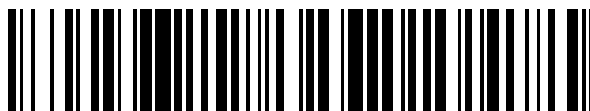


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 429**

51 Int. Cl.:

A61K 31/337 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2014** **PCT/US2014/070974**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015** **WO15095404**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2014** **E 14824700 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019** **EP 3083686**

54 Título: **Procedimientos de tratamiento de cánceres usando antagonistas de la unión al eje de PD-1 y taxanos**

30 Prioridad:

17.12.2013 US 201361917264 P

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

28.05.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

KIM, JEONG y
CHEUNG, JEANNE

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 763 429 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de tratamiento de cánceres usando antagonistas de la unión al eje de PD-1 y taxanos

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a un anticuerpo antagonista de PD-L1 para su uso en procedimientos de tratamiento de cánceres y para potenciar la función inmunitaria en un individuo que tiene cáncer en combinación con nab-paclitaxel y carboplatino.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

La provisión de dos señales distintas a los linfocitos T es un modelo ampliamente aceptado para la activación de los linfocitos T en reposo por parte de células presentadoras de antígenos (APC). Este modelo proporciona además la discriminación entre la tolerancia autoinmunológica y no autoinmunológica. La señal primaria, o señal específica de antígeno, se transduce a través del receptor de linfocitos T (TCR) después del reconocimiento del péptido del xenoantígeno presentado en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). La segunda señal, o señal coestimuladora, se envía a los linfocitos T a través de moléculas coestimuladoras expresadas en APC, e induce a los linfocitos T a promover la expansión clonal, la secreción de citocinas y la función efectora. En ausencia de coestimulación, los linfocitos T se pueden volver insensibles a la estimulación antigénica, lo que da como resultado una respuesta tolerogénica a antígenos exógenos o endógenos.

20

25

En el modelo de dos señales, los linfocitos T reciben señales coestimuladoras secundarias positivas y negativas. La regulación de dichas señales positivas y negativas es fundamental para maximizar las respuestas inmunitarias protectoras del huésped, mientras se mantiene la tolerancia inmunológica y se previene la autoinmunidad. Las señales secundarias negativas parecen necesarias para la inducción de la tolerancia de linfocitos T, mientras que las señales positivas promueven la activación de linfocitos T. Si bien el modelo simple de dos señales aún proporciona una explicación válida para los linfocitos indiferenciados, la respuesta inmunitaria de un huésped es un proceso dinámico, y también se pueden proporcionar señales coestimuladoras a linfocitos T expuestos al antígeno.

30

35

El mecanismo de coestimulación es de interés terapéutico porque la manipulación de las señales coestimuladoras proporciona un medio para potenciar o terminar la respuesta inmunitaria celular. La disfunción o anergia de los linfocitos T se produce simultáneamente con una expresión inducida y mantenida del receptor inhibitor, el polipéptido de la muerte programada 1 (PD-1), que se une a ligandos que incluyen PD-L1 y PD-L2. PD-L1 se sobreexpresa en muchos tipos de cáncer y a menudo se asocia con un mal pronóstico. La mayoría de los linfocitos T infiltrantes de tumores expresan predominantemente PD-1, a diferencia de los linfocitos T en tejidos normales y los linfocitos T de sangre periférica, lo que indica que la regulación por incremento de PD-1 en linfocitos T reactivos al tumor puede contribuir al deterioro de las respuestas inmunitarias antitumorales. Esto se puede deber a la explotación de la señalización de PD-L1 mediada por células tumorales que expresan PD-L1 que interactúan con linfocitos T que expresan PD-1, lo que da como resultado la atenuación de la activación de los linfocitos T y la evasión de la vigilancia inmunitaria. Por lo tanto, la inhibición de la interacción de PD-L1/PD-1 puede potenciar la destrucción de tumores mediada por linfocitos T CD8+.

40

45

Zhang *et al.*, MOLECULAR IMMUNOLOGY, 45(5) 1470-6 (2008) enseña que los "agentes quimiopreventivos", a saber, paclitaxel, etopósido o 5-fluorouracilo, inducen la inducción de la expresión en la superficie de PD-L1 en células de cáncer de mama e inducen la expresión en la superficie de PD-L1 en células de cáncer de mama humano, que a continuación promovía la apoptosis de linfocitos T mediada por PD-L1. Ascierto *et al.*, SEMINARS IN ONCOLOGY, 37(5) 508-16 (2010) informa de que, en un modelo murino de cáncer pancreático, los anticuerpos anti-PD1 y PD-L1 inhibieron el crecimiento tumoral y se sugiere que la vía de PD1/PD-L1 "fue crucial para el crecimiento del cáncer pancreático". Ascierto también enseña que una combinación de gemcitabina con bloqueo de PD-1 ejercía un efecto antitumoral sinérgico sobre el cáncer pancreático.

50

Un tratamiento terapéutico óptimo puede combinar el bloqueo de la interacción de receptor de PD-1/ligando con un agente que inhibe directamente el crecimiento tumoral. Sigue existiendo la necesidad de un tratamiento óptimo para tratar, estabilizar, prevenir y/o retrasar el desarrollo de diversos cánceres.

55

SUMARIO DE LA INVENCION

60

La presente invención se refiere a un antagonista de la unión a PD-L1 para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del carcinoma de pulmón no microcítico en un individuo, en el que el antagonista de la unión a PD-L1 se administra en combinación con nab-paclitaxel y carboplatino, y en el que el antagonista de la unión a PD-L1 es un anticuerpo.

