto, la afinidad de unión se mide mediante una tasa de disociación antígeno/anticuerpo. Aún en otro aspecto, una alta afinidad de unión se mide mediante un radioinmunoanálisis de competición. En varios ejemplos, una alta afinidad de unión por un par de anticuerpo/antígeno es al menos aproximadamente 1×10^{-8} M. En otros aspectos, una alta afinidad de unión es al menos aproximadamente $1,5 \times 10^{-8}$ M, al menos aproximadamente $2,0 \times 10^{-8}$ M, al menos aproximadamente $2,5 \times 10^{-8}$ M, al menos aproximadamente $3,0 \times 10^{-8}$ M, al menos aproximadamente $3,5 \times 10^{-8}$ M, al menos aproximadamente $4,0 \times 10^{-8}$ M, al menos aproximadamente $4,5 \times 10^{-8}$ M o al menos aproximadamente $5,0 \times 10^{-8}$ M.

Como se usa en el presente documento, el término "equivalente biológico del mismo" pretende ser sinónimo de "equivalente del mismo" cuando se refiere a una proteína, anticuerpo, polipéptido, polinucleótido o ácido nucleico de referencia, y pretende incluir aquellos que tienen una homología mínima mientras todavía mantienen la estructura o funcionalidad deseada. A menos que se mencione específicamente en el presente documento, se contempla que cualquier ácido nucleico, polinucleótido, polipéptido, proteína o anticuerpo mencionado en el presente documento también incluya equivalentes de los mismos. Por ejemplo, un equivalente pretende tener al menos aproximadamente un 80% de homología o identidad y, de forma alternativa, al menos aproximadamente un 85%, o de forma alternativa al menos aproximadamente un 90%, o de forma alternativa al menos aproximadamente un 95%, o de forma alternativa un 98% de homología o identidad y presenta una actividad biológica sustancialmente equivalente a la de la proteína, polipéptido, anticuerpo o ácido nucleico de referencia.

En un aspecto, el término "equivalente" o "equivalente biológico" de un anticuerpo significa la capacidad del anticuerpo para unirse selectivamente a su proteína epítipo o fragmento de la misma como se mide por ELISA, IHC u otros procedimientos adecuados. Los anticuerpos biológicamente equivalentes incluyen, pero no se limitan a, aquellos anticuerpos, péptidos, fragmentos de anticuerpos, variantes de anticuerpos, derivados de anticuerpos y miméticos de anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia. El experto en la técnica puede preparar un anticuerpo funcionalmente equivalente a los anticuerpos de la presente divulgación mediante la introducción de mutaciones apropiadas en el anticuerpo usando mutagénesis dirigida al sitio (Hashimoto-Gotoh, T. *et al.*, *Gene* 152, 271-275 (1995); Zoller & Smith, *Methods Enzymol.* 100, 468-500 (1983); Kramer, W. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 12, 9441-9456 (1984); Kramer W. & Fritz H J., *Methods. Enzymol.* 154, 350-367 (1987); Kunkel, T A., *Proc Natl Acad Sci USA.* 82, 488-492 (1985); y Kunkel *Methods Enzymol.* 85, 2763-2766 (1988)).

Los anticuerpos que son funcionalmente equivalentes a los anticuerpos de la presente divulgación y comprenden una secuencia de aminoácidos que comprende la mutación de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de la presente divulgación también se incluyen en los anticuerpos de la presente divulgación. En dichos mutantes, el número de aminoácidos que están mutados es, en general, de 50 aminoácidos o menos, preferentemente de 30 o menos, y más preferentemente de 10 o menos (por ejemplo, 5 aminoácidos o menos). Un residuo aminoacídico se muta preferentemente a uno que conserva las propiedades de la cadena lateral de aminoácidos. Por ejemplo, en base a las propiedades de su cadena lateral, los aminoácidos se clasifican

en: aminoácidos hidrófobos (A, I, L, M, F, P, W, Y y V); aminoácidos hidrófilos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S y T); aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas (G, A, V, L, I y P); aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen grupos hidroxilo (S, T e Y); aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen átomos de azufre (C y M); aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen ácido carboxílico y amida (D, N, E y Q); cadenas laterales que contienen bases (R, K y H); y aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen aromáticos (H, F, Y y W).

(Las letras entre paréntesis indican códigos de aminoácidos de una letra)

Como se usa en el presente documento, el término "muestra biológica" significa material de muestra derivado de células vivas o puesto en contacto con células vivas. El término "muestra biológica" pretende incluir tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes dentro de un sujeto. Las muestras biológicas de la divulgación incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, sangre completa, plasma, semen, saliva, lágrimas, orina, materia fecal, sudor, bucales, piel, líquido ceforraquídeo y cabello. Las muestras biológicas también se pueden obtener de biopsias de órganos internos o de cánceres. Se pueden obtener muestras biológicas de sujetos para diagnóstico o investigación o se pueden obtener de individuos sanos, como controles o para investigación básica.

Los términos "cáncer", "neoplasia" y "tumor", usados indistintamente y en forma singular o plural, se refieren a células que han sufrido una transformación maligna que las hace patológicas para el organismo huésped y se seleccionan del grupo que consiste de carcinoma de células transicionales de vejiga, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma ductal de mama, linfoma de Hodgkin, adenocarcinoma de páncreas, adenocarcinoma de próstata, carcinoma de células escamosas de cuello uterino, carcinoma de células escamosas de la piel y carcinoma de pulmón no microcítico.

Las células cancerosas primarias (es decir, las células obtenidas de cerca del sitio de transformación maligna) se pueden distinguir fácilmente de las células no cancerosas mediante técnicas bien establecidas, en particular mediante examen histológico. La definición de una célula cancerosa, como se usa en el presente documento, incluye no solo una célula cancerosa primaria, sino también cualquier célula derivada de un precursor de células cancerosas. Esto incluye células cancerosas metastásicas y cultivos *in vitro* y líneas celulares derivadas de células cancerosas. Cuando se hace referencia a un tipo de cáncer que normalmente se manifiesta como un tumor sólido, un tumor "clínicamente detectable" es aquel que se puede detectar en base a la masa tumoral; por ejemplo, mediante procedimientos tales como exploración por TAC, resonancia magnética nuclear (RMN), rayos X, ultrasonido o palpación. Los hallazgos bioquímicos o inmunológicos por sí solos pueden ser insuficientes para cumplir esta definición.

Una neoplasia es una masa o colonia de células anómalas producida por un nuevo crecimiento de tejido relativamente autónomo. La mayoría de las neoplasias surgen de la expansión clonal de una sola célula que ha sufrido una transformación neoplásica. La transformación de una célula normal en una neoplásica puede estar causada por un agente (o evento) químico, físico o biológico que altera directa e irreversiblemente el genoma celular. Las células neoplásicas están caracterizadas por la pérdida de algunas funciones especializadas y la adquisición de nuevas propiedades biológicas, sobre todo la propiedad de un crecimiento relativamente autónomo (no controlado). Las células neoplásicas transmiten sus características biológicas hereditarias a las células descendientes.

El comportamiento biológico pasado, presente y futuro, o evolución clínica, de una neoplasia se clasifica además como benigno o maligno, una distinción de gran importancia en el diagnóstico, el tratamiento y el pronóstico. Una neoplasia maligna manifiesta un mayor grado de autonomía, es capaz de invasión y diseminación metastásica, puede ser resistente al tratamiento y puede causar la muerte. Una neoplasia benigna tiene un menor grado de autonomía, normalmente no es invasiva, no metastatiza y, en general, no produce un gran daño si se trata adecuadamente.

Cáncer es un término genérico para las neoplasias malignas. La anaplasia es una propiedad característica de las células cancerosas e indica una falta de características estructurales y funcionales normales (indiferenciación).

Un tumor es literalmente una hinchazón de cualquier tipo, tal como una hinchazón inflamatoria o de otro tipo, pero el uso moderno indica, en general, una neoplasia.

La histogénesis es el origen de un tejido y es un procedimiento para clasificar las neoplasias en base a la célula de origen del tejido. Los adenomas son neoplasias benignas del epitelio glandular. Los carcinomas son tumores malignos del epitelio. Los sarcomas son tumores malignos de los tejidos mesenquimales. Un sistema para clasificar una neoplasia utiliza el comportamiento biológico (clínico), ya sea benigno o maligno, y la histogénesis, el tejido o la célula de origen de la neoplasia como se determina por el examen histológico y citológico. Las neoplasias se pueden originar en casi cualquier tejido que contenga células capaces de división mitótica. La clasificación histogenética de las neoplasias se basa en el tejido (o célula) de origen como se determina por el examen histológico y citológico.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo quimérico" significa un anticuerpo en el que la región constante Fc de un anticuerpo monoclonal de una especie (por ejemplo, una región constante Fc de ratón) se reemplaza, usando técnicas de ADN recombinante, con una región constante Fc de un anticuerpo de otra especie (por ejemplo, una región constante Fc humana). Véanse, en general, Robinson *et al.*, PCT/US86/02269; Akira *et al.*, solicitud de patente europea 184.187; Taniguchi, solicitud de patente europea 171.496; Morrison *et al.*, Solicitud de patente europea 173.494; Neuberger *et al.*, documento WO 86/01533; Cabilly *et al.* patente de EE. UU. n.º 4.816.567; Cabilly *et al.*, solicitud de patente europea 125.023; Better *et al.*, *Science* 240:1041-1043, 1988; Liu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443, 1987; Liu *et al.*, *J. Immunol.* 139: 3521-3526, 1987; Sun *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 214-218, 1987; Nishimura *et al.*, *Cancer Res* 47:999-1005, 1987; Wood *et al.*, *Nature* 314:446-449, 1985; y Shaw *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559, 1988. En determinados aspectos, la región o sitio de unión a la diana será de una fuente no humana (por ejemplo, ratón o primate) y la región constante es humana.

Como se usa en el presente documento, el término "que comprende" pretende significar que las composiciones y procedimientos incluyen los elementos enumerados, pero no excluyen otros. "Consistir esencialmente en" cuando se usa para definir composiciones y procedimientos significará excluir otros elementos de cualquier importancia esencial para la combinación para el uso previsto. Por ejemplo, una composición que consiste esencialmente en los elementos como se definen en el presente documento no excluiría los contaminantes traza del procedimiento de aislamiento y purificación y los vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina tamponada con fosfato, conservantes y similares. "Consistir en" significará excluir más que oligoelementos de otros ingredientes y etapas sustanciales del procedimiento para administrar las composiciones de esta divulgación. Los aspectos definidos por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta divulgación.

Una muestra biológica de "control" es una muestra alternativa usada en un experimento para el propósito de comparación. Un control puede ser "positivo" o "negativo". Por ejemplo, cuando el propósito del experimento es determinar una correlación de la eficacia de un agente terapéutico para el tratamiento de un tipo particular de cáncer, en general es preferente usar un control positivo (un compuesto o composición que se sabe que presenta el efecto terapéutico deseado) y un control negativo (un sujeto o una muestra que no recibe el tratamiento o recibe un placebo).

Como se usa en el presente documento, el término "marcador detectable" se refiere a una molécula o material que puede producir una señal detectable (tal como visualmente, electrónicamente o de otro modo) que indica la presencia y/o concentración del marcador en una muestra. Cuando se conjuga con una molécula de unión específica, se puede usar el marcador detectable para localizar y/o cuantificar la diana a la que se dirige la molécula de unión específica. De este modo, se puede detectar la presencia y/o concentración de la diana en una muestra detectando la señal producida por el marcador detectable. Un marcador detectable se puede detectar directa o indirectamente, y se pueden usar varios marcadores detectables diferentes conjugados con moléculas de unión específica diferentes en combinación para detectar una o más dianas. Por ejemplo, un primer marcador detectable conjugado con un anticuerpo específico para una diana, se puede detectar indirectamente a través del uso de un segundo marcador detectable que se conjuga con una molécula que se une específicamente al primer marcador detectable. Se pueden conjugar múltiples marcadores detectables que se pueden detectar por separado con diferentes moléculas de unión específica que se unen específicamente a diferentes dianas para proporcionar un ensayo multiplexado que puede proporcionar detección simultánea de las múltiples dianas en una muestra. Una señal detectable se puede generar por cualquier mecanismo, incluyendo la absorción, emisión y/o dispersión de un fotón (incluyendo fotones de radiofrecuencia, frecuencia de microondas, frecuencia infrarroja, frecuencia visible y frecuencia ultravioleta). Los marcadores detectables incluyen materiales y moléculas con color, fluorescentes, fosforescentes y luminiscentes, catalizadores (tales como enzimas) que convierten una sustancia en otra sustancia para proporcionar una diferencia detectable (tal como convirtiendo una sustancia incolora en una sustancia coloreada o viceversa, o produciendo un precipitado o incrementando la turbidez de la muestra), haptenos que se pueden detectar a través de interacciones de unión anticuerpo-hapteno usando conjugados de anticuerpos marcados de forma detectable adicionales, y moléculas o materiales paramagnéticos y magnéticos. Los ejemplos particulares de marcadores detectables incluyen enzimas tales como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, glucosa oxidasa, β -galactosidasa o β -glucuronidasa; fluoróforos tales como fluoresceínas, luminóforos, cumarinas, tintes BODIPY, resorufinas y rodaminas (muchos ejemplos adicionales de moléculas fluorescentes se pueden encontrar en *The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, Molecular Probes, Eugene, Oreg); nanopartículas tales como puntos cuánticos (obtenidos, por ejemplo, de QuantumDot Corp, Invitrogen Nanocrystal Technologies, Hayward, Calif.; véanse también las patentes de EE. UU. n.ºs 6.815.064, 6.682.596 y 6.649.138); quelatos metálicos, tales como los quelatos DOTA y DPTA de iones metálicos radiactivos o paramagnéticos como Gd^{3+} ; y liposomas, por ejemplo, liposomas que contienen moléculas fluorescentes atrapadas. Cuando el marcador detectable incluye una enzima, se puede usar un sustrato detectable tal como un cromógeno, un compuesto fluorógeno o un compuesto luminógeno en combinación con la enzima para generar una señal detectable (una amplia variedad de dichos compuestos están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Invitrogen Corporation, Eugene Oreg.). Los ejemplos particulares de compuestos cromógenos incluyen diaminobencidina (DAB), fosfato de 4-nitrofenilo (pNPP), Fast Red, fosfato de bromocloroindolilo (BCIP), nitroazul de tetrazolio (NBT), BCIP/NBT, Fast Red, AP Orange, AP Blue, tetrametilbencidina (TMB), 2,2'-azino-di-[3-

etilbenzotiazolin-sulfonato] (ABTS), o-dianisidina, 4-cloronaftol (4-CN), nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), o-fenilendiamina (OPD), 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactopiranosido (X-Gal), metilumbeliferil- β -D-galactopiranosido (MU-Gal), p-nitrofenil- α -D-galactopiranosido (PNP), 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronida (X-Gluc), 3-amino-9-etilcarbazol (AEC), fucsina, yodonitrotetrazolio (INT), azul de tetrazolio y violeta de tetrazolio.

De forma alternativa, se puede usar una enzima en un esquema de detección metalográfica. Los procedimientos de detección metalográfica incluyen el uso de una enzima, tal como fosfatasa alcalina, en combinación con un ion metálico soluble en agua y un sustrato inactivo de oxidorreducción de la enzima. El sustrato se convierte en un agente activo de oxidorreducción por la enzima, y el agente activo de oxidorreducción reduce el ion metálico, provocando que forme un precipitado detectable. (Véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE. UU. pendiente de trámite n.º 11/015.646, presentada el 20 de diciembre de 2004, la publicación PCT n.º 2005/003777 y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2004/0265922). Los procedimientos de detección metalográfica también incluyen el uso de una enzima oxidoreductasa (tal como la peroxidasa de rábano picante) junto con un ion metálico soluble en agua, un agente oxidante y un agente reductor, de nuevo para formar un precipitado detectable. (Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.670.113). Los haptenos son moléculas pequeñas que se unen específicamente por anticuerpos, aunque por sí mismas no provocarán una respuesta inmunitaria en un animal y primero se deben unir a una molécula transportadora más grande tal como una proteína para generar una respuesta inmunitaria. Los ejemplos de haptenos incluyen dinitrofenilo, biotina, digoxigenina y fluoresceína. Se divulgan ejemplos adicionales de haptenos oxazol, pirazol, tiazol, nitroarilo, benzofurano, triperpeno, urea, tiourea, rotenoide, cumarina y ciclolignano en la solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 60/856.133, presentada el 1 de noviembre de 2006. En un ejemplo ilustrativo, el marcador detectable comprende un hapteno no endógeno (por ejemplo, no biotina), como, por ejemplo, los haptenos divulgados en las patentes de EE. UU. n.ºs 7.695.929, 8.618.265 y 8.846.320, incluyendo, por ejemplo, pirazoles, compuestos de nitrofenilo, benzofurazanos triterpenos, ureas y tioureas, rotenona y derivados de rotenona, oxazoles y tiazoles, cumarina y derivados de cumarina, y ciclolignanos. Dichos marcadores detectables se pueden detectar usando anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos capaces de unirse al hapteno.

Como se usa en el presente documento, un "epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a grupos químicos particulares o secuencias peptídicas contiguas o no contiguas en una molécula que son antigénicas, es decir, que provocan una respuesta inmunitaria específica. Un anticuerpo se une a un epítipo antigénico particular. Los epítipos normalmente consisten en agrupaciones de moléculas químicamente activas en la superficie, tales como aminoácidos o cadenas laterales glucídicas, y normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión a los primeros, pero no a los segundos, se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes.

Como se usa en el presente documento, "expresión" se refiere al proceso por el que polinucleótidos se transcriben en ARNm y/o al proceso por el que el ARNm transcrito se traduce posteriormente en péptidos, polipéptidos o proteínas. Si el polinucleótido se deriva de ADN genómico, la expresión puede incluir el ajuste del ARNm en una célula eucariota. El nivel de expresión de un gen se puede determinar midiendo la cantidad de ARNm o proteína en una muestra de células o tejidos. En un aspecto, el nivel de expresión de un gen de una muestra se puede comparar directamente con el nivel de expresión de ese gen de una muestra de control o referencia. En otro aspecto, el nivel de expresión de un gen de una muestra se puede comparar directamente con el nivel de expresión de ese gen de la misma muestra después de la administración de un compuesto.