65

En algunos modos de realización, el antagonista de la unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1. En algunos modos de realización, el antagonista de la unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a B7-1. En algunos modos de realización, el antagonista de la unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 tanto a PD-1 como a B7-1. En algunos modos de realización, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: YW243.55.S70, MPDL3280A, MDX-1105 y MEDI4736. En algunos

modos de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de HVR-H1 de SEQ ID NO:19, una secuencia de HVR-H2 de SEQ ID NO:20 y una secuencia de HVR-H3 de SEQ ID NO:21; y una cadena ligera que comprende una secuencia de HVR-L1 de SEQ ID NO:22, una secuencia de HVR-L2 de SEQ ID NO:23 y una secuencia de HVR-L3 de SEQ ID NO:24. En algunos modos de realización, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, el individuo tiene cáncer o se ha diagnosticado de cáncer. En algunos modos de realización, las células cancerosas en el individuo expresan PD-L1.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, el tratamiento puede dar como resultado una respuesta en el individuo. En algunos modos de realización, la respuesta inmunitaria es una respuesta completa. En algunos modos de realización, la respuesta es una respuesta mantenida después de la interrupción del tratamiento. En algunos modos de realización, la respuesta es una respuesta completa que se mantiene después de la interrupción del tratamiento.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, el nab-paclitaxel (ABRAXANE®) se administra antes del antagonista de la unión al eje de PD-1, simultáneamente con el antagonista de la unión al eje de PD-1 o después del antagonista de la unión al eje de PD-1.

En algunos modos de realización, el antagonista de la unión al eje de PD-1 y/o el nab-paclitaxel se administran por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, tópica, oral, transdérmica, intraperitoneal, intraorbital, por implantación, por inhalación, por vía intratecal, intraventricular o intranasal.

Se debe entender que una, algunas o la totalidad de las propiedades de los diversos modos de realización descritos en el presente documento se pueden combinar para formar otros modos de realización de la presente invención. Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes para un experto en la técnica. Estos y otros modos de realización de la invención se describen adicionalmente mediante la descripción detallada que sigue.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIGURA 1 es un gráfico que muestra que la politerapia de anticuerpo anti-PD-L1 y paclitaxel + carboplatino demuestra un efecto antitumoral sinérgico en comparación con el anticuerpo de control o paclitaxel + carboplatino solo en el modelo de tumor colorrectal MC38 singénico en ratones C57BL/6. El gráfico muestra los ajustes de splines cúbicos de los volúmenes tumorales de cada grupo de tratamiento en función del tiempo. Un ajuste de splines cúbicos es un algoritmo matemático que elige la mejor curva suave que ajusta todos los datos por grupo de tratamiento. Los ratones con tumores MC38 subcutáneos establecidos de aproximadamente 100-200 mm³ se trataron con una dosis única de carboplatino a 80 mg/kg mediante inyección intraperitoneal (i.p.) más paclitaxel a 10 mg/kg inyectado por vía intravenosa (i.v.) y anticuerpo anti-gp120 o anti-PD-L1 (clon 25A1 mlgG2a.DANA) a 10 mg/kg administrado 3 veces a la semana durante 3 semanas. N = 10 ratones/grupo.

Las FIGURAS 2A y 2B son gráficos que muestran que la dexametasona (Dex) anula la eficacia de la monoterapia con el anticuerpo anti-PD-L1 (αPD-L1) en el modelo de tumor colorrectal MC38 singénico en ratones C57BL/6. La figura 2A muestra los ajustes de splines cúbicos de los volúmenes tumorales de cada grupo de tratamiento, mientras que la figura 2B muestra gráficos para ratones individuales (gráficos de Trellis) (las curvas negras muestran ajustes de splines cúbicos de los volúmenes tumorales para cada grupo de tratamiento). Cada gráfico en la figura 2B contiene una línea discontinua que representa el ajuste de splines cúbicos del grupo de control. Para la figura 2B, las líneas discontinuas horizontales a aproximadamente 300 mm³ son una referencia para el volumen de progresión (2x el volumen tumoral inicial). Un volumen tumoral por debajo de 32 mm³ (indicado por líneas discontinuas horizontales en la figura 2B) es visible, pero demasiado pequeño para que se mida con exactitud. Los ratones con tumores MC38 subcutáneos establecidos de aproximadamente 100-200 mm³ se trataron con una dosis única de solución salina o dexametasona a 4 mg/kg i.v. y, 12 horas después, se trataron con anticuerpo de control anti-gp120 o anti-PD-L1 (clon 25A1.mlgG2a.DANA) a 10 mg/kg i.p. 3 veces a la semana durante 3 semanas. N = 10 ratones/grupo.

La FIGURA 3 es un gráfico que muestra que la dexametasona inhibe las respuestas de los linfocitos T específicos de antígeno en un modelo de transferencia de linfocitos T y vacunación adoptivas de OTI. Los linfocitos T CD8+ se purificaron de ratones OTI Thy1.1 y se inyectaron i.v. a 2,5 millones de células/ratón. Al día siguiente, los ratones receptores se vacunaron i.p. con 250 ng de anticuerpo anti-DEC205 fusionado a ovoalbúmina de longitud completa, más una dosis única de solución salina o dexametasona a 4 mg/kg i.v. Dos días después, los ratones se sacrificaron y se contaron las células OTI CD8+ totales de los bazo mediante citometría de flujo. N = 5 ratones/grupo, cada símbolo representa un ratón individual. Valor de *p* calculado por la prueba de la *t* para datos independientes bilateral.

Las FIGURAS 4A y 4B son gráficos que muestran que la politerapia de anticuerpo anti-PD-L1 y nab-paclitaxel (ABRAXANE®, Abx) + carboplatino (Carbo) dio como resultado un potente efecto antitumoral sinérgico y logró respuestas completas duraderas (4/8 ratones) que duró más de 90 días en el modelo de tumor colorrectal MC38 singénico en ratones C57BL/6. El gráfico muestra el volumen tumoral en función del tiempo. La figura 4A muestra los ajustes de splines cúbicos de los volúmenes tumorales de cada grupo de tratamiento, mientras que la figura 4B muestra los gráficos de Trellis para

ratones individuales (las curvas negras muestran los ajustes de splines cúbicos de los volúmenes tumorales para cada grupo de tratamiento). Cada gráfico en la figura 4B contiene una línea discontinua que representa el ajuste de splines cúbicos del grupo de control. Para la figura 4B, las líneas discontinuas horizontales a aproximadamente 600 mm³ son una referencia para el volumen de progresión (2x el volumen tumoral inicial). Un volumen tumoral por debajo de 32 mm³ (indicado por líneas discontinuas horizontales en la figura 4B) es visible, pero demasiado pequeño para que se mida con exactitud. Los ratones con tumores MC38 subcutáneos establecidos de aproximadamente 300 mm³ se trataron con anticuerpo de control anti-gp120 o anticuerpo anti-PD-L1 (clon YW243.55.S70 mlgG2a.DANA) administrado por inyección i.p. a 10 mg/kg 3 veces a la semana durante 3 semanas, más solución salina o carboplatino a 75 mg/kg i.p. a la semana durante 3 semanas más ABRAXANE® a 15 mg/kg i.v. a la semana durante 3 semanas, como se indica. N = 8 ratones/grupo.

Las FIGURAS 5A y 5B son gráficos que muestran que los ratones curados previamente de tumores primarios MC38 (los ratones que lograron respuestas completas descritos en la figura 1A) con tratamiento con anticuerpo anti-PD-L1 y nab-paclitaxel (ABRAXANE®) + carboplatino generan respuestas de memoria de linfocitos T antitumorales. Tras una reexposición secundaria con nuevas células tumorales MC38, los tumores no lograron crecer en el 100 % (4/4) de los ratones curados. La figura 5A muestra que los esplenocitos obtenidos 7 días después de la exposición secundaria tienen números de linfocitos T CD4+ y CD8+ similares a los ratones no expuestos previamente con exposición primaria. La figura 5B muestra los resultados del análisis de citometría de flujo que muestra que, tras la estimulación *in vitro* con PMA más ionomicina, los linfocitos T de ratones curados han potenciado la producción de interferón-γ (IFN-γ) en comparación con los ratones con exposición primaria como se evalúa por tinción intracelular de citocinas. Las barras de error indican una desviación estándar de n = 5 (ratones con exposición primaria) o n = 4 (ratones curados, exposición secundaria) y los gráficos de puntos citométricos de flujo son representativos de un ratón de cada grupo. Los valores de *p* se calcularon por la prueba de la *t* para datos independientes bilateral.

Las FIGURAS 6A y 6B son gráficos que muestran los resultados de un ensayo clínico de fase 1b que somete a prueba la eficacia de la politerapia del anticuerpo anti-PD-L1 (MPDL3280A) con un taxano y carboplatino. La figura 6A es un gráfico que muestra los cambios en el tamaño del tumor a lo largo del tiempo después del tratamiento con MPDL3280A, nab-paclitaxel (ABRAXANE®) y carboplatino. La tasa de respuesta objetiva (TRO) fue de 9/14 pacientes, con 3 respuestas completas (RC) y 6 respuestas parciales (RP). La figura 6B es un gráfico que muestra los cambios en el tamaño del tumor a lo largo del tiempo después del tratamiento con MPDL3280A con paclitaxel + carboplatino. La TRO fue de 2/6 pacientes (33 %), con 2 respuestas parciales.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

I. Definiciones

Antes de describir la invención en detalle, se debe entender que la presente invención no se limita a composiciones o sistemas biológicos particulares, que pueden, por supuesto, variar. Se debe entender también que la terminología usada en el presente documento se utiliza con el propósito de describir únicamente modos de realización particulares y no pretende ser limitante.

Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la" incluyen las referencias plurales a menos que el contenido lo indique claramente de otro modo. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "una molécula" incluye opcionalmente una combinación de dos o más de dichas moléculas, y similares.

El término "aproximadamente" como se usa en el presente documento se refiere al intervalo de error habitual para el valor respectivo fácilmente conocido por el experto en este campo técnico. La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) modos de realización que están dirigidos a ese valor o parámetro *per se*.

Se entiende que los aspectos y modos de realización de la invención descrita en el presente documento incluyen "que comprende", "que consiste en" y "que consiste esencialmente en" aspectos y modos de realización.

El término "antagonista de la unión al eje de PD-1" se refiere a una molécula que inhibe la interacción de un compañero de unión al eje de PD-1 con uno o bien más de sus compañeros de unión, para eliminar la disfunción de los linfocitos T que resulta de la señalización en el eje de señalización de PD-1, siendo un resultado el restablecimiento o potenciación de la función de los linfocitos T (por ejemplo, proliferación, producción de citocinas y/o destrucción de las células diana). Como se usa en el presente documento, un antagonista de la unión al eje de PD-1 incluye un antagonista de la unión a PD-1, un antagonista de la unión a PD-L1 y un antagonista de la unión a PD-L2.

El término "antagonista de la unión a PD-1" se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señales que resulta de la interacción de PD-L1 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-L1 y/o PD-L2. En algunas divulgaciones, el antagonista de la unión a PD-1 es una molécula que inhibe la unión de PD-1 a uno o más de sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el antagonista de la unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L1 y/o PD-L2. Por ejemplo, los antagonistas de la unión a PD-1 incluyen anticuerpos anti-PD-1, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas

que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-1 con PD-L1 y/o PD-L2. En una divulgación, un antagonista de la unión a PD-1 reduce la señal coestimuladora negativa mediada por o a través de proteínas de la superficie celular expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-1, para hacer que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional (por ejemplo, potenciando las respuestas efectoras al reconocimiento de antígenos). En algunas divulgaciones, el antagonista de la unión a PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1. En un aspecto específico, un antagonista de la unión a PD-1 es MDX-1106 (nivolumab), descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un antagonista de la unión a PD-1 es MK-3475 (lambrolizumab), descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un antagonista de la unión a PD-1 es CT-011 (pidilizumab), descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un antagonista de la unión a PD-1 es AMP-224, descrito en el presente documento.