Como se usa en el presente documento, "homología" o "idéntico", porcentaje de "identidad" o "similitud", cuando se usa en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o residuos aminoácidos que son iguales, por ejemplo, al menos un 60% de identidad, preferentemente al menos un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad a lo largo de una región especificada (por ejemplo, secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo descrito en el presente documento o secuencia de aminoácidos de un anticuerpo descrito en el presente documento). La homología se puede determinar comparando una posición en cada secuencia que se puede alinear para propósitos de comparación. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son homólogas en esa posición. Un grado de homología entre secuencias es una función del número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las secuencias. La alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia se pueden determinar usando programas informáticos conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, Eds. 1987) Suplemento 30, sección 7.7.18, Tabla 7.7.1. Preferentemente, se usan parámetros predeterminados para la alineación. Un programa de alineación preferente es BLAST, que usa parámetros predeterminados. En particular, los programas preferentes son BLASTN y BLASTP, que usan los siguientes parámetros predeterminados: Código genético = estándar; filtro = ninguno; cadena = ambas; valor de corte = 60; previsto = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; ordenación por = PUNTUACIÓN ALTA; Bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + Traducciones de CDS de GenBank + SwissProtein + SPupdate + PIR. Los detalles de estos programas se pueden encontrar en la siguiente dirección de Internet: ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST. Los términos "homología" o "idéntico", porcentaje de "identidad" o "similitud" también se refieren o se pueden aplicar al complemento de una secuencia de prueba. Los términos también incluyen secuencias que tienen delecciones y/o adiciones, así como aquellas que tienen sustituciones. Como se describe en el presente documento, los algoritmos preferentes pueden

tener en cuenta espacios y similares. Preferentemente, existe identidad a lo largo de una región que es de al menos aproximadamente 25 aminoácidos de longitud, o más preferentemente a lo largo de una región que es de al menos aproximadamente 50-100 aminoácidos o nucleótidos de longitud. Una secuencia "no relacionada" o "no homóloga" comparte menos de un 40% de identidad, o, de forma alternativa, menos de un 25% de identidad, con una de las secuencias de la presente divulgación.

El término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones constantes y variables derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la divulgación pueden incluir residuos aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un conejo, se hayan injertado en secuencias estructurales humanas. Por tanto, como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo en el que sustancialmente cada parte de la proteína (por ejemplo, CDR, estructura, dominios C_L, C_H (por ejemplo, C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}), bisagra, V_L, V_H) es sustancialmente no inmunógeno en humanos, con solo cambios o variaciones menores de secuencia. De forma similar, los anticuerpos designados de primate (mono, babuino, chimpancé, etc.), roedor (ratón, rata, conejo, conejillo de indias, hámster y similares) y otros mamíferos designan anticuerpos específicos de dicha especie, subgénero, género, subfamilia, familia. Además, los anticuerpos quiméricos incluyen cualquier combinación de los anteriores. Dichos cambios o variaciones opcional y preferentemente retienen o reducen la inmunogenicidad en humanos u otras especies con respecto a los anticuerpos no modificados. Por tanto, un anticuerpo humano es distinto de un anticuerpo quimérico o humanizado. Se señala que un anticuerpo humano puede ser producido por un animal no humano o una célula procariota o eucariota que es capaz de expresar genes de inmunoglobulina humana funcionalmente reorganizados (por ejemplo, cadena pesada y/o cadena ligera). Además, cuando un anticuerpo humano es un anticuerpo monocatenario, puede comprender un péptido conector que no se encuentra en los anticuerpos humanos naturales. Por ejemplo, un F_v puede comprender un péptido conector, tal como de dos a aproximadamente ocho residuos de glicina o de otros aminoácidos, que conecta la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera. Dichos péptidos conectores se consideran de origen humano.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que comprende una inmunoglobulina con una cadena ligera humanizada y una cadena pesada humanizada. Un anticuerpo humanizado se une al mismo antígeno que el anticuerpo donante que proporciona las CDR. La estructura aceptora de una inmunoglobulina o anticuerpo humanizado puede tener un número limitado de sustituciones por aminoácidos tomados de la estructura donante. Los anticuerpos humanizados u otros anticuerpos monoclonales pueden tener sustituciones aminoácidas conservadoras adicionales que no tienen sustancialmente ningún efecto sobre la unión a antígeno u otras funciones de inmunoglobulina. Se pueden construir inmunoglobulinas humanizadas por medio de genomanipulación (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.585.089).

Como se usa en el presente documento, el término "inmunoglobulina humanizada" se refiere a una inmunoglobulina que incluye una región estructural humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo, una de ratón, rata, conejo o sintética). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR se denomina "donante" y la inmunoglobulina humana que proporciona la estructura se denomina "aceptora". En un aspecto, todas las CDR son de la inmunoglobulina donante en una inmunoglobulina humanizada. Las regiones constantes no necesitan estar presentes, pero si lo están, deben ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de inmunoglobulina humana, es decir, idénticas en al menos aproximadamente un 85-90%, o al menos aproximadamente un 95% o más. Por tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las correspondientes partes de las secuencias de inmunoglobulinas humanas naturales.

El término "aislado" como se usa en el presente documento se refiere a moléculas o materiales biológicos o celulares que carecen sustancialmente de otros materiales. En un aspecto, el término "aislado" se refiere a ácido nucleico, tal como ADN o ARN, o proteína o polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo o derivado del mismo), o célula u orgánulo celular, o tejido u órgano, separado de otros ADN o ARN, o proteínas o polipéptidos, o células u orgánulos celulares, o tejidos u órganos, respectivamente, que están presentes en la fuente natural. El término "aislado" también se refiere a un ácido nucleico o péptido que carece sustancialmente de material celular, material vírico o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante, o de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Además, un "ácido nucleico aislado" pretende incluir fragmentos de ácido nucleico que no se producen naturalmente como fragmentos y no se encontrarían en el estado natural. El término "aislado" también se usa en el presente documento para referirse a polipéptidos que están aislados de otras proteínas celulares y pretende englobar tanto polipéptidos purificados como recombinantes. El término "aislado" también se usa en el presente documento para referirse a células o tejidos que están aislados de otras células o tejidos y pretende englobar células o tejidos tanto cultivados como genomanipulados.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo producido

mediante un único clon de linfocitos B o mediante una célula en la que se han transfectado los genes de la cadena ligera y pesada de un único anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales se producen por procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, preparando células formadoras de anticuerpos híbridas a partir de una fusión de células de mieloma con células de bazo inmunitarias. Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos monoclonales humanizados.

Como se usa en el presente documento, una "célula patológica" es aquella que pertenece a o surge de una enfermedad. Las células patológicas pueden ser hiperproliferativas. Una "célula hiperproliferativa" significa que las células o el tejido se dividen y crecen a una velocidad mayor que cuando la célula o el tejido está en un estado normal o saludable. Los ejemplos de los mismos incluyen, pero no se limitan a células precancerosas (es decir, displasia epitelial) y cancerosas. Las células hiperproliferativas también incluyen células desdiferenciadas, inmortalizadas, neoplásicas, malignas, metastásicas y cancerosas, tales como células de sarcoma, células de leucemia, células de carcinoma o células de adenocarcinoma.

Como se usa en el presente documento, "PD-L1" (ligando de muerte programada-1) o "B7-H1" (homólogo humano de B7 1), o PDCD1L1 (ligando 1 de muerte celular programada 1) es un miembro de la creciente familia B7 de proteínas inmunitarias que proporcionan señales tanto para estimular como para inhibir la activación de los linfocitos T. El PD-L1 humano codifica una proteína precursora de membrana de tipo I de 290 aminoácidos (aa) con un supuesto péptido señal de 18 aa, un dominio extracelular de 221 aa, una región transmembranaria de 21 aa y un dominio citoplasmático de 31 aa (ID del gen Entrez: 29126, UniProtKB: Q9NZQ7 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> último acceso el 20 de octubre de 2014).

Los términos "proteína", "péptido" y "polipéptido" se usan indistintamente y en su sentido más amplio para referirse a un compuesto de dos o más aminoácidos de subunidades, análogos de aminoácidos o peptidomiméticos. Las subunidades pueden estar unidas por enlaces peptídicos. En otro aspecto, la subunidad puede estar unida por otros enlaces, por ejemplo, éster, éter, etc. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos y no se pone ninguna limitación al número máximo de aminoácidos que puede comprender una secuencia de proteínas o de péptidos. Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, incluyendo glicina y los isómeros ópticos D y L, análogos de aminoácidos y peptidomiméticos.

Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se usan indistintamente y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. Ejemplos no limitantes de polinucleótidos son: un gen o fragmento de gen (por ejemplo, una sonda, cebador, etiqueta EST o SAGE), exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ARNi, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos nucleotídicos. Si están presentes, se pueden conferir modificaciones a la estructura de los nucleótidos antes o después del ensamblaje del polinucleótido. La secuencia de nucleótidos se puede interrumpir por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido se puede modificar además después de la polimerización, tal como mediante conjugación con un componente marcador. El término también se refiere a las moléculas bicatenarias y monocatenarias. A menos que se especifique o requiera de otro modo, cualquier aspecto de esta divulgación que sea un polinucleótido engloba tanto la forma bicatenaria como cada una de las dos formas monocatenarias complementarias conocidas o previstas para formar la forma bicatenaria.

Un polinucleótido está compuesto por una secuencia específica de cuatro bases de nucleótidos: adenina (A); citosina (C); guanina (G); timina (T); y uracilo (U) para timina cuando el polinucleótido es ARN. Por lo tanto, el término "secuencia polinucleotídica" es la representación alfabética de una molécula de polinucleótido. Esta representación alfabética se puede introducir en bases de datos en un ordenador que tenga una unidad central de procesamiento y usar para aplicaciones bioinformáticas tales como genómica funcional y búsqueda de homología.

Como se usa en el presente documento, el término "purificado" no requiere pureza absoluta; más bien, pretende ser un término relativo. Por tanto, por ejemplo, un ácido nucleico, péptido, proteína, complejos biológicos u otro compuesto activo purificado es aquel que está aislado total o parcialmente de proteínas u otros contaminantes. En general, los péptidos, proteínas, complejos biológicos u otros compuestos activos sustancialmente purificados para su uso en la divulgación comprenden más de un 80% de todas las especies macromoleculares presentes en una preparación antes de la mezcla o formulación del péptido, proteína, complejo biológico u otro compuesto activo con un vehículo, excipiente, tampón, agente potenciador de la absorción, estabilizante, conservante, coadyuvante u otro coingrediente farmacéutico en una formulación farmacéutica completa para administración terapéutica. Más típicamente, el péptido, proteína, complejo biológico u otro compuesto activo se purifica para representar más de un 90%, a menudo más de un 95% de todas las especies macromoleculares presentes en una preparación purificada antes de la mezcla con otros ingredientes de formulación. En otros casos, la preparación purificada puede ser esencialmente homogénea, en la que otras especies macromoleculares no son detectables por técnicas convencionales.

Como se usa en el presente documento, el término "unión específica" significa el contacto entre un anticuerpo y un antígeno con una afinidad de unión de al menos 10^{-6} M. En determinados aspectos, los anticuerpos se unen con afinidades de al menos aproximadamente 10^{-7} M, y preferentemente 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M o 10^{-12} M.

Como se usa en el presente documento, el término "proteína recombinante" se refiere a un polipéptido que se produce mediante técnicas de ADN recombinante, en el que, en general, el ADN que codifica el polipéptido se inserta en un vector de expresión adecuado que a su vez se usa para transformar una célula huésped para producir la proteína heteróloga.

Como se usa en el presente documento, "tratar" o "tratamiento" de una enfermedad en un sujeto se refiere a (1) evitar que los síntomas o la enfermedad ocurran en un sujeto que está predispuesto o que aún no presenta síntomas de la enfermedad; (2) inhibir la enfermedad o detener su desarrollo; o (3) mejorar o causar la regresión de la enfermedad o los síntomas de la enfermedad. Como se entiende en la técnica, "tratamiento" es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. Para los propósitos de esta divulgación, los resultados beneficiosos o deseados pueden incluir uno o más, pero no se limitan a, alivio o mejora de uno o más síntomas, disminución del alcance de una afección (incluyendo una enfermedad), estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de una afección (incluyendo una enfermedad), retraso o enlentecimiento de una afección (incluyendo una enfermedad), progresión, mejora o paliación de la afección (incluyendo una enfermedad), estados y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. Son preferentes los compuestos que son potentes y se pueden administrar localmente en dosis muy bajas, minimizando de este modo los efectos adversos sistémicos.

MODOS PARA LLEVAR A CABO LA DIVULGACIÓN

Anticuerpos y fragmentos de anticuerpos

La estructura general de los anticuerpos es conocida en la técnica y solo se resumirá brevemente aquí. Un monómero de inmunoglobulina comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras conectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está emparejada con una de las cadenas ligeras, a la que está unida directamente por medio de un enlace disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región constante (que varía dependiendo del isotipo del anticuerpo) y una región variable. La región variable comprende tres regiones hipervariables (o regiones determinantes de la complementariedad) que se designan como CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y que están soportadas dentro de las regiones estructurales. Cada cadena ligera comprende una región constante y una región variable, comprendiendo la región variable tres regiones hipervariables (designadas como CDRL1, CDRL2 y CDRL3) soportadas por regiones estructurales de manera análoga a la región variable de la cadena pesada.

Las regiones hipervariables de cada par de cadenas pesadas y ligeras cooperan mutuamente para proporcionar un sitio de unión a antígeno que sea capaz de unirse a un antígeno diana. La especificidad de unión de un par de cadenas pesadas y ligeras viene definida por la secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3 de las cadenas pesadas y ligeras. Por tanto, una vez que se determina un conjunto de secuencias de CDR (es decir, la secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3 para las cadenas pesadas y ligeras) que da lugar a una especificidad de unión particular, el conjunto de secuencias de CDR se puede insertar, en principio, en las posiciones apropiadas dentro de cualquier otra región estructural del anticuerpo unida con cualquier región constante del anticuerpo para proporcionar un anticuerpo diferente con la misma especificidad de unión a antígeno.

Con lo anterior en mente, en un aspecto, se proporciona en el presente documento un anticuerpo aislado que comprende una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada (HC) y una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera (LC), en el que las secuencias de dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada y cadena ligera forman un sitio de unión a antígeno que se une a un epítipo de PD-L1 humano que comprende la secuencia de aminoácidos **CGIQDTNSKKQSDTHLEET** (SEQ ID NO: 1) y/o tiene una concentración que produce la mitad del efecto máximo posible (CE_{50}) de al menos $1,5 \times 10^{-11}$ M.

En un aspecto, las secuencias de CDR3 de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos contra PD-L1 de la presente divulgación se ajustan a las secuencias consenso establecidas en SEQ ID NOS: 10 y 13.

En un aspecto, las secuencias de CDR1 y CDR2 de la cadena pesada de los anticuerpos contra PD-L1 de la presente divulgación se ajustan a las secuencias consenso establecidas en SEQ ID NOS: 8 y 9.

En otro aspecto, las secuencias de CDR1 de la cadena ligera de los anticuerpos contra PD-L1 de la presente divulgación se ajustan a la secuencia consenso establecida en SEQ ID NO: 11.

En otro aspecto, la secuencia de CDR2 de la cadena ligera de los anticuerpos contra PD-L1 de la presente divulgación comprende la secuencia de SEQ ID NO: 12.

En otro aspecto, los anticuerpos contra PD-L1 de la presente divulgación tienen la secuencia de CDR3 de la cadena

ligera que se ajusta a la secuencia consenso de SEQ ID NO: 13 y la secuencia de CDR3 de la cadena pesada que se ajusta a la secuencia consenso de SEQ ID NO: 10.

Las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 específicas de algunos de los anticuerpos preferentes (SP263, J45H2L4 y J27H6L4) de la divulgación se exponen en la Tabla 1. Por tanto, la presente divulgación proporciona anticuerpos que comprenden las CDR 1 a 3 que tienen las secuencias de estos anticuerpos preferentes. Sin embargo, dado que existe un alto nivel de identidad de secuencia entre las secuencias de los anticuerpos preferentes de la divulgación, también está dentro del alcance de la divulgación proporcionar anticuerpos con secuencias de CDR de diferentes anticuerpos preferentes. Por ejemplo, también se incluye en la divulgación un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de CDR1 de J27H6L4, CDR2 de J45H2L4 y CDR3 de SP263 y una cadena ligera que tiene la secuencia de CDR1 de J45H2L4, CDR2 de SP263 y CDR3 de J27H6L4.

En otro aspecto de la divulgación, el anticuerpo aislado incluye una o más de las siguientes características:

(a) la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende una o más CDR que son al menos un 85% idénticas a una CDR de un dominio variable de LC de SP263, J45H2L4 o J27H6L4;

(b) la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de HC comprende una o más CDR que son al menos un 85% idénticas a una CDR de un dominio variable de HC de SP263, J45H2L4 o J27H6L4;

(c) la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de LC es al menos un 85% idéntica a un dominio variable de LC de SP263, J45H2L4 o J27H6L4;

(d) la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de HC es al menos un 85% idéntica a un dominio variable de HC de SP263, J45H2L4 o J27H6L4; y

(e) el anticuerpo se une a un epítipo que se solapa con un epítipo unido por SP263, J45H2L4 o J27H6L4.

En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que es al menos un 85% idéntico a un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en SP263, J45H2L4 y J27H6L4. En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado seleccionado del grupo que consiste en SP263, J45H2L4 y J27H6L4.

En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que comprende las CDR de SP263. En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que es al menos un 85% idéntico a SP263. Las CDR de SP263 se representan en la tabla 1.

En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que comprende las CDR de J45H2L4. En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que es al menos un 85% idéntico a J45H2L4. Las CDR de J45H2L4 se representan en la tabla 1.