El término "antagonista de la unión a PD-L1" se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L1 con uno o bien más de sus compañeros de unión, tales como PD-1 y/o B7-1. En algunas divulgaciones, un antagonista de la unión a PD-L1 es una molécula que inhibe la unión de PD-L1 a sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el antagonista de la unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1 y/o B7-1. En algunas divulgaciones, los antagonistas de la unión a PD-L1 incluyen anticuerpos anti-PD-L1, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L1 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-1 y/o B7-1. En una divulgación, un antagonista de la unión a PD-L1 reduce la señal coestimuladora negativa mediada por o a través de proteínas de la superficie celular expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-L1, para hacer que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional (por ejemplo, potenciando las respuestas efectoras al reconocimiento de antígenos). En algunas divulgaciones, un antagonista de la unión a PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1. En un aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es YW243.55.S70, descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MDX-1105, descrito en el presente documento. Todavía en otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MPDL3280A, descrito en el presente documento. Todavía en otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MEDI4736, descrito en el presente documento.

El término "antagonistas de la unión a PD-L2" se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L2 con uno o bien más de sus compañeros de unión, tales como PD-1. En algunas divulgaciones, un antagonista de la unión a PD-L2 es una molécula que inhibe la unión de PD-L2 a uno o más de sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el antagonista de la unión a PD-L2 inhibe la unión de PD-L2 a PD-1. En algunas divulgaciones, los antagonistas de PD-L2 incluyen anticuerpos anti-PD-L2, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L2 con uno o más de sus compañeros de unión, tal como PD-1. En una divulgación, un antagonista de la unión a PD-L2 reduce la señal coestimuladora negativa mediada por o a través de proteínas de la superficie celular expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-L2, para hacer que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional (por ejemplo, potenciando las respuestas efectoras al reconocimiento de antígenos). En algunas divulgaciones, un antagonista de la unión a PD-L2 es una inmunoadhesina.

Un "taxano" como se usa en el presente documento es un diterpeno que se puede unir a la tubulina, promoviendo el ensamblaje y la estabilización de los microtúbulos y/o evitando la despolimerización de los microtúbulos. Los taxanos incluidos en el presente documento incluyen el taxoide 10-desacetilbacatina III y/o derivados del mismo. Los taxanos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, paclitaxel (es decir, TAXOL®, n.º CAS 33069-62-4), docetaxel (es decir, TAXOTERE®, n.º CAS 114977-28-5), larotaxel, cabazitaxel, milataxel, tesetaxel y/u orataxel. En algunas divulgaciones, el taxano es una nanopartícula recubierta de albúmina (por ejemplo, paclitaxel unido a nanoalbúmina (nab-paclitaxel), es decir, ABRAXANE® y/o nab-docetaxel, ABI-008). En algunas divulgaciones, el taxano es nab-paclitaxel (ABRAXANE®). En algunas divulgaciones, el taxano se formula en CREMAPHOR® (por ejemplo, TAXOL®) y/o en Tween, tal como polisorbato 80 (por ejemplo, TAXOTERE®). En algunas divulgaciones, el taxano es un taxano encapsulado en liposomas. En algunas divulgaciones, el taxano es una forma de profármaco y/o una forma conjugada de taxano (por ejemplo, DHA conjugado covalentemente a paclitaxel, paclitaxel poliglumex y/o carbonato de linolel-paclitaxel). En algunas divulgaciones, el paclitaxel se formula con sustancialmente ningún tensioactivo (por ejemplo, en ausencia de CREMAPHOR y/o Tween, tal como TOCOSOL® paclitaxel).

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

El término "disfuncional", como se usa en el presente documento, también incluye insensible o falto de reactividad al reconocimiento de antígenos, específicamente, con alteración de la capacidad para traducir el reconocimiento de antígenos a funciones efectoras de linfocitos T posteriores, tales como proliferación, producción de citocinas (por ejemplo, IL-2) y/o destrucción de células diana.

El término "anergia" se refiere al estado de falta de reactividad a la estimulación antigénica resultante de señales

incompletas o insuficientes emitidas a través del receptor de linfocitos T (por ejemplo, incremento del Ca^{+2} intracelular en ausencia de activación de ras). La anergia de linfocitos T también puede ser el resultado de la estimulación con antígeno en ausencia de coestimulación, lo que da como resultado que la célula se vuelva insensible a la activación subsiguiente por el antígeno, incluso en el contexto de coestimulación. El estado de falta de reactividad se puede anular a menudo por la presencia de interleucina-2. Los linfocitos T anérgicos no experimentan expansión clonal y/o no adquieren funciones efectoras.

El término "agotamiento" se refiere al agotamiento de los linfocitos T como un estado de disfunción de los linfocitos T que surge de la señalización mantenida de TCR que se produce durante muchas infecciones crónicas y cáncer. Se distingue de la anergia en que surge no de una señalización incompleta o insuficiente, sino de una señalización mantenida. Se define por una función efectora deficiente, expresión mantenida de receptores inhibidores y un estado transcripcional distinto del de los linfocitos T efectores o de memoria funcionales. El agotamiento evita el control óptimo de infecciones y tumores. El agotamiento puede ser el resultado de las vías reguladoras negativas extrínsecas (por ejemplo, citocinas inmunorreguladoras), así como de las vías reguladoras (coestimuladoras) negativas intrínsecas celulares (PD-1, B7-H3, B7-H4, etc.).

"Potenciar la función de los linfocitos T" significa inducir, causar o estimular que un linfocito T tenga una función biológica mantenida o amplificada, o renovar o reactivar linfocitos T agotados o inactivos. Los ejemplos de potenciación de la función de los linfocitos T incluyen: secreción incrementada de interferón y desde los linfocitos T CD8+, proliferación incrementada, reactividad incrementada a antígenos (por ejemplo, eliminación vírica, patógena o tumoral) en relación con dichos niveles antes de la intervención. En una divulgación, el nivel de potenciación es al menos un 50 %, de forma alternativa un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 120 %, 150 % o 200 %. El experto en la técnica conoce la manera de medir esta potenciación.

Un "trastorno disfuncional de linfocitos T" es un trastorno o afección de los linfocitos T caracterizado por una reactividad disminuida a la estimulación antigénica. En una divulgación particular, un trastorno disfuncional de linfocitos T es un trastorno que se asocia específicamente con una señalización incrementada inadecuada a través de PD-1. En otra divulgación, un trastorno disfuncional de linfocitos T es uno en el que los linfocitos T son anérgicos o tienen una capacidad disminuida de secretar citocinas, proliferar o ejecutar actividad citolítica. En un aspecto específico, la reactividad disminuida da como resultado un control ineficaz de un patógeno o tumor que expresa un inmunógeno. Los ejemplos de trastornos disfuncionales de linfocitos T caracterizados por la disfunción de linfocitos T incluyen infección aguda no resuelta, infección crónica e inmunidad tumoral.

"Inmunidad tumoral" se refiere al proceso en el que los tumores evaden el reconocimiento y la eliminación por parte del sistema inmunitario. Por lo tanto, como concepto terapéutico, la inmunidad tumoral se "trata" cuando se atenúa dicha evasión, y los tumores son reconocidos y atacados por el sistema inmunitario. Los ejemplos de reconocimiento tumoral incluyen unión al tumor, contracción del tumor y eliminación del tumor.

"Inmunogenicidad" se refiere a la capacidad de una sustancia particular de provocar una respuesta inmunitaria. Los tumores son inmunógenos y la potenciación de la inmunogenicidad tumoral ayuda en la eliminación de las células tumorales mediante la respuesta inmunitaria. Los ejemplos de potenciación de la inmunogenicidad tumoral incluyen el tratamiento con un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano.

"Respuesta mantenida" se refiere al efecto mantenido en la reducción del crecimiento tumoral después de la interrupción de un tratamiento. Por ejemplo, el tamaño del tumor puede permanecer igual o más pequeño en comparación con el tamaño al comienzo de la fase de administración. En algunas divulgaciones, la respuesta mantenida tiene una duración al menos igual que la duración del tratamiento, al menos 1,5, 2,0, 2,5 o 3,0 veces la duración del tratamiento.

Como se usa en el presente documento, "reducir o inhibir la recidiva del cáncer" significa reducir o inhibir la recidiva del tumor o cáncer o la progresión del tumor o cáncer. Como se divulga en el presente documento, la recidiva del cáncer y/o progresión del cáncer incluyen, sin limitación, metástasis del cáncer.

Como se usa en el presente documento, "respuesta completa" o "RC" se refiere a la desaparición de todas las lesiones diana.

Como se usa en el presente documento, "respuesta parcial" o "RP" se refiere a al menos una disminución del 30 % en la suma de los diámetros más largos (SDML) de las lesiones diana, tomando como referencia la SDML de referencia.

Como se usa en el presente documento, "enfermedad estable" o "EE" se refiere a una contracción no suficiente de las lesiones diana para considerar que hay RP y a un incremento no suficiente para considerar que hay EP, tomando como referencia la SDML más pequeña desde que comenzó el tratamiento.

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

Como se usa en el presente documento, "supervivencia sin progresión" (SSP) se refiere a la cantidad de tiempo durante

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

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

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

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en una forma tal que permite que la actividad biológica del ingrediente activo sea eficaz y que no contiene ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al que se administraría la formulación. Dichas formulaciones son estériles. Los excipientes (vehículos, aditivos) "farmacéuticamente aceptables" son aquellos que se pueden administrar razonablemente a un sujeto mamífero para proporcionar una dosis eficaz del ingrediente activo empleado.

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

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

Una "cantidad eficaz" es al menos la cantidad mínima requerida para conseguir una mejora o prevención mensurable de un trastorno particular. Una cantidad eficaz en el presente documento puede variar de acuerdo con factores tales como la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del paciente, y la capacidad del agente de provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del tratamiento se compensa con los efectos terapéuticamente beneficiosos. Para uso profiláctico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados tales como la eliminación o reducción del riesgo, la disminución de la gravedad o el retraso de la aparición de la enfermedad, incluyendo los síntomas bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Para uso terapéutico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados clínicos tales como la disminución de uno o más síntomas resultantes de la enfermedad, el incremento de la calidad de vida de quienes padecen la enfermedad, la disminución de la dosis de otros medicamentos requeridos para tratar la enfermedad, y la potenciación del efecto de otro medicamento, tal como por medio de la selección como diana, el retraso de la progresión de la enfermedad y/o la prolongación de la supervivencia. En el caso de un cáncer o un tumor, una cantidad eficaz del fármaco puede tener el efecto de reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y de forma deseable detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y de forma deseable detener) la metástasis tumoral; inhibir en cierta medida el crecimiento tumoral; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. Se puede administrar una cantidad eficaz en una o más administraciones. Para los propósitos de la presente invención, una cantidad eficaz de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para conseguir un tratamiento profiláctico o terapéutico directa o bien indirectamente. Como se entiende en el contexto clínico, una cantidad eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica se puede lograr o no junto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por tanto, se puede considerar una "cantidad eficaz" en el contexto de la administración de uno o más agentes terapéuticos, y se puede considerar que un único agente se administre en una cantidad eficaz si, junto con uno o más de otros agentes, se puede lograr o se logra un resultado deseable.