En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que comprende las CDR de J27H6L4. En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que es al menos un 85% idéntico a J27H6L4. Las CDR de J27H6L4 se representan en la tabla 1.

En algunos aspectos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento, la secuencia de dominio variable de HC comprende una secuencia de dominio variable de SP263 y la secuencia de dominio variable de LC comprende una secuencia de dominio variable de SP263.

En algunos aspectos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento, la secuencia de dominio variable de HC comprende una secuencia de dominio variable de J45H2L4 y la secuencia de dominio variable de LC comprende una secuencia de dominio variable de J45H2L4.

En algunos aspectos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento, la secuencia de dominio variable de HC comprende una secuencia de dominio variable de J27H6L4 y la secuencia de dominio variable de LC comprende una secuencia de dominio variable de J27H6L4.

En algunos de los aspectos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento, el anticuerpo se une a PD-L1 humano con una constante de disociación (K_D) de menos de 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M o 10^{-12} M. En algunos de los aspectos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento, el sitio de unión a antígeno se une específicamente al PD-L1 humano.

En algunos de los aspectos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento, el anticuerpo es Fab soluble.

En algunos de los aspectos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento, las secuencias de dominio variable de HC y LC son componentes de la misma cadena polipeptídica. En algunos de los aspectos de

los anticuerpos proporcionados en el presente documento, las secuencias de dominio variable de HC y LC son componentes de cadenas polipeptídicas diferentes.

5 En algunos de los aspectos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.

En algunos de los aspectos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

10 En algunos de los aspectos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento, el anticuerpo es quimérico o humanizado.

15 En algunos de los aspectos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en Fab, F(ab')₂, Fab', scFv y Fv.

En algunos de los aspectos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento, el anticuerpo comprende un dominio Fc. En algunos de los aspectos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo de conejo. En algunos de los aspectos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo humano o humanizado o es no inmunógeno en un humano.

20 En algunos de los aspectos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento, el anticuerpo comprende una región estructural de anticuerpo humano.

25 En otros aspectos, uno o más residuos aminoacídicos en una CDR de los anticuerpos proporcionados en el presente documento están sustituidos por otro aminoácido. La sustitución puede ser "conservadora" en el sentido de ser una sustitución dentro de la misma familia de aminoácidos. Los aminoácidos naturales se pueden dividir en las siguientes cuatro familias y se realizarán sustituciones conservadoras dentro de esas familias.

30 1) Aminoácidos con cadenas laterales básicas: lisina, arginina, histidina.

2) Aminoácidos con cadenas laterales ácidas: ácido aspártico, ácido glutámico.

3) Aminoácidos con cadenas laterales polares sin carga: asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina.

35 4) Aminoácidos con cadenas laterales no polares: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano, cisteína.

En otro aspecto, uno o más residuos aminoacídicos se añaden o eliminan de una o más CDR de un anticuerpo. Dichas adiciones o deleciones se producen en los extremos N o C de la CDR o en una posición dentro de la CDR.

40 Al variar la secuencia de aminoácidos de las CDR de un anticuerpo mediante adición, delección o sustitución de aminoácidos, se pueden obtener diversos efectos tales como una mayor afinidad de unión por el antígeno diana.

45 Se debe apreciar que los anticuerpos de la divulgación que comprenden dichas secuencias de CDR variadas todavía se unen a PD-L1 con perfiles de especificidad y sensibilidad similares a SP263, J45H2L4 y J27H6L4. Esto se puede someter a prueba por medio de los ensayos de unión divulgados en los ejemplos descritos en el presente documento.

50 Las regiones constantes de los anticuerpos también pueden variar respecto a las divulgadas específicamente para los anticuerpos SP263, J45H2L4 y J27H6L4. Por ejemplo, se pueden proporcionar anticuerpos con regiones Fc de cualquier isotipo: IgA (IgA1, IgA2), IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) o IgM. Los ejemplos no limitantes de secuencias de región constante incluyen:

55 Región constante de IgD humana, Uniprot: P01880 SEQ ID NO: 27

60 APTKAPDVFPISGCRHPKDNSPVVLA CLITGYHPTSVTVTWYMGTSQSPQ RTFPEIQRDRSYMTSSQLSTPLQQWR
QGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWPE SPKAQASSVPTAQPAEGSLAKATTA.PATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQE
ERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQD LWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHL TWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGS
QSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLN HPSLPPQRLMALREPAAQAPVKLSLN LASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNNI
LLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPPQG STTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYT CVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVTDHGPMPK

Región constante de IgG1 humana, Uniprot: P01857 SEQ ID NO: 28

65 ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVH TFPVQLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE

VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5 Región constante de IgG2 humana, Uniprot: P01859 SEQ ID NO: 29

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGT
QTYTCNVNDHKPSNTKVDKTVKRC CVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYT
10 LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DISVEWESNGQPENNYKTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región constante de IgG3 humana, Uniprot: P01860 SEQ ID NO: 30

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQYTCNVNHKPSNTKVDKRVKLT PLGDTHTTCPRCPEPKSCDTPPPCPR CPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPC
PRCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
20 VEWESSGQPENNYNTTPMLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVM HEALHNRTQKSLSLSPGK

Región constante de IgM humana, Uniprot: P01871 SEQ ID NO: 31

GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAV GCLAQDFLPDSITLSWKYKNSDISST RGFPVSLRGGKYAATSQVLLPSKDV
MQGTDEHVVKVQHPNGNKEKNVP LPVIAELPPKVSFVPPRDGFFGNPR KSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQ
25 VSGSVTTDQVQAEAKESGPTTYKV TSTLTIKESDWLGQSMFTCRVDHRGL TFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPS
FASIFLTKSTKLTLCLVTDLTTYDSVTI SWTRQNGEAVKHTNISESHPNATF SAVGEASICEDDWNSEGERFTCTVTHT
DLPSPKQITISRPKGVALLHRPDVYLL PPAREQLNLRESATITCLVTGFSPAD VFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMP
EPQAPGRYFAHSILTVSEEWNTGET YTCVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTL YNVSLVMSDAGTCY

30 Región constante de IgG4 humana, Uniprot: P01861 SEQ ID NO: 32

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT
KTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVESKY GPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY
35 TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

Región constante de IgA1 humana, Uniprot: P01876 SEQ ID NO: 33

ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACL VQGFFPQEPLSVTWSESGQGVARN FPSPQDASGDLYTTSSQLTLPATQCL
AGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPVCPV PSTPTPTSPSTPTPTSPSCCHPRLSLHR PALEDLLGSEANLTCTLTGLRDASG
VTFTWTPSSGKSAVQGPPELDLCGCY SVSSVLPGCAEPWNHGKTFTCTAA YPESKTPLTATLSKSGNTERPEVHLLP
PPSEELALNELVTLTCLARGFSPKD VLVRWLQGSQELPREKYLTVASRQE PSQGTTFFAVTSILRVAEDWKKGD
45 TFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGK PTHVNVSVVMAEVDGTCY

Región constante de IgA2 humana, Uniprot: P01877 SEQ ID NO: 34

ASPTSPKVFPLSLDSTPDGNVVIACL LVQGFPPQEPLSVTWSESGQNVART NFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQC
PDGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPVCPV VPPPPCCHPRLSLHRPALEDLLGSE ANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSG
50 KSAVQGPPELDLCGCYSVSSVLPGC AQPWNHGETFTCTAAHPELKTPLTA NITKSGNTERPEVHLLPPPSEELALNE
LVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQ ELPREKYLTVASRQEPSQGTTFFAV TSILRVAEDWKKGDTFSCMVGHEA
LPLAFTQKTIDRMAGKPTHVNVSVV MAEVDGTCY

Región constante de Ig kappa humana, Uniprot: P01834 SEQ ID NO: 35

55 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFN RGEK

60 En algunos aspectos, los anticuerpos SP263, J45H2L4 y J27H6L4 comprenden una región constante de cadena pesada que es al menos un 80% idéntica a SEQ ID NOS: 27-33 o 34.

En algunos aspectos, los anticuerpos SP263, J45H2L4 y J27H6L4 comprenden una región constante de cadena ligera que es al menos un 80 % idéntica a SEQ ID NO: 35.

65 En algunos aspectos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento, el anticuerpo se une al epítopo

unido por SP263, J45H2L4 y J27H6L4.

En algunos aspectos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento, el anticuerpo compite con SP263, J45H2L4 y J27H6L4 para unirse a PD-L1.

En algunos aspectos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento, el anticuerpo contiene modificaciones estructurales para facilitar la unión rápida y la absorción celular y/o la liberación lenta. En algunos aspectos, el anticuerpo contra PD-L1 contiene una delección en la región constante de cadena pesada CH2 del anticuerpo para facilitar la unión rápida y la absorción celular y/o la liberación lenta. En algunos aspectos, se usa un fragmento Fab para facilitar la unión rápida y la absorción celular y/o la liberación lenta. En algunos aspectos, se usa un fragmento F(ab)² para facilitar la unión rápida y la absorción celular y/o la liberación lenta.

Procesos para preparar anticuerpos y fragmentos de anticuerpos

Los anticuerpos, su fabricación y usos son bien conocidos y divulgados en, por ejemplo, Harlow, E. y Lane, D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999. Los anticuerpos se pueden generar usando procedimientos estándar conocidos en la técnica. Los ejemplos de anticuerpos incluyen (pero no se limitan a) fragmentos de anticuerpos monoclonales, monocatenarios y funcionales.

Se pueden producir anticuerpos en una variedad de huéspedes, por ejemplo, cabras, conejos, ratas, ratones, humanos y otros. Se pueden inmunizar mediante inyección con un antígeno diana o un fragmento u oligopéptido del mismo que tiene propiedades inmunógenas, tal como un fragmento C-terminal de PD-L1. Dependiendo de la especie huésped, se pueden usar diversos adyuvantes para incrementar la respuesta inmunitaria. Dichos adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, adyuvante de Freund, geles minerales tales como hidróxido de aluminio y sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol. Entre los adyuvantes usados en humanos, BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum* son particularmente útiles.

En determinados aspectos, los anticuerpos de la presente divulgación son policlonales, es decir, una mezcla de tipos plurales de anticuerpos anti-PD-L1 que tienen diferentes secuencias de aminoácidos, por ejemplo, anticuerpos generados contra SEQ ID NO: 1 usando técnicas conocidas en la técnica y descrito brevemente a continuación. En un aspecto, el anticuerpo policlonal comprende una mezcla de tipos plurales de anticuerpos anti-PD-L1 que tienen diferentes CDR. Como tal, se cultiva una mezcla de células que producen diferentes anticuerpos, y se puede usar un anticuerpo purificado del cultivo resultante (véase el documento WO 2004/061104).

Producción de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales contra PD-L1 se pueden preparar usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en cultivo, y en un aspecto se preparan usando un polipéptido que tiene SEQ ID NO: 1. Dichas técnicas incluyen, pero no se limitan a, la técnica de hibridoma (véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975)); la técnica del trioma; la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (véase, por ejemplo, Kozbor, *et al.*, *Immunol. Today* 4:72 (1983)) y la técnica de hibridoma del EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (véase, por ejemplo, Cole, *et al.*, en: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)). Se pueden utilizar anticuerpos monoclonales humanos en la práctica de la divulgación y se pueden producir usando hibridomas humanos (véase, por ejemplo, Cote, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:2026-2030 (1983)) o mediante transformación de linfocitos B humanos con el virus de Epstein Barr *in vitro* (véase, por ejemplo, Cole, *et al.*, en: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)). Por ejemplo, se puede aislar una población de ácidos nucleicos que codifican regiones de anticuerpos. Se usa PCR que utiliza cebadores derivados de secuencias que codifican regiones conservadas de anticuerpos para amplificar, a partir de la población, secuencias que codifican partes de anticuerpos y, a continuación, reconstruir ADN que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos, tal como dominios variables, a partir de las secuencias amplificadas. Dichas secuencias amplificadas también se pueden fusionar a ADN que codifican otras proteínas, por ejemplo, un recubrimiento de bacteriófago, o una proteína bacteriana de la superficie celular, para la expresión y presentación de los polipéptidos de fusión en fagos o bacterias. Las secuencias amplificadas se pueden entonces expresar y seleccionar o aislar adicionalmente en base, por ejemplo, a la afinidad del anticuerpo o fragmento del mismo expresado para un antígeno o epítipo presente en el polipéptido PD-L1. De forma alternativa, se pueden preparar hibridomas que expresan anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 inmunizando a un sujeto y, a continuación, aislando hibridomas del bazo del sujeto usando procedimientos de rutina. Véase, por ejemplo, Milstein *et al.*, (Galfre and Milstein, *Methods Enzymol* 73:3-46 (1981)). El cribado de los hibridomas usando procedimientos estándar producirá anticuerpos monoclonales de especificidad variable (es decir, para diferentes epítopos) y afinidad variable. Un anticuerpo monoclonal seleccionado con las propiedades deseadas, por ejemplo, unión a PD-L1, se puede (i) usar como es expresado por el hibridoma, (ii) unir a una molécula tal como polietilenglicol (PEG) para alterar sus propiedades, o (iii) un ADNc que codifica el anticuerpo monoclonal se puede aislar, secuenciar y manipular de diversas maneras. En un aspecto, el anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 es producido por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido a partir de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un

transgén de cadena ligera fusionados a una célula inmortalizada. Las técnicas de hibridoma incluyen las conocidas en la técnica y enseñadas en Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 349 (1988); Hammerling *et al.*, *Monoclonal Antibodies And T-Cell Hybridomas*, 563-681 (1981).

Técnica de presentación en fagos. Como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos de la presente divulgación se pueden producir mediante la aplicación de tecnología de ADN recombinante y presentación en fagos. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos anti-PD-L1 usando diversos procedimientos de presentación en fagos conocidos en la técnica. En los procedimientos de presentación en fagos, los dominios de anticuerpos funcionales se presentan en la superficie de una partícula de fago que porta secuencias polinucleotídicas que los codifican. Los fagos con una propiedad de unión deseada se seleccionan de un repertorio o colección combinatoria de anticuerpos (por ejemplo, humano o murino) seleccionando directamente con un antígeno, típicamente un antígeno unido o inmovilizado en una superficie sólida o una microesfera. Los fagos usados en estos procedimientos son típicamente fagos filamentosos que incluyen fd y M13, con dominios de anticuerpos Fab, Fv o Fv estabilizado con disulfuro que se fusionan de forma recombinante con la proteína del gen III o del gen VIII del fago. Además, se pueden adaptar procedimientos para la construcción de colecciones de expresión de Fab (véase, por ejemplo, Huse, *et al.*, *Science* 246:1275-1281, 1989) para permitir la identificación rápida y eficaz de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para un polipéptido PD-L1, por ejemplo, un polipéptido o derivados, fragmentos, análogos u homólogos del mismo. Otros ejemplos de procedimientos de presentación en fagos que se pueden usar para preparar los anticuerpos aislados de la presente divulgación incluyen los divulgados en Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85:5879-5883 (1988); Chaudhary *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87:1066-1070 (1990); Brinkman *et al.*, *J. Immunol. Methods* 182:41-50 (1995); Ames *et al.*, *J. Immunol. Methods* 184:177-186 (1995); Kettleborough *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 24:952-958 (1994); Persic *et al.*, *Gene* 187:9-18 (1997); Burton *et al.*, *Advances in Immunology* 57:191-280 (1994); PCT/GB91/01134; los documentos WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; WO 96/06213; WO 92/01047 (Medical Research Council *et al.*); WO 97/08320 (Morphosys); WO 92/01047 (CAT/MRC); WO 91/17271 (Affymax); y las patentes de EE. UU. n.ºs 5.698.426, 5.223.409, 5.403.484, 5.580.717, 5.427.908, 5.750.753, 5.821.047, 5.571.698, 5.427.908, 5.516.637, 5.780.225, 5.658.727 y 5.733.743.

En Lohning, patente de EE. UU. n.º 6.753.136 se han descrito procedimientos útiles para presentar polipéptidos en la superficie de partículas de bacteriófagos uniendo los polipéptidos mediante enlaces disulfuro. Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección de fagos, las regiones de codificación de anticuerpos del fago se pueden aislar y usar para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y expresar en cualquier huésped deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levaduras y bacterias. Por ejemplo, también se pueden emplear técnicas para producir fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ por recombinación usando procedimientos conocidos en la técnica tales como los divulgados en el documento WO 92/22324; Mullinax *et al.*, *BioTechniques* 12:864-869 (1992); Sawai *et al.*, *AJRI* 34:26-34 (1995); y Better *et al.*, *Science* 240:1041-1043 (1988).

En general, los anticuerpos híbridos o los fragmentos de anticuerpos híbridos que se clonan en un vector de presentación se pueden seleccionar contra el antígeno apropiado para identificar variantes que mantienen una buena actividad de unión, porque el anticuerpo o fragmento de anticuerpo estará presente en la superficie del fago o partícula fagémida. Véase, por ejemplo, Barbas III *et al.*, *Phage Display, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001). Sin embargo, se podrían usar otros formatos de vectores para este proceso, tales como la clonación de la colección de fragmentos de anticuerpos en un vector de fago lítico (sistemas T7 o Lambda Zap modificados) para selección y/o cribado.

Procedimientos alternativos de producción de anticuerpos. También se pueden producir anticuerpos induciendo la producción *in vivo* en la población de linfocitos o cribando colecciones de inmunoglobulinas recombinantes o paneles de reactivos de unión altamente específicos (Orlandi *et al.*, *PNAS* 86:3833-3837 (1989); Winter, G. *et al.*, *Nature*, 349:293-299 (1991)).

De forma alternativa, se pueden usar técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios. Los anticuerpos monocatenarios (scFv,s) comprenden una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera conectadas con un péptido conector (típicamente de aproximadamente 5 a 25 aminoácidos de longitud). En el scFv, las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera se pueden derivar del mismo anticuerpo o de anticuerpos diferentes. scFv_s se puede sintetizar usando técnicas recombinantes, por ejemplo, mediante la expresión de un vector que codifica scFv en un organismo huésped tal como *E. coli*. Se puede obtener ADN que codifica scFv realizando una amplificación usando un ADN parcial que codifica la secuencia de aminoácidos completa o deseada de un ADN seleccionado de un ADN que codifica la cadena pesada o la región variable de la cadena pesada del anticuerpo mencionado anteriormente y un ADN que codifica la cadena ligera o la región variable de la cadena ligera del mismo como molde, mediante PCR usando un par de cebadores que define ambos extremos del mismo, y realizando además una amplificación combinando un ADN que codifica una parte del conector polipeptídico y un par de cebadores que define ambos extremos del mismo, para ligar ambos extremos del conector a la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente. Se puede obtener un vector de expresión

que contiene el ADN que codifica scFv y un huésped transformado con el vector de expresión de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos en la técnica.

También se pueden generar fragmentos de unión a antígeno, por ejemplo, los fragmentos F(ab')₂ que se pueden producir por digestión de la molécula de anticuerpo con pepsina y los fragmentos Fab que se pueden generar reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. De forma alternativa, se pueden construir colecciones de expresión de Fab para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada (Huse *et al.*, *Science*, 256:1275-1281 (1989)).

Modificaciones de anticuerpos. Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden multimerizar para incrementar la afinidad por un antígeno. El anticuerpo que se va a multimerizar puede ser un tipo de anticuerpo o una pluralidad de anticuerpos que reconocen una pluralidad de epítomos del mismo antígeno. Ejemplos del procedimiento de multimerización del anticuerpo pueden ser la unión del dominio CH3 de IgG a dos moléculas de scFv, la unión a estreptavidina, la introducción de un motivo hélice-giro-hélice y similares.

Las composiciones de anticuerpos de la presente divulgación pueden estar en forma de un conjugado formado entre cualquiera de estos anticuerpos y otro agente (inmunoconjugado). En un aspecto, los anticuerpos de la presente divulgación se conjugan con material radiactivo. En otro aspecto, los anticuerpos de la presente divulgación se pueden unir a diversos tipos de moléculas tales como polietilenglicol (PEG).

Cribado de anticuerpos. Para el cribado se pueden usar diversos inmunoensayos para identificar anticuerpos que tienen la especificidad deseada. Numerosos protocolos para la unión competitiva o ensayos inmunoradiométricos que usan anticuerpos policlonales o monoclonales con especificidades establecidas son bien conocidos en la técnica. Dichos inmunoensayos típicamente implican la medición de la formación de complejos entre PD-L1, o cualquier fragmento u oligopéptido del mismo, y su anticuerpo específico. Se puede usar un inmunoensayo de base monoclonal de dos sitios que utiliza anticuerpos monoclonales específicos para dos epítomos de PD-L1 no interferentes, pero también se puede emplear un ensayo de unión competitiva (Maddox *et al.*, *J. Exp. Med.*, 158:1211-1216 (1983)).

Se puede realizar un cribado inmunohistoquímico (IHQ) automatizado de posibles anticuerpos anti-PD-L1 usando un Ventana Medical Systems, Inc (VMSI) Discovery XT y tejido humano fijado con formol e incluido en parafina en portaobjetos de vidrio. En primer lugar, las muestras de tejido se someten a desparafinación, recuperación de antígeno, seguido de la adición del posible anticuerpo anti-PD-L1 y un anticuerpo de detección. Se visualiza el anticuerpo de detección usando un reactivo de detección de cromógeno de VMSI. Se criban manualmente los portaobjetos teñidos bajo un microscopio. Se seleccionan las muestras que tienen un patrón de tinción de anticuerpo primario correcto como posibles candidatos anti-PD-L1.

Purificación de anticuerpos. Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden purificar hasta homogeneidad. La separación y purificación de los anticuerpos se puede realizar empleando procedimientos convencionales de separación y purificación de proteínas.

Solo a modo de ejemplo, el anticuerpo se puede separar y purificar seleccionando y combinando apropiadamente el uso de columnas de cromatografía, filtros, ultrafiltración, precipitación de sales, diálisis, electroforesis en gel de poliacrilamida preparativa, electroforesis de isoelectroenfoque y similares. *Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual*, Daniel R. Marshak *et al.* eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); *Antibodies: A Laboratory Manual*. Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988).

Los ejemplos de cromatografía incluyen cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa y cromatografía de adsorción. En un aspecto, la cromatografía se puede realizar empleando cromatografía de líquidos tal como HPLC o FPLC.

En un aspecto, se puede usar una columna de proteína A o una columna de proteína G en la cromatografía de afinidad. Otras columnas ejemplares incluyen una columna de proteína A, Hyper D, POROS, Sepharose F.F. (Pharmacia) y similares.

Procedimientos de diagnóstico y pronóstico

General. Los anticuerpos de la divulgación son útiles en procedimientos conocidos en la técnica relacionados con la localización y/o cuantificación de un polipéptido PD-L1 (por ejemplo, para su uso en la medición de niveles del polipéptido PD-L1 dentro de muestras fisiológicas apropiadas, para su uso en procedimientos de diagnóstico, para su uso en la generación de imágenes del polipéptido, y similares). Los anticuerpos de la divulgación son útiles para aislar un polipéptido PD-L1 mediante técnicas estándar, tales como cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación. Un anticuerpo contra PD-L1 de la divulgación puede facilitar la purificación de polipéptidos PD-L1 naturales a partir de muestras biológicas, por ejemplo, sueros o células de mamíferos, así como polipéptidos PD-L1 producidos de forma recombinante y expresados en un sistema huésped. Además, el anticuerpo contra PD-

L1 se puede usar para detectar un polipéptido PD-L1 (por ejemplo, en plasma, un lisado celular o un sobrenadante celular) para evaluar la abundancia y el patrón de expresión del polipéptido. Los anticuerpos contra PD-L1 de la divulgación se pueden usar con fines de diagnóstico para monitorizar los niveles de PD-L1 en el tejido como parte de un procedimiento de prueba clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de una pauta de tratamiento dada.

5 La detección se puede facilitar acoplando (es decir, uniendo físicamente) el anticuerpo contra PD-L1 de esta divulgación a una sustancia detectable.

Detección del polipéptido PD-L1. Un procedimiento ejemplar para detectar el nivel de polipéptidos PD-L1 en una muestra biológica implica obtener una muestra biológica de un sujeto y poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo contra PD-L1 de la presente divulgación que es capaz de detectar los polipéptidos PD-L1.

En un aspecto, los anticuerpos contra PD-L1 SP263, J45H2L4 y J27H6L4 o fragmentos de los mismos están marcados de forma que se puedan detectar. Con respecto al anticuerpo, el término "marcado" pretende englobar el marcado directo del anticuerpo mediante el acoplamiento (es decir, la unión física) de una sustancia detectable al anticuerpo, así como el marcado indirecto del anticuerpo por reactividad con otro compuesto que es marcado directamente. Los ejemplos no limitantes de marcado indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia y el marcado final de una sonda de ADN con biotina de modo que se pueda detectar con estreptavidina marcada con fluorescencia.

El procedimiento de detección de esta divulgación se puede usar para detectar niveles de expresión de polipéptidos PD-L1 en una muestra biológica tanto *in vitro* como *in vivo*. Las técnicas *in vitro* para la detección de polipéptidos PD-L1 incluyen ensayos de inmunoadsorción ligados a enzimas (ELISA), inmunoelectrotransferencias, citometría de flujo, inmunoprecipitaciones, radioinmunoanálisis e inmunofluorescencia (por ejemplo, IHC). Asimismo, las técnicas *in vivo* para la detección de polipéptidos PD-L1 incluyen la introducción de un anticuerpo anti-PD-L1 marcado en un sujeto. Solo a modo de ejemplo, el anticuerpo se puede marcar con un marcador radiactivo cuya presencia y localización en un sujeto se puede detectar mediante técnicas de generación de imágenes convencionales. En un aspecto, la muestra biológica contiene moléculas polipeptídicas del sujeto de prueba.

Inmunoensayo y generación de imágenes. Se puede usar un anticuerpo contra PD-L1 de la presente divulgación para analizar los niveles de polipéptido PD-L1 en una muestra biológica (por ejemplo, una muestra de células o tejidos) usando técnicas basadas en anticuerpos. Por ejemplo, la expresión de proteínas en los tejidos se puede estudiar con procedimientos de tinción inmunohistoquímicos (IHC) clásicos (Jalkanen, M. *et al.*, *J. Cell. Biol.* 101:976-985 (1985); Jalkanen, M. *et al.*, *J. Cell. Biol.* 105:3087-3096 (1987)). Otros procedimientos basados en anticuerpos útiles para detectar la expresión génica de las proteínas incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) y el radioinmunoanálisis (RIA). Son conocidos en la técnica marcadores de ensayos de anticuerpos adecuados e incluyen marcadores enzimáticos, tales como glucosa oxidasa y radioisótopos u otros agentes radiactivos, tales como yodo (^{125}I , ^{121}I , ^{131}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{112}In) y tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), y marcadores fluorescentes, como fluoresceína y rodamina y biotina.

Además de analizar los niveles de polipéptido PD-L1 en una muestra biológica, los niveles de polipéptido PD-L1 también se pueden detectar *in vivo* mediante generación de imágenes. Los marcadores que se pueden incorporar con anticuerpos anti-PD-L1 para la generación de imágenes *in vivo* de los niveles de polipéptido PD-L1 incluyen aquellos que se pueden detectar por radiografía, RMN o ESR. Para radiografía, los marcadores adecuados incluyen radioisótopos tales como bario o cesio, que emiten radiación detectable pero no son manifestamente perjudiciales para el sujeto. Los marcadores adecuados para RMN y ESR incluyen aquellos con un espín característico detectable, tal como el deuterio, que se pueden incorporar al anticuerpo contra PD-L1 marcando los nutrientes para el clon de scFv pertinente.

Se introduce (por ejemplo, por vía parenteral, subcutánea o intraperitoneal) en el sujeto un anticuerpo contra PD-L1 que se ha marcado con un resto detectable apropiado para la generación de imágenes, tal como un radioisótopo (por ejemplo, ^{131}I , ^{112}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$), una sustancia radiopaca o un material detectable por resonancia magnética nuclear. Se entenderá en la técnica que el tamaño del sujeto y el sistema de generación de imágenes usado determinarán la cantidad de resto para generación de imágenes necesaria para producir imágenes de diagnóstico. En el caso de un resto de radioisótopos, la cantidad de radiactividad inyectada normalmente en un sujeto humano variará de aproximadamente 5 a 20 milicurios de $^{99\text{m}}\text{Tc}$. El anticuerpo contra PD-L1 marcado se acumulará a continuación preferentemente en la localización de las células que contienen el polipéptido diana específico. Por ejemplo, la generación de imágenes de tumores *in vivo* se describe en S.W. Burchiel *et al.*, *Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer* 13 (1982).

En algunos aspectos, los anticuerpos contra PD-L1 que contienen modificaciones estructurales que facilitan la unión rápida y la absorción celular y/o la liberación lenta son útiles en los procedimientos de detección por generación de imágenes *in vivo*. En algunos aspectos, el anticuerpo contra PD-L1 contiene una delección en la región constante de cadena pesada CH2 del anticuerpo para facilitar la unión rápida y la absorción celular y/o la liberación lenta. En algunos aspectos, se usa un fragmento Fab para facilitar la unión rápida y la absorción celular y/o la liberación lenta. En algunos aspectos, se usa un fragmento F(ab)'2 para facilitar la unión rápida y la absorción celular y/o la liberación lenta.

Usos diagnósticos de los anticuerpos contra PD-L1. Las composiciones de anticuerpos contra PD-L1 de la divulgación son útiles en procedimientos de diagnóstico y pronóstico. Como tal, la presente divulgación proporciona procedimientos para usar los anticuerpos de la divulgación útiles en el diagnóstico de afecciones médicas relacionadas con PD-L1 en un sujeto. Los anticuerpos de la divulgación se pueden seleccionar de modo que tengan un alto nivel de especificidad de unión al epítipo y una alta afinidad de unión al polipéptido PD-L1. En general, cuanto mayor es la afinidad de unión de un anticuerpo, más rigurosas pueden ser las condiciones de lavado en un inmunoensayo para eliminar el material unido de forma no específica sin eliminar el polipéptido diana. En consecuencia, los anticuerpos contra PD-L1 de la divulgación útiles en ensayos de diagnóstico normalmente tienen afinidades de unión de al menos 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} o 10^{-12} M. En determinados aspectos, los anticuerpos contra PD-L1 usados como reactivos de diagnóstico tienen una constante de asociación cinética suficiente para alcanzar el equilibrio en condiciones estándar en al menos 12 horas, al menos 5 horas, al menos 1 hora o al menos 30 minutos.

Algunos procedimientos de la divulgación emplean preparaciones policlonales de anticuerpos anti-PD-L1 y composiciones de anticuerpos anti-PD-L1 de la divulgación como reactivos de diagnóstico, y otros procedimientos emplean aislados monoclonales. En los procedimientos que emplean anticuerpos anti-PD-L1 policlonales humanos preparados de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente, la preparación típicamente contiene una variedad de anticuerpos contra PD-L1, por ejemplo, anticuerpos contra el polipéptido diana con diferentes especificidades de epítipo. Los anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 de la presente divulgación son útiles para detectar un solo antígeno en presencia, o en presencia potencial, de antígenos estrechamente relacionados.

Los anticuerpos contra PD-L1 de la presente divulgación se pueden usar como reactivos de diagnóstico para cualquier tipo de muestra biológica. En un aspecto, los anticuerpos contra PD-L1 divulgados en el presente documento son útiles como reactivos de diagnóstico para muestras biológicas humanas. Los anticuerpos contra PD-L1 se pueden usar para detectar polipéptidos PD-L1 en una variedad de formatos de ensayo convencionales. Dichos formatos incluyen inmunoprecipitación, inmunoelectrotransferencia, ELISA, radioinmunoanálisis, citometría de flujo, IHC y ensayos inmunométricos. Véase Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, 1988); patentes de EE. UU. n.ºs 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.879.262; 4.034.074; 3.791.932; 3.817.837; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; y 4.098.876. Se pueden obtener muestras biológicas de cualquier tejido (incluyendo biopsias), célula o líquido corporal de un sujeto.

Usos pronósticos de los anticuerpos contra PD-L1. La divulgación también proporciona ensayos de pronóstico (o predictivos) para determinar si un sujeto está en riesgo de desarrollar una enfermedad o afección médica asociada con una mayor expresión o actividad del polipéptido PD-L1 (por ejemplo, detección de una célula precancerosa). Dichos ensayos se pueden usar con un propósito pronóstico o predictivo para de este modo tratar profilácticamente a un individuo antes del inicio de una enfermedad o afección médica caracterizada por o asociada con la expresión del polipéptido PD-L1.

Otro aspecto de la divulgación proporciona procedimientos para determinar la expresión de PD-L1 en un sujeto para seleccionar de ese modo compuestos terapéuticos o profilácticos apropiados para ese sujeto.

De forma alternativa, los ensayos de pronóstico se pueden utilizar para identificar a un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar carcinoma de células transicionales de vejiga, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma ductal de mama, linfoma de Hodgkin, adenocarcinoma de páncreas, adenocarcinoma de próstata, carcinoma de células escamosas de cuello uterino, carcinoma de células escamosas de la piel, y carcinoma de pulmón no microcítico. Por tanto, la divulgación proporciona un procedimiento para identificar una enfermedad o afección asociada con niveles de expresión incrementados del polipéptido PD-L1, en el que se obtiene una muestra de prueba de un sujeto y se detecta el polipéptido PD-L1, en el que la presencia de niveles incrementados de los polipéptidos PD-L1 en comparación con una muestra de control predice que un sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad o afección asociada con niveles de expresión incrementados del polipéptido PD-L1. En algunos aspectos, la enfermedad o afección asociada con los niveles de expresión incrementados del polipéptido PD-L1 se selecciona del grupo que consiste en carcinoma de células transicionales de vejiga, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma ductal de mama, linfoma de Hodgkin, adenocarcinoma de páncreas, adenocarcinoma de próstata, carcinoma de células escamosas de cuello uterino, carcinoma de células escamosas de piel y carcinoma de pulmón no microcítico.

En otro aspecto, la divulgación proporciona procedimientos para determinar si un sujeto se puede tratar eficazmente con un compuesto para un trastorno o afección asociado con una expresión incrementada del polipéptido PD-L1, en el que se obtiene una muestra biológica del sujeto y se detecta el polipéptido PD-L1 usando el anticuerpo contra PD-L1. Se determina el nivel de expresión del polipéptido PD-L1 en la muestra biológica obtenida del sujeto y se compara con los niveles de expresión de PD-L1 encontrados en una muestra biológica obtenida de un sujeto que no padece la enfermedad. Los niveles elevados del polipéptido PD-L1 en la muestra obtenida del sujeto sospechoso de tener la enfermedad o afección en comparación con la muestra obtenida del sujeto sano son indicativos de la enfermedad o afección asociada a PD-L1 en el sujeto que se está sometiendo a

prueba.