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

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento, incluyendo, pero sin limitarse a, trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluyendo aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

Los términos "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que se asocian con algún grado de proliferación celular anómala. En una divulgación, el trastorno proliferativo celular es cáncer. En una divulgación, el trastorno proliferativo celular es un tumor.

- 5 El término "tumor", como se usa en el presente documento, se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sea maligno o benigno, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos "cáncer", "canceroso", "trastorno proliferativo celular", "trastorno proliferativo" y "tumor" no son mutuamente excluyentes como se hace referencia en el presente documento.
- 10 Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o neoplasias malignas linfocíticas. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen, pero sin limitarse a, cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón, incluyendo carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón
- 15 cáncer gastrointestinal y cáncer del estroma gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer del cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga (por ejemplo cáncer de vejiga urotelial (CVU), cáncer de vejiga músculo-invasivo (CVMI) y cáncer de vejiga no músculo-invasivo (CVNMI) insensible a BCG, cáncer de las vías urinarias, hepatoma, cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama HER2+ y cáncer de mama triple negativo (CMTN), que son negativos para receptores estrogénicos (ER-), receptores progesterónicos (PR-) y HER2 (HER2-)), cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal (por ejemplo, carcinoma de células renales (CCR), cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer tiroideo, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peneano, melanoma, melanoma de diseminación superficial, melanoma sobre lentigo maligno, melanomas lentiginosos acros, melanomas nodulares, mieloma múltiple y linfoma de linfocitos B
- 20 (incluyendo linfoma no hodgkiniano (LNH) de bajo grado/folicular; LNH linfocítico pequeño (LP); LNH de grado intermedio/folicular; LNH difuso de grado intermedio; LNH inmunoblástico de grado alto; LNH linfoblástico de grado alto; LNH de células pequeñas no escindidas de grado alto; LNH con gran masa tumoral; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con el SIDA; y macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (LLC); leucemia linfoblástica aguda (LLA); leucemia mielógena aguda (LMA); tricoleucemia; leucemia mieloblástica crónica (LMC); y trastorno linfoproliferativo postrasplante (TLPT), síndromes mielodisplásicos (SMD), así como proliferación vascular anómala asociada con facomatosis, edema (tal como el asociado con tumores cerebrales), síndrome de Meigs, cáncer cerebral, así como de cabeza y cuello, y metástasis asociadas.

- El término "agente citotóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier agente que sea perjudicial para las células (por ejemplo, causa la muerte celular, inhibe la proliferación o dificulta de otro modo una función celular). Los agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, isótopos radiactivos (por ejemplo, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} y los isótopos radiactivos de Lu); agentes quimioterápicos; agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de las mismas tales como enzimas nucleolíticas; y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos. Se pueden seleccionar agentes citotóxicos ejemplares de agentes antimicrotúbulos, complejos de coordinación de platino, agentes alquilantes, agentes antibióticos, inhibidores de la topoisomerasa II, antimetabolitos, inhibidores de la topoisomerasa I, hormonas y análogos hormonales, inhibidores de la vía de transducción de señales, inhibidores de angiogénesis de tirosina cinasas no receptoras, agentes inmunoterápicos, agentes proapoptóticos, inhibidores de LDH-A, inhibidores de la biosíntesis de ácidos grasos, inhibidores de señalización del ciclo celular, inhibidores de HDAC, inhibidores del complejo endopeptidásico multicatalítico e inhibidores del metabolismo del cáncer.
- 40 En una divulgación, el agente citotóxico es un agente quimioterápico con derivado de platino. En una divulgación, el agente citotóxico es un antagonista de EGFR. En una divulgación, el agente citotóxico es N-(3-etilfenil)-6,7-bis (2-metoxietoxi)quinazolin-4-amina (por ejemplo, erlotinib, TARCEVA™). En una divulgación, el agente citotóxico es un inhibidor de RAF. En una divulgación, el inhibidor de RAF es un inhibidor de BRAF y/o CRAF. En una divulgación, el inhibidor de RAF es vemurafenib. En una divulgación, el agente citotóxico es un inhibidor de PI3K.

- Como se usa en el presente documento, el término "agente quimioterápico" incluye compuestos útiles en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), disulfiram, galato de epigallocatequina, salinosporamida A, carfilzomib, 17-AAG (geldanamycin), radicicol, lactato deshidrogenasa A (LDH-A), fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), sunitib (SUTENT®, Pfizer/Sugen), letrozol (FEMARA®, Novartis), mesilato de imatinib (GLEEVEC®, Novartis), finasunato (VATALANIB®, Novartis), oxaliplatino (ELOXATIN®, Sanofi), 5-FU (5-fluorouracilo), ácido folínico, rapamicina (sirólimus, RAPAMUNE®, Wyeth), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), lonafamib (SCH 66336), sorafenib (NEXAVAR® Bayer Labs), gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), AG1478, agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida CYTOXAN®; alquil sulfonatos tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carbociona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, incluyendo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo topotecán e irinotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (en particular criptoficina 1 y criptoficina 8); corticosteroides (incluyendo prednisona y prednisolona); acetato de ciproterona; 5 α -reductasas incluyendo finasterida y dutasterida; vorinostat, romidepsina, panobinostat, ácido valproico, mocetinostat dolastatina; aldesleucina,

talco duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiastatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, cloromafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, uramustina; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina γ 11 y calicheamicina ω 11 (*Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 33:183-186 (1994))); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bifosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como el cromóforo neocarzinostatina y los cromóforos antibióticos de enediina cromoproteínicos relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carcinofilina, cromomicinis, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN® (doxorubicina), morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de drostanolona, epitostanol, mepitostano, testolactona; antisuiprarrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico, tal como ácido folínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; eflornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiaurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamnol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidracida; procarbazona; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxano; rizoxina; sizofurano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos; clorambucilo; GEMZAR® (gemcitabina); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; vinblastina; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE® (vinorelbina); novantrona; tenipósido; edatrexato; daunorubicina; aminopterina; capecitabina (XELODA®); ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; y sales, ácidos y derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Los agentes quimioterápicos también incluyen agentes quimioterápicos "con derivado de platino", que comprenden un compuesto orgánico que contiene platino que forma parte de la molécula. Típicamente, los agentes quimioterápicos con derivado de platino son complejos de coordinación de platino. Los agentes quimioterápicos con derivado de platino a veces se denominan "platinos" en la técnica. Los ejemplos de agentes quimioterápicos con derivado de platino incluyen, pero no se limitan a, carboplatino, cisplatino y oxaliplatino.