Hay varios estados patológicos en los que se conoce que el nivel de expresión elevado de los polipéptidos PD-L1 es indicativo de si es probable que un sujeto con la enfermedad responda a un tipo particular de tratamiento. Por tanto, el procedimiento de detección de un polipéptido PD-L1 en una muestra biológica se puede usar como un procedimiento de pronóstico, por ejemplo, para evaluar la probabilidad de que el sujeto responda a la terapia o al tratamiento. Se determina el nivel del polipéptido PD-L1 en una muestra adecuada de tejido o líquido corporal del sujeto y se compara con un control adecuado, por ejemplo, el nivel en sujetos con la misma enfermedad pero que han respondido favorablemente al tratamiento.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona procedimientos para monitorizar la influencia de agentes (por ejemplo, fármacos, compuestos o moléculas pequeñas) en la expresión de polipéptidos PD-L1. Dichos ensayos se pueden aplicar en pruebas de cribado de fármacos básicas y en ensayos clínicos. Por ejemplo, la eficacia de un agente para disminuir los niveles de polipéptido PD-L1 se puede monitorizar en ensayos clínicos de sujetos que presenten una expresión elevada de PD-L1, por ejemplo, pacientes con diagnóstico de cáncer. Un agente que afecta a la expresión de polipéptidos PD-L1 se puede identificar administrando el agente y observando una respuesta. De esta manera, el patrón de expresión del polipéptido PD-L1 puede servir como marcador, indicativo de la respuesta fisiológica del sujeto al agente. En consecuencia, este estado de respuesta se puede determinar antes y en diversos puntos durante el tratamiento del sujeto con el agente.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona procedimientos para monitorizar o predecir la eficacia de agentes terapéuticos que se dirigen a la vía PD-L1:PD-1. En un aspecto, el agente es un anticuerpo monoclonal terapéutico que inhibe específicamente PD-1 o PD-L1, dando como resultado de este modo una reducción de la actividad o expresión de PD-1 o PD-L1. Se pueden encontrar ejemplos no limitantes de anticuerpos monoclonales terapéuticos que se dirigen específicamente a PD-1 o PD-L1 en Brahmer *et al.*, *N Engl J Med.* 366(26):2455-2465 (2012) (que describe el anticuerpo anti-PD-L1 BMS-936559); Topalian *et al.*, *N Engl J Med.* 366 (26): 2443-2454 (2012) (que describe el anticuerpo anti-PD-1 BMS-936558); MPDL3280A (anticuerpo monoclonal anti-PD-L1, Genentech, San Francisco CA) (véase el sitio web en gene.com/media/press-releases/14566/2014-05-31/investigational-immunotherapy-anti-pdl1-, último acceso el 27 de octubre de 2014); MEDI4736 (anticuerpo monoclonal anti-PD-L1, AstraZeneca) (véase el sitio web en la dirección clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02125461?term=medi4736+nscl&rank=3, último acceso el 27 de octubre de 2014); MSB0010718C (anticuerpo monoclonal anti-PD-L1, Merck Serono, Alemania) (véase el sitio web en la dirección fiercebitech.com/press-releases/merck-serono-initiates-phase-ii-study-anti-pd-l1-antibody-msb0010718c-metas, último acceso el 27 de octubre de 2014); y MK-3475 (anticuerpo monoclonal anti-PD-1, Merck, Alemania) (véase el sitio web en cancer.gov/drugdictionary?cdrid=695789, última consulta el 27 de octubre de 2014).

Modos de realización automatizados. Un experto en la técnica apreciará que los aspectos de los procedimientos para el uso de anticuerpos contra PD-L1 divulgados en el presente documento se pueden automatizar. Ventana Medical Systems, Inc. es el cesionario de varias patentes de los Estados Unidos que divulgan sistemas y procedimientos para realizar análisis automatizados, incluyendo las patentes de EE. UU. n.ºs 5.650.327, 5.654.200, 6.296.809, 6.352.861, 6.827.901 y 6.943.029, y las solicitudes publicadas de EE. UU. n.ºs 20030211630 y 20040052685. Se pueden realizar aspectos particulares de procedimientos de tinción de PD-L1 usando diversos procedimientos automatizados.

Kits

Como se establece en el presente documento, la divulgación proporciona procedimientos de diagnóstico para determinar el nivel de expresión de PD-L1. En un aspecto particular, la divulgación proporciona kits para realizar estos procedimientos, así como instrucciones para llevar a cabo los procedimientos de esta divulgación, tales como recoger tejido y/o realizar cribado, y/o analizar los resultados.

El kit comprende o, de forma alternativa, consiste esencialmente en, o más aún consiste en, una composición de anticuerpos contra PD-L1 (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) de la presente divulgación e instrucciones de uso. Los kits son útiles para detectar la presencia de polipéptidos PD-L1 en una muestra biológica, por ejemplo, cualquier líquido corporal, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitarse a, esputo, suero, plasma, linfa, líquido quístico, orina, heces, líquido cefalorraquídeo, líquido ascítico o sangre, incluyendo muestras de biopsia de tejido corporal. Las muestras de prueba también pueden ser una célula tumoral, una célula normal adyacente a un tumor, una célula normal correspondiente al tipo de tejido tumoral, una célula sanguínea, un linfocito de sangre periférica o combinaciones de los mismos. La muestra de prueba usada en el procedimiento descrito anteriormente variará en base al formato del ensayo, la naturaleza del procedimiento de detección y los tejidos, células o extractos usados como muestra que se va a analizar. Los procedimientos para preparar extractos de proteínas o extractos de membrana de células son conocidos en la técnica y se pueden adaptar fácilmente para obtener una muestra que sea compatible con el sistema utilizado.

En algunos aspectos, el kit puede comprender: uno o más anticuerpos contra PD-L1 capaces de unirse a un polipéptido PD-L1 en una muestra biológica (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo

que tiene la misma especificidad de unión a antígeno de los anticuerpos contra PD-L1 SP263, J45H2L4 y J27H6L4); medios para determinar la cantidad del polipéptido PD-L1 en la muestra; y medios para comparar la cantidad del polipéptido PD-L1 en la muestra con un patrón. Uno o más de los anticuerpos PD-L1 pueden estar marcados. Los componentes del kit (por ejemplo, reactivos) se pueden envasar en un recipiente adecuado. El kit puede comprender además instrucciones para usar el kit para detectar los polipéptidos PD-L1. En determinados aspectos, el kit comprende un primer anticuerpo, por ejemplo, acoplado a un soporte sólido, que se une a un polipéptido PD-L1; y, opcionalmente; 2) un segundo anticuerpo diferente que se une al polipéptido PD-L1 o al primer anticuerpo y se conjuga con un marcador detectable.

El kit también puede comprender, por ejemplo, un agente tamponante, un conservante o un agente estabilizador de proteínas. El kit puede comprender además componentes necesarios para detectar el marcador detectable, por ejemplo, una enzima o un sustrato. El kit también puede contener una muestra de control o una serie de muestras de control, que se pueden analizar y comparar con la muestra de prueba. Cada componente del kit se puede incluir dentro de un recipiente individual y todos los diversos recipientes pueden estar dentro de un solo envase, junto con instrucciones para interpretar los resultados de los ensayos realizados con el kit. Los kits de la divulgación pueden contener un producto escrito sobre o en el recipiente del kit. El producto escrito describe cómo usar los reactivos contenidos en el kit.

Según sea conveniente, estos componentes del kit sugeridos se pueden envasar de una manera habitual para su uso por los expertos en la técnica. Por ejemplo, estos componentes del kit sugeridos se pueden proporcionar en solución o como una dispersión líquida o similar.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos monoclonales de conejo

La figura 1 ilustra el procedimiento general usado para crear anticuerpos monoclonales contra PD-L1 usando conejos como huésped. Los anticuerpos primarios monoclonales de conejo anti-PD-L1 se dirigieron contra la secuencia **CGIQDTNSKKQSDTHLEET** (SEQ ID NO: 1), que representa los residuos aminoacídicos 272-290 de PD-L1 humano. Por tanto, los anticuerpos resultantes se dirigían a la región citoplasmática C-terminal de PD-L1 humano de forma muy similar al anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N® (Cell Signaling Technology, MA).

El péptido de 19 aminoácidos se sintetizó y se conjugó covalentemente con una proteína portadora de hemocianina de lapa californiana (KLH). Se inmunizaron conejos blancos de Nueva Zelanda con péptido conjugado con KLH y emulsionado con adyuvante completo de Freund seguido de una serie de dosis de refuerzo de inmunógeno emulsionado con adyuvante incompleto de Freund. El conejo que generó un anticuerpo policlonal positivo por IHC se seleccionó para el posterior desarrollo monoclonal. Para las pruebas de IHC, se usó el protocolo estándar del kit OptiView DAB en la plataforma BenchMark Ultra (Ventana Medical System) después del acondicionamiento celular StdCC1. En resumen, se incubó el anticuerpo primario durante 16 min a 37°C, seguido de incubación con un anticuerpo secundario haptenado que reacciona con el anticuerpo primario. Posteriormente se añadió múltiplo HRP anti-hapteno, que reacciona con el anticuerpo secundario haptenado. Por último, el antígeno diana se detectó utilizando un sustrato cromógeno (DAB).

Para el ELISA, se aislaron células que expresan anticuerpos y se examinaron por medio de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas directo estándar (ELISA) para determinar la reactividad frente a la secuencia. **CGIQDTNSKKQSDTHLEET** (SEQ ID NO: 1) (véase *Antibodies: A Laboratory Manual*, página 661, segunda edición) y por ensayos IHC en bloques de tejido placentario de control. Una vez que se identificaron células productoras de anticuerpos positivas por IHC, se aislaron los ADNc que codifican la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo y se clonaron usando técnicas recombinantes estándar. Posteriormente se produjeron anticuerpos monoclonales cotransfectando los ADNc de la cadena pesada y ligera clonados y la funcionalidad de los anticuerpos resultantes se verificó por IHC. Se seleccionaron los anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 humano de conejo con la mejor especificidad, es decir, SP263, J45H2L4 y J27H6L4 y posteriormente se purificaron a través de una columna de proteína A. Las regiones CDR de los anticuerpos SP263, J45H2L4 y J27H6L4 se proporcionan en la tabla 1:

Tabla 1

Anticuerpo	HC		
	CDR1	CDR2	CDR3
SP263	NHAIS (SEQ ID NO: 14)	TINSDTHTYYATWPKG (SEQ ID NO: 15)	RIFSSSNI (SEQ ID NO: 16)
J45H2L4	SNAIS (SEQ ID NO: 19)	TINSDSHIYSATWAKG (SEQ ID NO: 20)	RLFSSTNI (SEQ ID NO: 21)
J27H6L4	SHAIS (SEQ ID NO: 24)	TINSDSHTYYATWAKG (SEQ ID NO: 25)	RIFSSSNI(SEQ ID NO: 16)

Anticuerpo	LC		
	CDR1	CDR2	CDR3
SP263	QASQSIYNNNWLS (SEQ ID NO: 17)	LASTLAS (SEQ ID NO: 12)	IGGESSNNDGIA (SEQ ID NO: 18)
J45H2L4	QASQSIYKDNWLS (SEQ ID NO: 22)	LASTLAS (SEQ ID NO: 12)	LGGESSDDGIA (SEQ ID NO: 23)
J27H6L4	QASQSIYNNNWLS (SEQ ID NO: 17)	LASTLAS (SEQ ID NO: 12)	IGGESSNTDGIA (SEQ ID NO: 26)

Las secuencias de aminoácidos de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de los anticuerpos anti-PD-L1 SP263, J45H2L4 y J27H6L4 se ajustan a las secuencias consenso proporcionadas a continuación:

- 5 La secuencia consenso de CDR1 de cadena pesada es $X_{10}X_{11}AIS$ (SEQ ID NO: 8), en la que X_{10} es N o S, y X_{11} es H o N.

La secuencia consenso de CDR2 de cadena pesada es $TINSDX_6HX_7YX_8ATWX_9KG$ (SEQ ID NO: 9), en la que X_6 es T o S, X_7 es T o I, X_8 es Y o S, y X_9 es P o A.

- 10 La secuencia consenso de CDR3 de cadena pesada es RX_1FSSX_2NI (SEQ ID NO: 10), en la que X_1 es I o L, y X_2 es S o T.

- 15 La secuencia consenso de CDR1 de cadena ligera es $QASQSIYX_{12}X_{13}NWLS$ (SEQ ID NO: 11), en la que X_{12} es N o K y X_{13} es N o D.

La secuencia consenso de CDR3 de cadena ligera es $X_3GGESSX_4X_5DGIA$ (SEQ ID NO: 13), en la que X_3 es L o I, X_4 es N o S, y X_5 es N, T o D.

- 20 La secuencia de CDR2 de cadena ligera es **LASTLAS** (SEQ ID NO:12).

Las secuencias de dominio variable de inmunoglobulina de HC y las secuencias de dominio variable de inmunoglobulina de LC de los anticuerpos SP263, J45H2L4 y J27H6L4 se proporcionan a continuación:

- 25 Secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de HC de SP263:

QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFS LSNHAISWVRQAPGKGLEWIGTINS DTHTYYATWPKGRFTISKTSSTTVDL
KMTSPTTEDTATYFCARRIFSSNIW GPGTLVTVSS (SEQ ID NO: 2)

- 30 Secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de LC de SP263 (kappa):

AIVMTQTSSPVSAVVGTVAINCQAS QSIYNNNWLSWVQKPGQPPKLLIY LASTLASGVPSRFGSGSGTQFTLTIS
DVVCDDAATYYCIGGESSNNDGIAF GGGTEVVVK (SEQ ID NO: 3)

- 35 Secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de HC de J45H2L4:

QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGF SLSSNAISWVRQAPGKGLEWIGTINS DSHIYSATWAKGRFTISKTSSTAVDL
KMTSPTTEDTATYFCAGRLFSSTNIW GPGTLVTVSS (SEQ ID NO: 4)

- 40 Secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de LC de J45H2L4 (kappa):

VMTQTSSPVSAVVGTVTINCQASQSIYKDNWLSWVQKPGQPPKLLIYLA STLASGVPSRFGSGSGTQFTLTISDV
VVCDDAATYYCIGGESSDDGIAFGG GTEVVVK (SEQ ID NO: 5)

- 45 Secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de HC de J27H6L4:

QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGF SLSSHAISWVRQAPGKGLEWIGTINS DSHTYYATWAKGRFTSSKTSTTVDL
LKLTSPTTEDTATYFCARRIFSSNIW GPGTLVTVSS (SEQ ID NO: 6)

- 50 Secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de LC de J27H6L4 (kappa):

VMTQTSSPVSAVVGTVTINCQASQSIYNNNWLSWVQKPGQPPKLLIYLA STLASGVPSRFGSGSGTQSTLTISDV
VVCDDAATYYCIGGESSNTDGIAFG GTEVVVE (SEQ ID NO: 7)

- 55 Ejemplo 2: Especificidad de anticuerpos anti-PD-L1 por la diana

Se aplicaron los anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 humano de conejo SP263, J45H2L4 y J27H6L4 sobre muestras de tejido fijado con formol e incluido en parafina (FFPE) para evaluar los patrones de tinción de estos anticuerpos. Las muestras de tejido incluyen placenta (control positivo), estómago (control negativo) y colon. La inmunohistoquímica se realizó en BenchMark Ultra (Ventana Medical System) usando acondicionamiento celular StdCC1 y el protocolo de detección Opt iView DAB estándar. Cada anticuerpo primario se incubó a 0,9 µg/ml durante 16 min.

Como se muestra en la figura 4G, el anticuerpo anti-PD-L1 J27H6L4 presentó una tinción débil en los trofoblastos placentarios y ninguna tinción en el tejido del colon y el estómago (figuras 4H-4I). Por el contrario, el anticuerpo anti-PD-L1 J45H2L4 generó la señal más fuerte en los trofoblastos placentarios. Véase la figura 4D. Sin embargo, J45H2L4 también presentó una tinción de fondo significativa, como se demuestra mediante la tinción nuclear no específica en el tejido del colon y estómago (figuras 4E y 4F). Como se muestra en la figura 4A, el anticuerpo SP263 produjo una fuerte señal en las membranas celulares de los sincitiotrofoblastos placentarios y poca o ninguna tinción de fondo en los tejidos de control del estómago y colon (figuras 4B-4C). El anticuerpo anti-PD-L1 SP263 se seleccionó para caracterización adicional en vista de sus propiedades de inmunotinción favorables.

Se aplicó el anticuerpo anti-PD-L1 SP263 en muestras FFPE de tejido de placenta, amígdalas, linfoma de Hodgkin y carcinoma de células escamosas de pulmón. Se sabe que cada uno de estos cuatro tejidos presenta altos niveles de expresión de PD-L1 asociado a membrana. La inmunohistoquímica se realizó en BenchMark Ultra (Ventana Medical System) usando acondicionamiento celular StdCC1 y el protocolo de detección Opt iView DAB estándar. El SP263 se incubó a 0,9 µg/ml durante 16 min.

Como se muestra en las figuras 2A-2D, la incubación con el anticuerpo SP263 produjo una tinción sólida de PD-L1 asociado a membrana en muestras de tejido de placenta, amígdalas, linfoma de Hodgkin y carcinoma de células escamosas de pulmón, lo cual es consecuente con los patrones de expresión de PD-L1 descritos en Brown *et al.*, *J. Immunol.* 170:1257-1266 (2003). Por tanto, estos resultados demuestran que los anticuerpos contra PD-L1 de la presente divulgación son útiles en procedimientos para detectar niveles de polipéptidos PD-L1 en una muestra biológica. Las células tumorales del linfoma de Hodgkin y el carcinoma de células escamosas de pulmón en las figuras 2C y 2D demostraron una tinción positiva para PD-L1, mientras que las células estromales que rodean las células cancerosas positivas para PD-L1 sirvieron como células de control negativo, lo que demuestra la especificidad del anticuerpo contra PD-L1. Por tanto, los resultados demuestran que los anticuerpos contra PD-L1 de la presente divulgación son útiles en procedimientos para detectar células cancerosas en un sujeto.

Ejemplo 3: Caracterización del anticuerpo anti-PD-L1 humano SP263

El análisis de inmunoelctrotransferencia se usó para evaluar la especificidad de unión del anticuerpo anti-PD-L1 SP263 en muestras biológicas. Lisados celulares de una línea celular de adenocarcinoma de pulmón NIH H820 (control positivo), una línea celular HEK293, una línea celular de adenocarcinoma de pulmón Calu-3 (control negativo), una línea celular de carcinoma de mama humano ZR75-1 (control negativo), una línea celular de carcinoma de mama humano MCF7 (control negativo) y una línea celular de carcinoma de mama humano T47D (control negativo) se fraccionaron con SDS-PAGE y se sometieron a inmunoelctrotransferencia con el anticuerpo anti-PD-L1 SP263 usando técnicas estándar (véase el protocolo de detección con OptiView DAB).

Como se muestra en la figura 3, SP263 se unió a una proteína de ~45-55 kDa que corresponde a la proteína PD-L1 humana. La proteína PD-L1 de 45-55 kDa se detectó en células de adenocarcinoma de pulmón NIH H820 (que son conocidas por presentar niveles elevados de PD-L1), y estuvo ausente en los 4 controles negativos. Estos resultados muestran asimismo que el anticuerpo SP263, además de unirse específicamente al PD-L1 humano, es capaz de detectar los bajos niveles endógenos de PD-L1 en células HEK293 (que derivan del riñón). Los resultados del ensayo de inmunoelctrotransferencia refuerzan los resultados de IHC mostrados en la figura 2.

Los estudios ELISA se realizaron con el anticuerpo SP263 para evaluar la unión al inmunógeno peptídico inmovilizado (aa272-290 de PD-L1 humano). Un resumen de los resultados se muestra en la figura 10. La CE_{50} del anticuerpo SP263 es $1,5 \times 10^{-11}$ M, lo que demuestra la alta potencia del anticuerpo con respecto a la unión al epítipo de PD-L1.

Ejemplo 4: El anticuerpo anti-PD-L1 humano SP263 presenta una especificidad de unión superior en comparación con el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N®

El anticuerpo E1L3N® (Cell Signaling Technology, MA) es un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 humano de conejo disponible comercialmente que se reconoce por sus propiedades de unión mejoradas (especificidad y sensibilidad), ayudando de este modo a la detección de polipéptidos PD-L1 humanos en muestras biológicas (por ejemplo, biopsias de tejidos). Véase <http://www.cellsignal.com/contents/science-cancer-research/pivotal-tumor-immunology-targets-pd-l1/pd-li-signaling>. Los anticuerpos SP263 y E1L3N® se dirigen ambos a los epítipos cercanos a la región C-terminal del PD-L1 humano y, por tanto, se unen al dominio intracelular de PD-L1.

Se aplicó el anticuerpo anti-PD-L1 SP263 (0,44 µg/ml a menos que se especifique de otro modo) sobre muestras

FFPE de tejido de estómago, nervio, riñón, carcinoma de células transicionales de vejiga, carcinoma ductal de mama y carcinoma de células escamosas de pulmón. La inmunohistoquímica se realizó en BenchMark Ultra (Ventana Medical System) usando acondicionamiento celular StdCC1 con el kit de detección OptiView. Los experimentos de IHC correspondientes con el anticuerpo E1L3N® se realizaron de acuerdo con los protocolos del fabricante.

Como se muestra en la figura 6, se analizaron SP263 y E1L3N® a diferentes concentraciones. E1L3N® presentó una tinción de fondo importante en el tejido nervioso FFPE a concentraciones de tan solo 0,44 µg/ml. Por el contrario, el anticuerpo SP263 presentó relativamente poca tinción de fondo en el tejido nervioso FFPE a todas las concentraciones ensayadas. Por ejemplo, la intensidad de la tinción de fondo en el tejido nervioso FFPE con el anticuerpo SP263 a 28 µg/ml fue similar a la observada con el anticuerpo E1L3N® a 0,11 µg/ml. Además, la tinción de fondo en el tejido estomacal FFPE con el anticuerpo SP263 a 28 µg/ml fue más débil en comparación con la observada con el E1L3N® a la misma concentración.

El anticuerpo E1L3N® muestra una tinción nuclear o citoplasmática no específica en muestras de tejido de estómago, riñón, carcinoma de células transicionales de vejiga, carcinoma ductal de mama y carcinoma de células escamosas de pulmón (véanse las flechas en la figura 7). Por el contrario, no se observó tinción no específica con el anticuerpo SP263 en ninguna de las muestras de tejido correspondientes (véase la figura 7), que se corresponde con la expresión membranosa de PD-L1 descrita en Ghebeh *et al.*, *Neoplasia* 8(3):190-198 (2006). Además, SP263 mostró una tinción intensa en las muestras de tejido de carcinoma de células transicionales de vejiga, carcinoma ductal de mama y carcinoma de células escamosas de pulmón y ninguna tinción en el control negativo, es decir, el tejido de estómago. Véase la figura 7. Estos resultados demuestran que los anticuerpos contra PD-L1 de la presente divulgación presentan una especificidad superior con respecto a otros anticuerpos contra PD-L1 disponibles comercialmente que se dirigen a epítomos similares en la región C-terminal del PD-L1 humano. Por tanto, los anticuerpos contra PD-L1 de la presente divulgación son útiles en procedimientos para detectar niveles de polipéptidos PD-L1 en una muestra biológica y diagnosticar cáncer en un sujeto.

Ejemplo 5: El anticuerpo anti-PD-L1 humano SP263 muestra una sensibilidad de detección incrementada en comparación con el anticuerpo anti-PD-L1 E1L3N®

Se aplicó el anticuerpo anti-PD-L1 SP263 (0,44 µg/ml) sobre muestras de tejido FFPE de placenta amígdalas, carcinoma de células escamosas de cuello uterino, linfoma de Hodgkin, adenocarcinoma de páncreas, adenocarcinoma de próstata, carcinoma de células escamosas de piel y carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM). La inmunohistoquímica se realizó en BenchMark Ultra (Ventana Medical System) usando acondicionamiento celular StdCC1 con el kit de detección OptiView. Los experimentos de IHC correspondientes con el anticuerpo E1L3N® se realizaron de acuerdo con los protocolos del fabricante.

Como se muestra en la figura 5, se analizaron SP263 y E1L3N® a diferentes concentraciones. E1L3N® presentó tinción detectable en tejido de placenta FFPE a concentraciones de tan solo 0,44 µg/ml. Por el contrario, el anticuerpo SP263 generó una señal de moderada a fuerte en el tejido de placenta FFPE a todas las concentraciones ensayadas. Por ejemplo, la intensidad de la señal de PD-L1 en el tejido de placenta FFPE con el anticuerpo SP263 a 0,44 µg/ml fue similar a la observada con el anticuerpo E1L3N® a 28 µg/ml.

Además, hubo un incremento sustancial de la intensidad de la señal de PD-L1 generada por el anticuerpo SP263 en muestras de tejido de amígdalas, carcinoma de células escamosas de cuello uterino, linfoma de Hodgkin y carcinoma de células escamosas de la piel en comparación con la observada en las muestras de tejido correspondientes que se incubaron con el anticuerpo E1L3N® a la misma concentración ensayada (véase la figura 8). La señal de PD-L1 generada por el anticuerpo SP263 en muestras de tejido de adenocarcinoma de páncreas y de adenocarcinoma de próstata fue similar a la observada con el anticuerpo E1L3N® (véase la figura 8). Finalmente, la intensidad de la señal de PD-L1 generada por el anticuerpo SP263 en muestras de tejido de CPNM fue sistemáticamente mayor que la observada en muestras de tejido de CPNM que se incubaron con el anticuerpo E1L3N® a la misma concentración ensayada (compárense las figuras 9F-9J con las figuras 9A-9E).

Estos resultados demuestran que los anticuerpos contra PD-L1 de la presente divulgación son significativamente más sensibles en la detección de niveles de polipéptidos PD-L1 en muestras de tejido en comparación con otros anticuerpos contra PD-L1 disponibles comercialmente que se dirigen a epítomos similares en la región C-terminal de PD-L1 humano. Por tanto, los anticuerpos contra PD-L1 de la presente divulgación son útiles en procedimientos para detectar niveles de polipéptidos PD-L1 en una muestra biológica y diagnosticar cáncer en un sujeto.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Spring BioScience Corporation

5 <120> ANTICUERPOS CONTRA PD-L1 Y USOS DE LOS MISMOS

<130> P32151-WO

10 <150> US 62/004.572
<151> 05/29/2014

<150> US 62/069.420
<151> 10/28/2014

15 <160> 35

<170> PatentIn versión 3,5

20 <210> 1
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Fragmento de PDL1 humano

<400> 1

Cys Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu
1 5 10 15

Glu Glu Thr

30 <210> 2
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de HC de SP263

<400> 2

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

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn His Ala
20 25 30

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

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

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met

ES 2 753 360 T3

65					70					75					80
Thr	Ser	Pro	Thr	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Arg
				85					90					95	

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

Ser Ser

<210>	3
<211>	112
<212>	PRT
<213>	Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de LC de SP263 (kappa)

<400> 3

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

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

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

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

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

Val	Cys	Asp	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ile	Gly	Gly	Glu	Ser	Ser
				85					90					95	

Asn Asn Asp Gly Ile Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210>	4
<211>	113
<212>	PRT
<213>	Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de HC de J45H2L4

<400> 4

ES 2 753 360 T3

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

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

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

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

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Ala Val Asp Leu Lys Met Thr
65 70 75 80

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

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

Ser

<210> 5

<211> 110

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de LC de J45H2L4 (kappa)

<400> 5

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

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Glu Ser Ser Ser Asp

ES 2 753 360 T3

		85		90		95
		Asp Gly Ile Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys				
		100		105		110
		<210> 6				
		<211> 113				
5		<212> PRT				
		<213> Secuencia artificial				
		<220>				
		<223> Secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de HC de J27H6L4				
10		<400> 6				
		Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro				
		1	5	10		15
		Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser His Ala				
		20	25	30		
		Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly				
		35	40	45		
		Thr Ile Asn Ser Asp Ser His Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly				
		50	55	60		
		Arg Phe Thr Ser Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Leu Thr				
		65	70	75		80
		Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Ile				
		85	90	95		
		Phe Ser Ser Ser Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser				
		100	105	110		
		Ser				
15		<210> 7				
		<211> 110				
		<212> PRT				
		<213> Secuencia artificial				
		<220>				
20		<223> Secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de LC de J27H6L4 (kappa)				
		<400> 7				
		Val Met Thr Gln Thr Ser Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr				
25		1	5	10		15

ES 2 753 360 T3

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Ser Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val Val Cys
65 70 75 80

Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ile Gly Gly Glu Ser Ser Asn Thr
85 90 95

Asp Gly Ile Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Glu
100 105 110

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

<220>
10 <223> Secuencia consenso de CDR1

<220>
<221> X
<222> (1)..(1)
15 <223> N o S

<220>
<221> X
<222> (2)..(2)
20 <223> H o N

<400> 8

Xaa Xaa Ala Ile Ser
1 5

25 <210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Secuencia consenso de CDR2 de cadena pesada

<220>
<221> X
35 <222> (6)..(6)
<223> T o S

<220>
<221> X
40 <222> (8)..(8)
<223> T o I

<220>
 <221> X
 <222> (10)..(10)
 <223> Y o S
 5
 <220>
 <221> X
 <222> (14)..(14)
 <223> P o A
 10
 <400> 9

Thr Ile Asn Ser Asp Xaa His Xaa Tyr Xaa Ala Thr Trp Xaa Lys Gly
1 5 10 15
 15 <210> 10
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Secuencia consenso de CDR3 de cadena pesada

 <220>
 <221> X
 25 <222> (2)..(2)
 <223> I o L

 <220>
 <221> X
 30 <222> (6)..(6)
 <223> S o T

 <400> 10

Arg Xaa Phe Ser Ser Xaa Asn Ile
1 5
 35 <210> 11
 <211> 13
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia consenso de CDR1 de cadena ligera
 45 <220>
 <221> X
 <222> (8)..(8)
 <223> N o K
 50 <220>
 <221> X
 <222> (9)..(9)
 <223> N o D
 55 <400> 11

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Xaa Xaa Asn Trp Leu Ser
1 5 10
 60 <210> 12
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR2 de cadena ligera

5 <400> 12

Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

<210> 13
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia consenso de CDR3 de cadena ligera

<220>
 <221> X
 <222> (1)..(1)
 20 <223> L o I

<220>
 <221> X
 <222> (7)..(7)
 25 <223> N o S

<220>
 <221> X
 <222> (8)..(8)
 30 <223> N, T o D

<400> 13

Xaa Gly Gly Glu Ser Ser Xaa Xaa Asp Gly Ile Ala
 1 5 10

35 <210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> CDR1 de cadena pesada

<400> 14

45 Asn His Ala Ile Ser
 1 5

<210> 15
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada

55 <400> 15

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

60 <210> 16
 <211> 8

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> CDR3 de cadena pesada

 <400> 16

Arg Ile Phe Ser Ser Ser Asn Ile
 1 5
 10
 <210> 17
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> CDR1 de cadena ligera

 <400> 17
 20
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Asn Asn Asn Trp Leu Ser
 1 5 10

 <210> 18
 <211> 12
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> CDR3 de cadena ligera
 30
 <400> 18

Ile Gly Gly Glu Ser Ser Asn Asn Asp Gly Ile Ala
 1 5 10
 35
 <210> 19
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> CDR1 de cadena pesada

 <400> 19

Ser Asn Ala Ile Ser
 45 1 5

 <210> 20
 <211> 16
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada
 55
 <400> 20

Thr Ile Asn Ser Asp Ser His Ile Tyr Ser Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 60
 <210> 21
 <211> 8

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> CDR3 de cadena pesada

 <400> 21

Arg Leu Phe Ser Ser Thr Asn Ile
 1 5
 10
 <210> 22
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> CDR1 de cadena ligera

 <400> 22
 20
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Lys Asp Asn Trp Leu Ser
 1 5 10

 <210> 23
 <211> 12
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> CDR3 de cadena ligera
 30
 <400> 23

Leu Gly Gly Glu Ser Ser Ser Asp Asp Gly Ile Ala
 1 5 10
 35
 <210> 24
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> CDR1 de cadena pesada

 <400> 24
 45
Ser His Ala Ile Ser
 1 5

 <210> 25
 <211> 16
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada
 55
 <400> 25

Thr Ile Asn Ser Asp Ser His Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 60
 <210> 26
 <211> 12

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR3 de cadena ligera

<400> 26

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

<210> 27
<211> 384
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

Ala Pro Thr Lys Ala Pro Asp Val Phe Pro Ile Ile Ser Gly Cys Arg
1 5 10 15

His Pro Lys Asp Asn Ser Pro Val Val Leu Ala Cys Leu Ile Thr Gly
20 25 30

Tyr His Pro Thr Ser Val Thr Val Thr Trp Tyr Met Gly Thr Gln Ser
35 40 45

Gln Pro Gln Arg Thr Phe Pro Glu Ile Gln Arg Arg Asp Ser Tyr Tyr
50 55 60

Met Thr Ser Ser Gln Leu Ser Thr Pro Leu Gln Gln Trp Arg Gln Gly
65 70 75 80

Glu Tyr Lys Cys Val Val Gln His Thr Ala Ser Lys Ser Lys Lys Glu
85 90 95

Ile Phe Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro
100 105 110

Thr Ala Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala
115 120 125

Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys
130 135 140

Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu
145 150 155 160

Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Tyr Leu Leu Thr Pro Ala
165 170 175

Val Gln Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe Val
180 185 190

ES 2 753 360 T3

Val Gly Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala Gly
195 200 205

Lys Val Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His Ser
210 215 220

Asn Gly Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu
225 230 235 240

Trp Asn Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu
245 250 255

Pro Pro Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro
260 265 270

Val Lys Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala
275 280 285

Ala Ser Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile
290 295 300

Leu Leu Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe
305 310 315 320

Ala Pro Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala
325 330 335

Trp Ser Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr
340 345 350

Tyr Thr Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala
355 360 365

Ser Arg Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His Gly Pro Met Lys
370 375 380

<210> 28
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

ES 2 753 360 T3

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

ES 2 753 360 T3

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 29
<211> 326
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

ES 2 753 360 T3

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 30
<211> 377
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

ES 2 753 360 T3

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
 100 105 110
 Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
 115 120 125
 Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
 130 135 140
 Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 145 150 155 160
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 165 170 175
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 180 185 190
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
 195 200 205
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 210 215 220
 Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 225 230 235 240
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 245 250 255
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 260 265 270
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 275 280 285
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 290 295 300

ES 2 753 360 T3

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 31
<211> 452
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

10 Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn
1 5 10 15

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

Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Leu Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser
35 40 45

Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys
50 55 60

Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln
65 70 75 80

Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn
85 90 95

Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys
100 105 110

Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg
115 120 125

Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile
130 135 140

ES 2 753 360 T3

Gln	Val	Ser	Trp	Leu	Arg	Glu	Gly	Lys	Gln	Val	Gly	Ser	Gly	Val	Thr		
145					150					155					160		
Thr	Asp	Gln	Val	Gln	Ala	Glu	Ala	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Thr	Thr	Tyr		
				165					170						175		
Lys	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Lys	Glu	Ser	Asp	Trp	Leu	Gly	Gln		
			180					185					190				
Ser	Met	Phe	Thr	Cys	Arg	Val	Asp	His	Arg	Gly	Leu	Thr	Phe	Gln	Gln		
		195					200					205					
Asn	Ala	Ser	Ser	Met	Cys	Val	Pro	Asp	Gln	Asp	Thr	Ala	Ile	Arg	Val		
	210					215					220						
Phe	Ala	Ile	Pro	Pro	Ser	Phe	Ala	Ser	Ile	Phe	Leu	Thr	Lys	Ser	Thr		
225					230					235					240		
Lys	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Thr	Tyr	Asp	Ser	Val	Thr		
			245					250						255			
Ile	Ser	Trp	Thr	Arg	Gln	Asn	Gly	Glu	Ala	Val	Lys	Thr	His	Thr	Asn		
		260						265					270				
Ile	Ser	Glu	Ser	His	Pro	Asn	Ala	Thr	Phe	Ser	Ala	Val	Gly	Glu	Ala		
		275					280					285					
Ser	Ile	Cys	Glu	Asp	Asp	Trp	Asn	Ser	Gly	Glu	Arg	Phe	Thr	Cys	Thr		
	290					295					300						
Val	Thr	His	Thr	Asp	Leu	Pro	Ser	Pro	Leu	Lys	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg		
305					310					315					320		
Pro	Lys	Gly	Val	Ala	Leu	His	Arg	Pro	Asp	Val	Tyr	Leu	Leu	Pro	Pro		
				325					330					335			
Ala	Arg	Glu	Gln	Leu	Asn	Leu	Arg	Glu	Ser	Ala	Thr	Ile	Thr	Cys	Leu		
			340					345					350				
Val	Thr	Gly	Phe	Ser	Pro	Ala	Asp	Val	Phe	Val	Gln	Trp	Met	Gln	Arg		
		355					360					365					
Gly	Gln	Pro	Leu	Ser	Pro	Glu	Lys	Tyr	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Met	Pro		
	370					375					380						
Glu	Pro	Gln	Ala	Pro	Gly	Arg	Tyr	Phe	Ala	His	Ser	Ile	Leu	Thr	Val		
385					390					395					400		