Los agentes quimioterápicos también incluyen (i) agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de las hormonas sobre tumores, tales como antiestrógenos y moduladores selectivos del receptor estrogénico (MSRE), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX®; citrato de tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, yodoxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y FARESTON® (citrato de toremifina); (ii) inhibidores de la aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® (acetato de megestrol), AROMASIN® (exemestano; Pfizer), formestano, fadrozol, RIVISOR® (vorozol), FEMARA® (letrozol; Novartis) y ARIMIDEX® (anastrozol; AstraZeneca); (iii) antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprorelina y goserelina; buserelina, tripterlina, acetato de medroxioprogesterona, dietilestilbestrol, premarina, fluoximesterona, ácido retinoico, fenretinida, así como troxacitabina (un análogo del nucleósido citosina de 1,3-dioxolano); (iv) inhibidores de proteína cinasa; (v) inhibidores de lípido cinasa; (vi) oligonucleótidos de antisentido, en particular los que inhiben la expresión de genes en vías de señalización implicadas en la proliferación celular anómala tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Ralf y H-Ras; (vii) ribozimas, tales como inhibidores de la expresión de VEGF (por ejemplo, ANGIOZYME®) e inhibidores de la expresión de HER2; (viii) vacunas, tales como vacunas de genoterapia, por ejemplo, ALLOVECTIN®, LEUVECTIN® y VAXID®; PROLEUKIN®, rIL-2; un inhibidor de la topoisomerasa 1, tal como LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; y (ix) sales, ácidos y derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Los agentes quimioterápicos también incluyen anticuerpos tales como alemtuzumab (Campath), bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); cetuximab (ERBITUX®, Imclone); panitumumab (VECTIBIX®, Amgen), rituximab (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec), pertuzumab (OMNITARG™, 2C4, Genentech), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), tositumomab (Bexxar, Corixa) y el conjugado de anticuerpo-fármaco, gemtuzumab ozogamicina (MYLOTARG®, Wyeth). Anticuerpos monoclonales humanizados adicionales con potencial terapéutico incluyen: apolizumab, aselizumab, atlizumab, bapineuzumab, bivatuzumab mertansina, cantuzumab mertansina, cedelizumab, certolizumab pegol, cidfusituzumab, cidtuzumab, daclizumab, eculizumab, efalizumab, epratuzumab, erlizumab, felvizumab, fontolizumab, gentuzumab ozogamicina, inotuzumab ozogamicina, ipilimumab, labetuzumab, lintuzumab, matuzumab, mepolizumab, motavizumab, motovizumab, natalizumab, nimotuzumab, nolovizumab, numavizumab, ocrelizumab, omalizumab, palivizumab, pascolizumab, pecfusituzumab, pectuzumab, pexelizumab, ralvizumab, ranibizumab, reslivizumab, reslizumab, resvivizumab, rovelizumab, ruplizumab, sibrotuzumab, sipilizumab, sontuzumab, tacatuzumab tetraxetano, tadocizumab, talizumab, tefibazumab, tocilizumab, toralizumab, tucotuzumab celmoleucina, tucosituzumab, umavizumab,

urtioxazumab, ustekinumab, visilizumab y el anticuerpo antinterleucina-12 (ABT-874/J695, Wyeth Research and Abbott Laboratories) que es un anticuerpo IgG₁ λ de longitud completa, de secuencia exclusivamente humana recombinante modificado genéticamente para reconocer la proteína interleucina-12 p40.