ES 2 753 360 T3

Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Ala His
405 410 415

Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr
420 425 430

Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala
435 440 445

Gly Thr Cys Tyr
450

<210> 32
<211> 327
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

10 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

ES 2 753 360 T3

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 33
<211> 353
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Ala Ser Pro Thr Ser Pro Lys Val Phe Pro Leu Ser Leu Cys Ser Thr
1 5 10 15

Gln Pro Asp Gly Asn Val Val Ile Ala Cys Leu Val Gln Gly Phe Phe
20 25 30

Pro Gln Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp Ser Glu Ser Gly Gln Gly Val
35 40 45

ES 2 753 360 T3

Thr Ala Arg Asn Phe Pro Pro Ser Gln Asp Ala Ser Gly Asp Leu Tyr
 50 55 60

Thr Thr Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gln Cys Leu Ala Gly
 65 70 75 80

Lys Ser Val Thr Cys His Val Lys His Tyr Thr Asn Pro Ser Gln Asp
 85 90 95

Val Thr Val Pro Cys Pro Val Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro
 100 105 110

Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Cys Cys His Pro Arg Leu Ser
 115 120 125

Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu Leu Leu Gly Ser Glu Ala Asn
 130 135 140

Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg Asp Ala Ser Gly Val Thr Phe
 145 150 155 160

Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser Ala Val Gln Gly Pro Pro Glu
 165 170 175

Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys
 180 185 190

Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr Phe Thr Cys Thr Ala Ala Tyr
 195 200 205

Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala Thr Leu Ser Lys Ser Gly Asn
 210 215 220

Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu
 225 230 235 240

Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg Gly Phe Ser
 245 250 255

Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro
 260 265 270

Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg Gln Glu Pro Ser Gln Gly
 275 280 285

Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp
 290 295 300

ES 2 753 360 T3

Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His Glu Ala Leu
305 310 315 320

Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala Gly Lys Pro
325 330 335

Thr His Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys
340 345 350

Tyr

<210> 34
<211> 340
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

10 Ala Ser Pro Thr Ser Pro Lys Val Phe Pro Leu Ser Leu Asp Ser Thr
1 5 10 15

Pro Gln Asp Gly Asn Val Val Val Ala Cys Leu Val Gln Gly Phe Phe
20 25 30

Pro Gln Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp Ser Glu Ser Gly Gln Asn Val
35 40 45

Thr Ala Arg Asn Phe Pro Pro Ser Gln Asp Ala Ser Gly Asp Leu Tyr
50 55 60

Thr Thr Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gln Cys Pro Asp Gly
65 70 75 80

Lys Ser Val Thr Cys His Val Lys His Tyr Thr Asn Pro Ser Gln Asp
85 90 95

Val Thr Val Pro Cys Pro Val Pro Pro Pro Pro Cys Cys His Pro
100 105 110

Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu Leu Leu Gly Ser
115 120 125

Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg Asp Ala Ser Gly
130 135 140

Ala Thr Phe Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser Ala Val Gln Gly
145 150 155 160

ES 2 753 360 T3

Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val Ser Ser Val Leu
165 170 175

Pro Gly Cys Ala Gln Pro Trp Asn His Gly Glu Thr Phe Thr Cys Thr
180 185 190

Ala Ala His Pro Glu Leu Lys Thr Pro Leu Thr Ala Asn Ile Thr Lys
195 200 205

Ser Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser
210 215 220

Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg
225 230 235 240

Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln
245 250 255

Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg Gln Glu Pro
260 265 270

Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala
275 280 285

Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His
290 295 300

Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Met Ala
305 310 315 320

Gly Lys Pro Thr His Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp
325 330 335

Gly Thr Cys Tyr
340

<210> 35
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

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

ES 2 753 360 T3

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo contra PD-L1 aislado que comprende una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada (HC) y una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera (LC), en el que la HC comprende (a) una HC CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos **NHAIS** (SEQ ID NO: 14); y (b) una HC CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos **TINSDTHTYYATWPKG** (SEQ ID NO: 15); y (c) una HC CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos **RIFSSNI** (SEQ ID NO: 16); y la LC comprende (a) una LC CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos **QASQSIYNNWLS** (SEQ ID NO: 17); y (b) una LC CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos **LASTLAS** (SEQ ID NO: 12); y (c) una LC CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos **IGGESSNNDGIA** (SEQ ID NO: 18), y en el que el anticuerpo se une a un epítipo de PD-L1 humano que comprende la secuencia de aminoácidos **CGIQDTNSKKQSDTHLEET** (SEQ ID NO: 1) y/o tiene una concentración que produce la mitad del efecto máximo posible (CE_{50}) de al menos $1,5 \times 10^{-11}$ M.
2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de HC comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y en la que la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.
4. Un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en Fab, F(ab')₂, Fab', scFv y Fv.
5. Un procedimiento para detectar PD-L1 en una muestra biológica que comprende poner en contacto la muestra con el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o el fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 4, y detectar un complejo formado por la unión del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno a PD-L1.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la muestra comprende una célula o una muestra de tejido.
7. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la muestra es una muestra tumoral.
8. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la muestra se ha obtenido de un sujeto al que se ha diagnosticado que tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de tener cáncer, y en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinoma de células transicionales de vejiga, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma ductal de mama, linfoma de Hodgkin, adenocarcinoma de páncreas, adenocarcinoma de próstata, carcinoma de células escamosas de cuello uterino, carcinoma de células escamosas de la piel y carcinoma de pulmón no microcítico.
9. Un procedimiento para detectar una célula patológica en una muestra aislada de un sujeto, que comprende
 - (a) detectar el nivel de PD-L1 en una muestra biológica del sujeto mediante la detección de un complejo formado por el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o el fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 4 que se une a PD-L1 en la muestra; y
 - (b) comparar los niveles de PD-L1 observados en la etapa (a) con los niveles de PD-L1 observados en una muestra biológica de control;
 en el que la célula patológica se detecta cuando el nivel de PD-L1 está elevado en comparación con el observado en la muestra biológica de control y la célula patológica no se detecta cuando el nivel de PD-L1 no está elevado en comparación con el observado en la muestra biológica de control.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la muestra biológica del sujeto comprende una o más de una muestra aislada de pulmón, riñón, vejiga, mama, páncreas, próstata, cuello uterino o piel.
11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, o el procedimiento de la reivindicación 9 o 10, en el que la detección comprende uno o más de inmunohistoquímica (IHC), inmunoelectrotransferencia, citometría de flujo o ELISA.
12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el sujeto es un mamífero, opcionalmente en el que el mamífero se selecciona del grupo de: un murino, felino, cánido, ovino, bovino, simio y un humano.
13. Un kit para detectar PD-L1 que comprende un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o el fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 4, e instrucciones de uso.



Figura 1

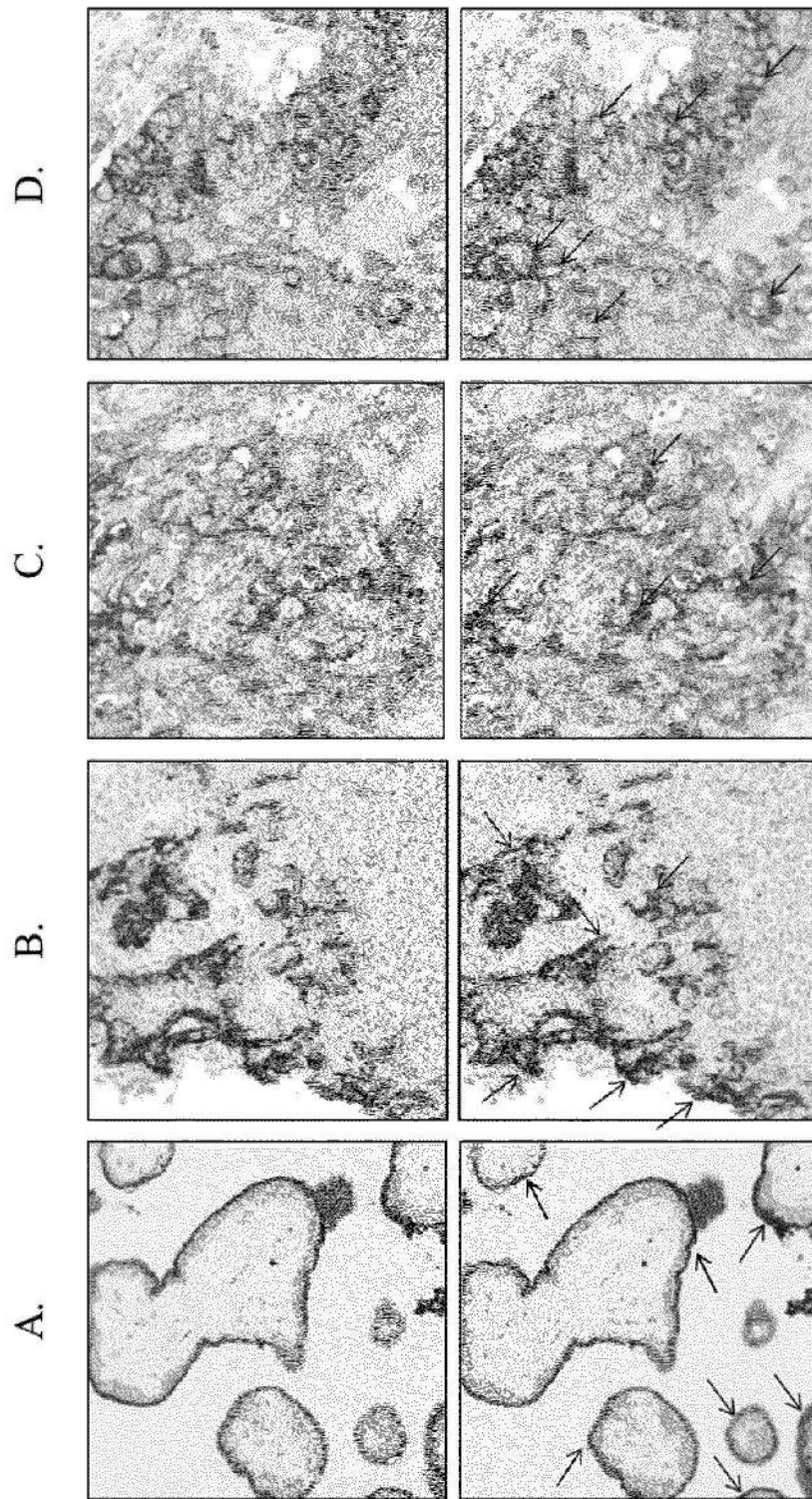
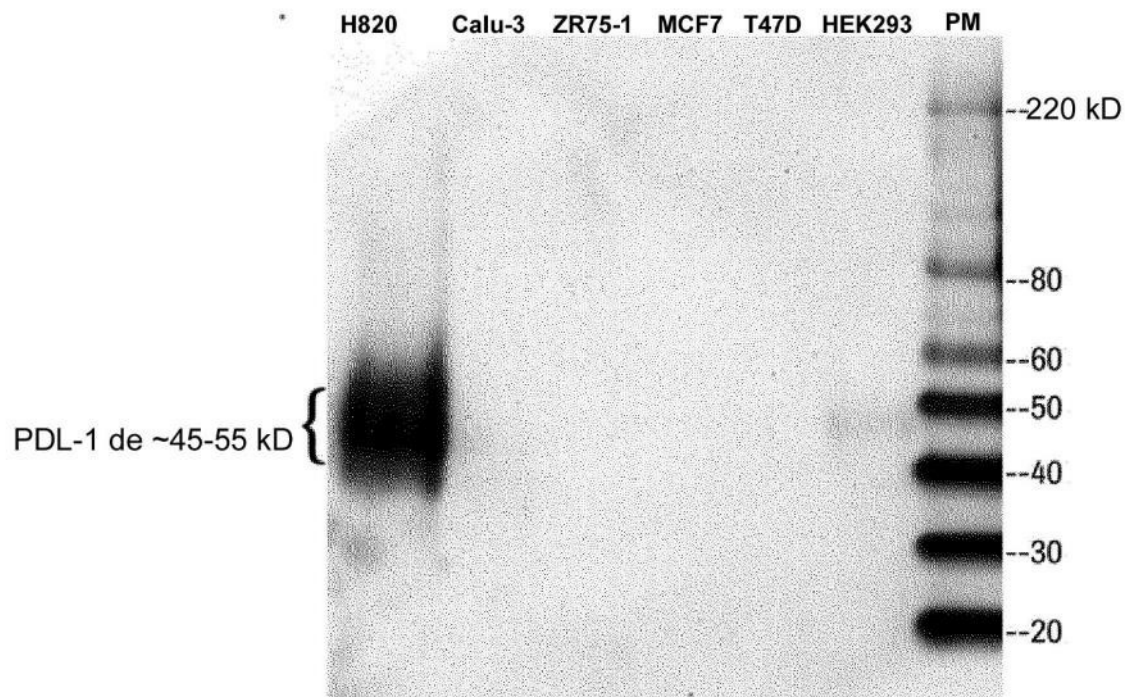


Fig. 2

Figura 3



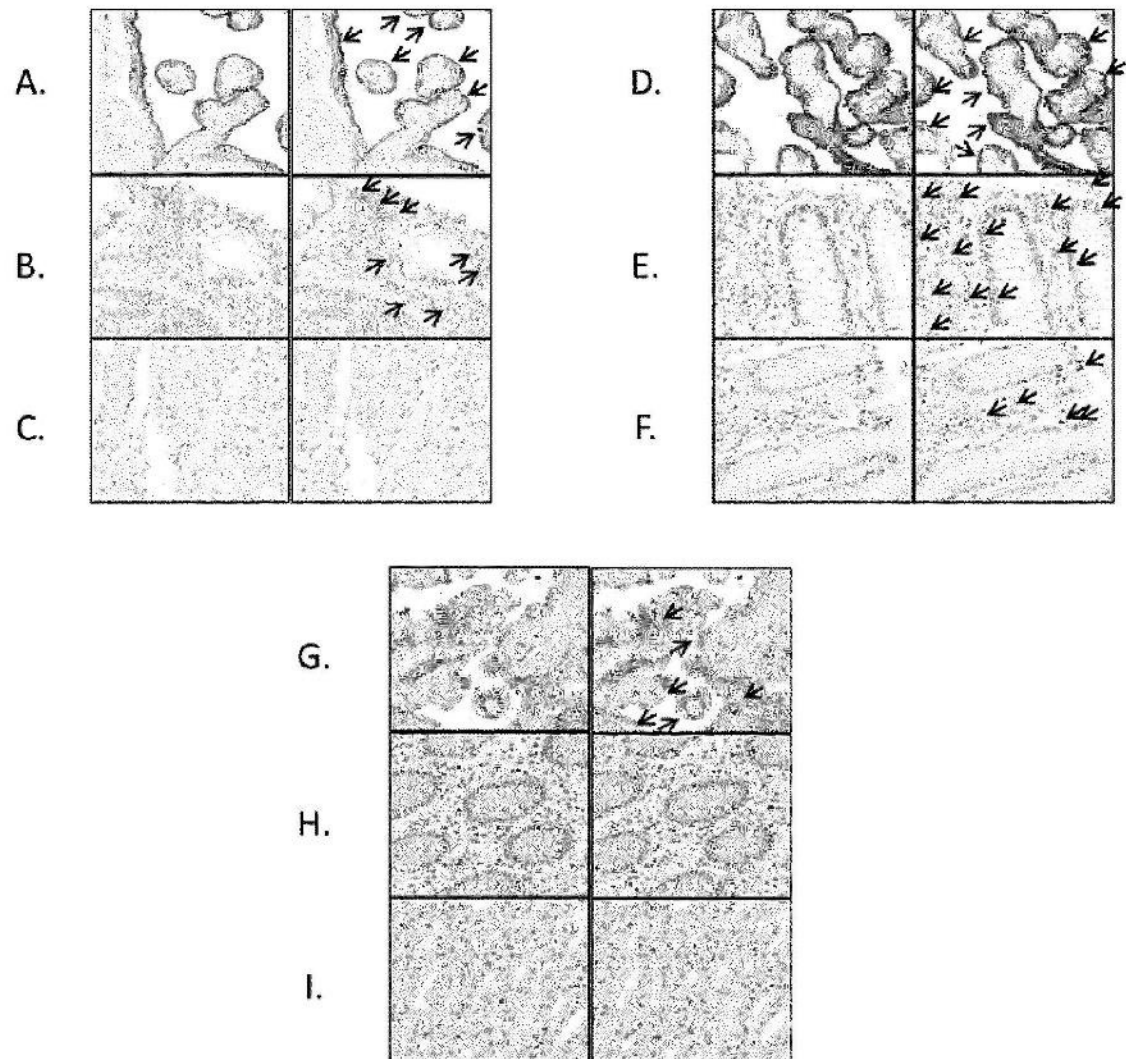


Fig. 4

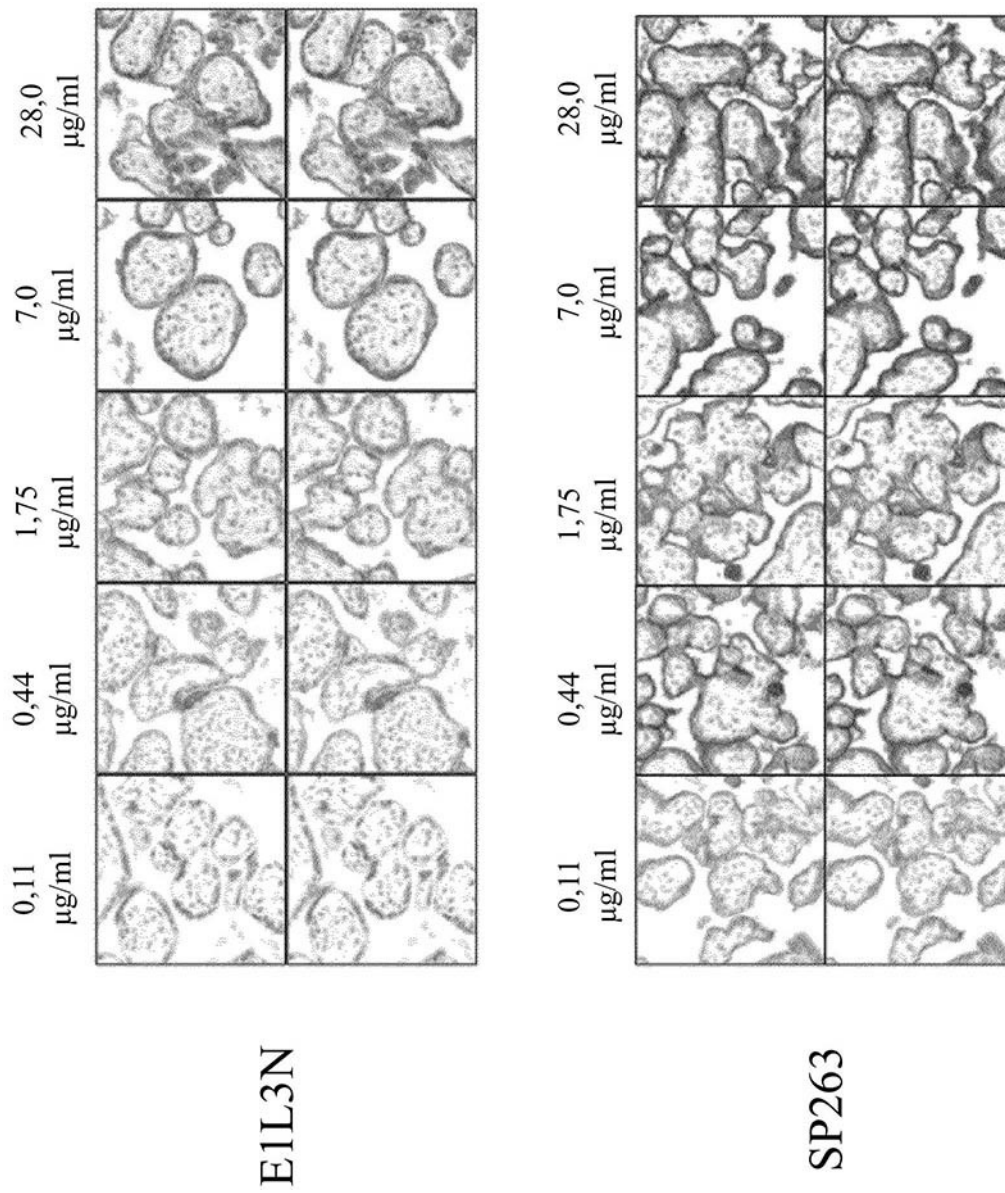


Fig. 5

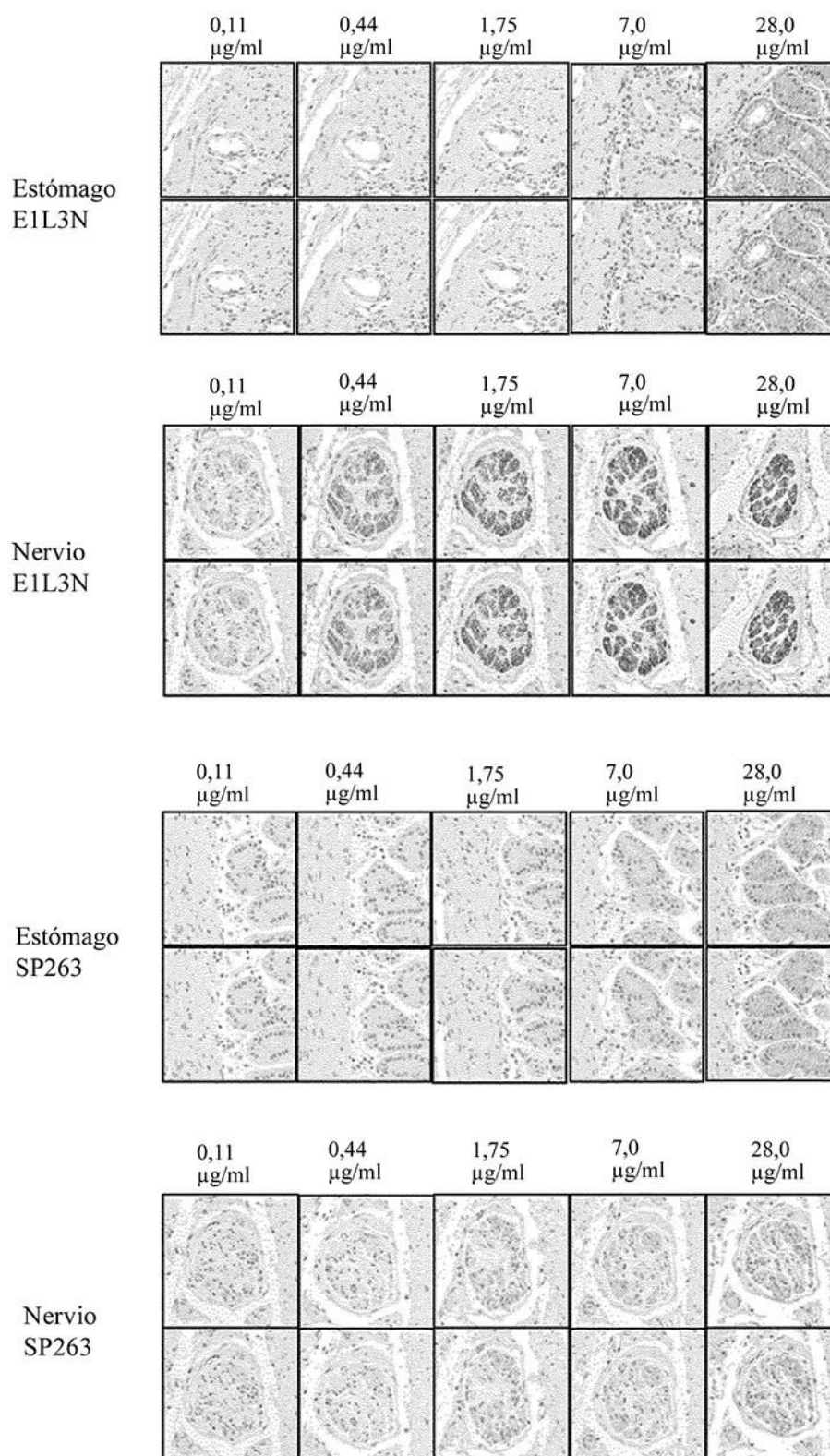


Fig. 6

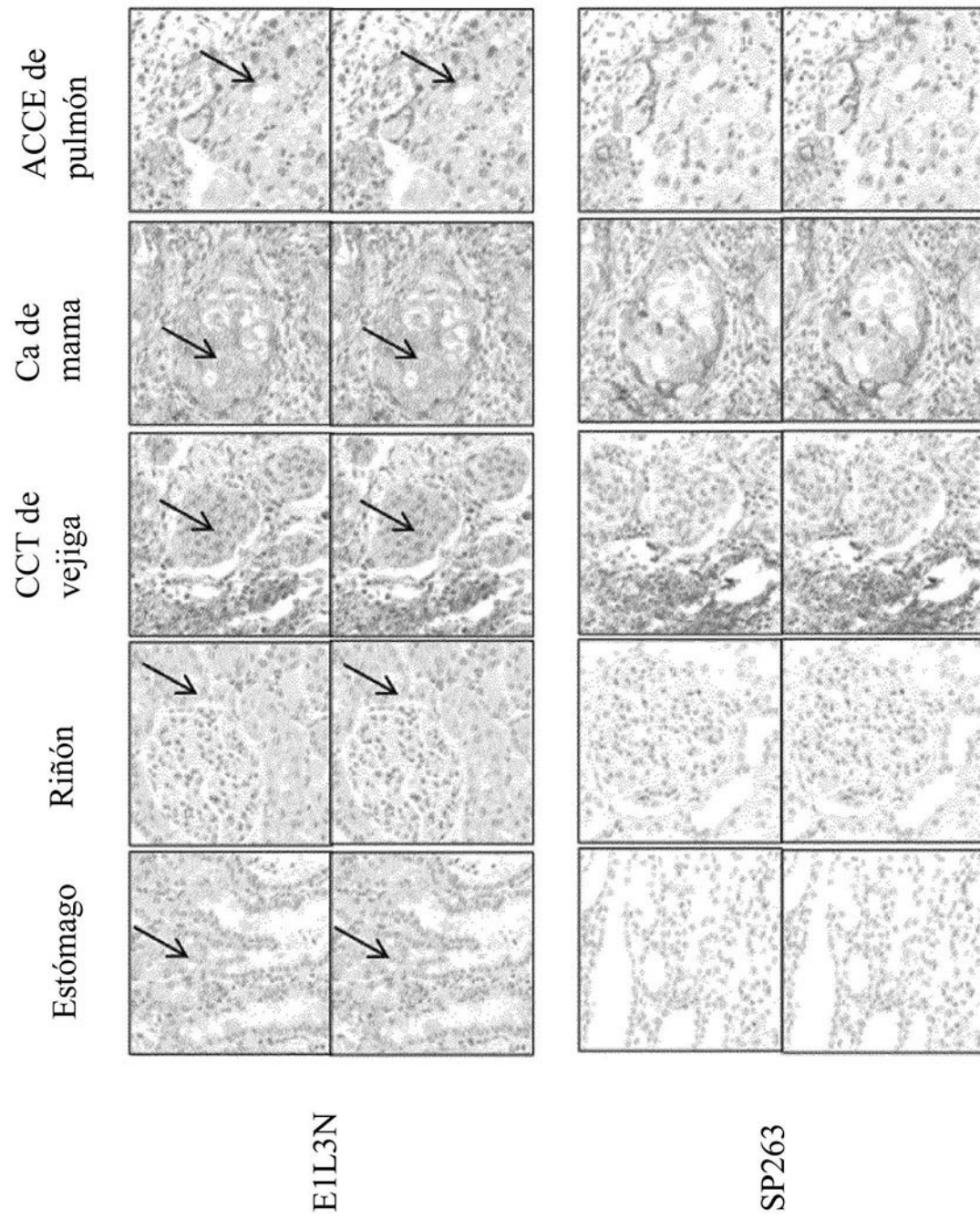


Fig. 7

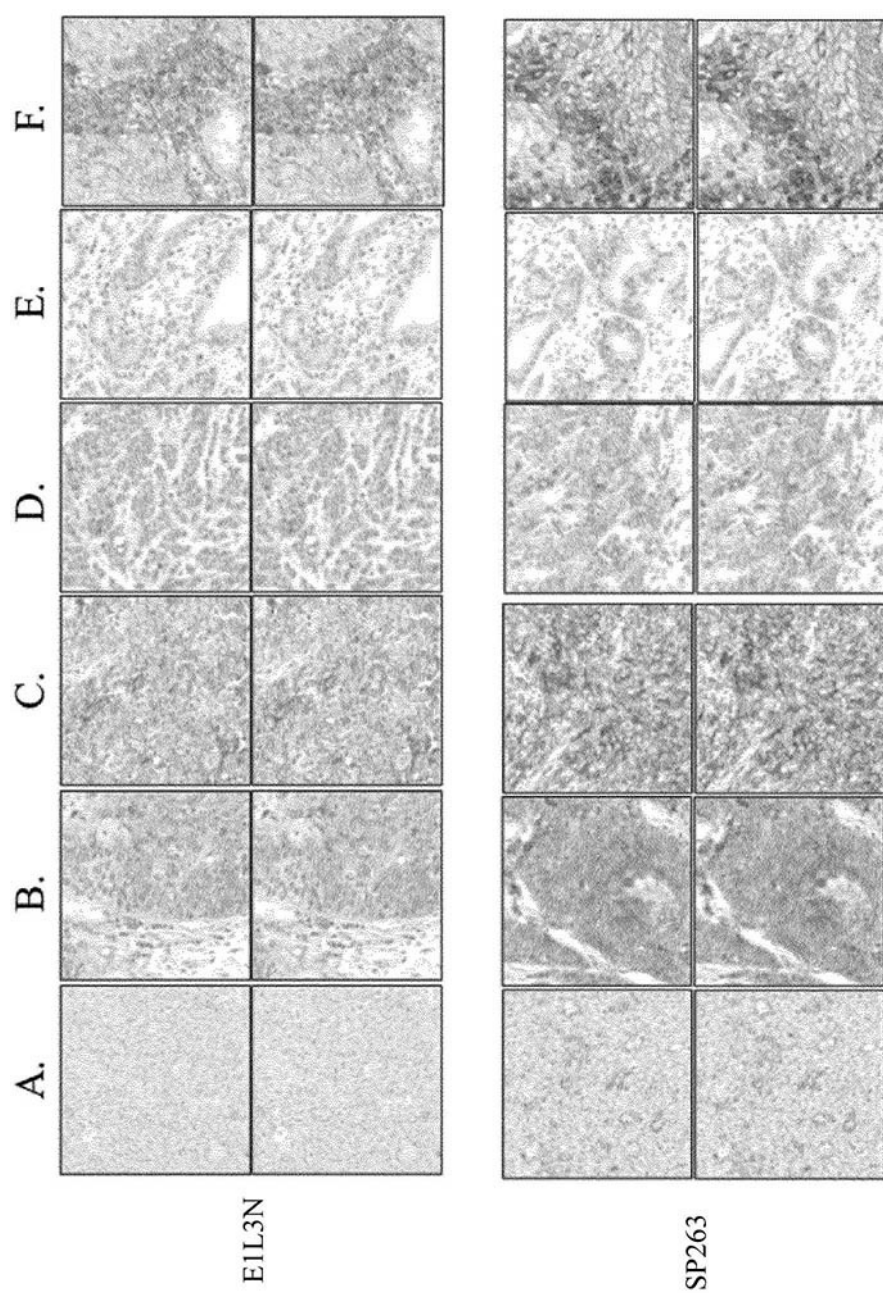


Fig. 8

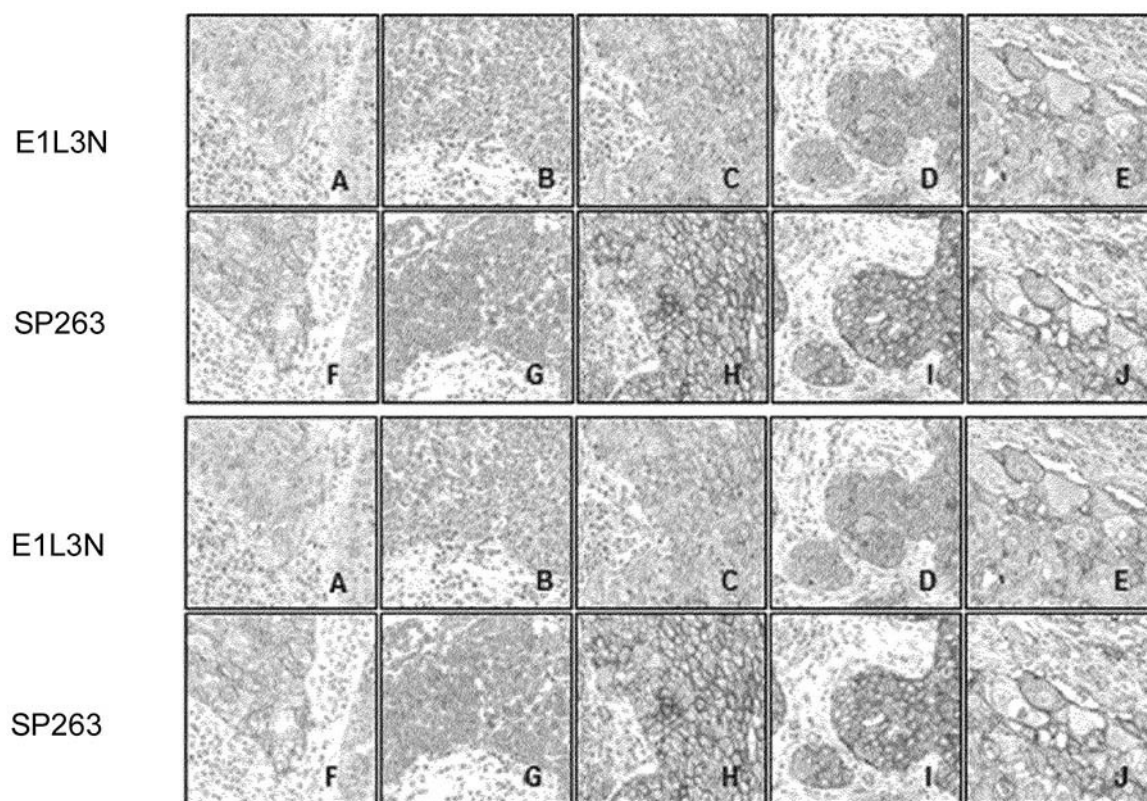


Fig. 9A-9J

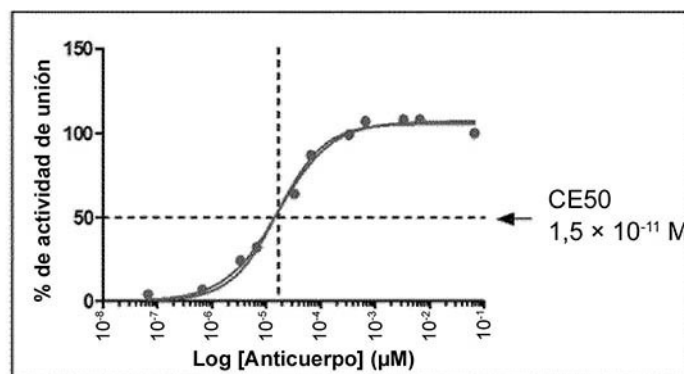


Fig. 10