5 Los agentes quimioterápicos también incluyen "inhibidores de EGFR", que se refiere a compuestos que se unen a o interactúan directamente de otro modo con EGFR y evitan o reducen su actividad de señalización, y de forma alternativa se denominan "antagonistas de EGFR". Los ejemplos de dichos agentes incluyen anticuerpos y moléculas pequeñas que se unen al EGFR. Los ejemplos de anticuerpos que se unen a EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase la patente de EE. UU. n.º 4.943.533) y variantes de los mismos, tales como 225 quimerizado (C225 o cetuximab; ERBUTIX®) y 225 humano (H225) reconfigurado (véase, por ejemplo, el documento WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, un anticuerpo totalmente humano dirigido a EGFR (Imclone); anticuerpos que se unen a EGFR mutante de tipo II (patente de EE. UU. n.º 5.212.290); anticuerpos quiméricos y humanizados que se unen a EGFR como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.891.996; y anticuerpos humanos que se unen a EGFR, tales como ABX-EGF o panitumumab (véase el documento WO 98/50433, Abgenix/Amgen); EMD 55900 (Stragliotto *et al.* *EUR. J. Cancer* 32A:636-640 (1996)); EMD7200 (matuzumab) un anticuerpo contra EGFR humanizado dirigido contra EGFR que compite con EGF y TGF- α por la unión a EGFR (EMD/Merck); anticuerpo contra EGFR humano, HuMax-EGFR (GenMab); anticuerpos totalmente humanos conocidos como E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6.3 y E7.6.3 y descritos en el documento US 6.235.883; MDX-447 (Medarex Inc); y mAb 806 o mAb humanizado 806 (Johns *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279(29):30375-30384 (2004)). El anticuerpo anti-EGFR se puede conjugar con un agente citotóxico, generando por tanto un inmunoconjugado (véase, por ejemplo, el documento EP 659439A2, Merck Patent GmbH). Los antagonistas del EGFR incluyen moléculas pequeñas tales como los compuestos descritos en las patentes de EE. UU. n.ºs: 5.616.582, 5.457.105, 5.475.001, 5.654.307, 5.679.683, 6.084.095, 6.265.410, 6.455.534, 6.521.620, 6.596.726, 6.713.484, 5.770.599, 6.140.332, 5.866.572, 6.399.602, 6.344.459, 6.602.863, 6.391.874, 6.344.455, 5.760.041, 6.002.008 y 5.747.498, así como las siguientes publicaciones PCT: WO 98/14451, WO 98/50038, WO 99/09016 y WO 99/24037. Los antagonistas particulares del EGFR de molécula pequeña incluyen OSI-774 (CP-358774, erlotinib, TARCEVA® Genentech/OSI Pharmaceuticals); PD 183805 (CI 1033, 2-propenamida, N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[3-(4-morfolinil)propoxi]-6-quinazolinil]-, diclorhidrato, Pfizer Inc.); ZD1839, gefitinib (IRESSA®) 4-(3'-cloro-4'-fluoroanilino)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)quinazolina, AstraZeneca; ZM 105180 ((6-amino-4-(3-metilfenil-amino)-quinazolina, Zeneca); BIBX-1382 (N8-(3-cloro-4-fluoro-fenil)-N2-(1-metil-piperidin-4-il)-pirimido[5,4-d]pirimidin-2,8-diamina, Boehringer Ingelheim); PKI-166 ((R)-4-[4-[(1-feniletil)amino]-1H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-6-il]-fenol); (R)-6-(4-hidroxifenil)-4-[(1-feniletil)amino]-7H-pirrolol[2,3-d]pirimidina; CL-387785 (N-[4-[(3-bromofenil)amino]-6-quinazolinil]-2-butanamida); EKB-569 (N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolinil]-4-(dimetilamino)-2-butanamida) (Wyeth); AG1478 (Pfizer); AG1571 (SU 5271; Pfizer); inhibidores dobles de tirosina cinasas EGFR/HER2 tales como lapatinib (TYKERB®, GSK572016 o N-[3-cloro-4-[(3 fluorofenil)metoxi]fenil]-6[5[[[(2metilsulfonil)etil]amino]metil]-2-furanil]-4-quinazolinamina).

Los agentes quimioterápicos también incluyen "inhibidores de tirosina cinasas", incluyendo los fármacos dirigidos al EGFR mencionados en el párrafo anterior; inhibidor de la tirosina cinasa HER2 de molécula pequeña tal como TAK165 disponible de Takeda; CP-724.714, un inhibidor selectivo oral de la tirosina cinasa receptora ErbB2 (Pfizer y OSI); inhibidores dobles de HER tales como EKB-569 (disponible de Wyeth) que se une preferentemente a EGFR pero inhibe células que sobreexpresan tanto HER2 como EGFR; lapatinib (GSK572016; disponible de Glaxo-SmithKline), un inhibidor oral de las tirosina cinasas HER2 y EGFR; PKI-166 (disponible de Novartis); inhibidores universales de HER tales como canertinib (CI-1033; Pharmacia); inhibidores de Raf-1 tales como el agente de antisentido ISIS-5132 disponible de ISIS Pharmaceuticals que inhiben la señalización de Raf-1; inhibidores de tirosina cinasas receptoras no dirigidos a HER tales como mesilato de imatinib (GLEEVEC®, disponible de Glaxo SmithKline); inhibidores de múltiples tirosina cinasas receptoras dirigidos tales como sunitinib (SUTENT®, disponible de Pfizer); inhibidores de la tirosina cinasa receptora del VEGF tales como vatalanib (PTK787/ZK222584, disponible de Novartis/Schering AG); inhibidor de la cinasa I regulada extracelular MAPK CI-1040 (disponible en Pharmacia); quinazolininas, tales como PD 153035, 4-(3-cloroanilino)quinazolina; piridopirimidinas; pirimidopirimidinas; pirrolopirimidinas, tales como CGP 59326, CGP 60261 y CGP 62706; pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrolol[2,3-d]pirimidinas; curcumina (diferuloil metano, 4,5-bis(4-fluoroanilino)ftalimida); tirfostinas que contienen restos nitroiofeno; PD-0183805 (Warner-Lambert); moléculas de antisentido (por ejemplo, aquellas que se unen al ácido nucleico que codifica HER); quinoxalinas (patente de EE. UU. n.º 5.804.396); tirfostinas (patente de EE. UU. n.º 5.804.396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); inhibidores universales de HER tales como CI-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); mesilato de imatinib (GLEEVEC®); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); semaxinib (Pfizer); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1 C11 (Imclone), rapamicina (sirólimus, RAPAMUNE®); o como se describe en cualquiera de las siguientes publicaciones de patentes: patente de EE. UU. n.º 5.804.396; documento WO 1999/09016 (American Cyanamid); documento WO 1998/43960 (American Cyanamid); documento WO 1997/38983 (Warner Lambert); documento WO 1999/06378 (Warner Lambert); documento WO 1999/06396 (Warner Lambert); documento WO 1996/30347 (Pfizer, Inc); documento WO 1996/33978 (Zeneca); documento WO 1996/3397 (Zeneca) y documento WO 1996/33980 (Zeneca).

Los agentes quimioterápicos también incluyen dexametasona, interferones, colquicina, metoprina, ciclosporina, anfotericina, metronidazol, alemtuzumab, alitretinoína, alopurinol, amifostina, trióxido de arsénico, asparaginasa, BCG vivo, bevacuzimab, bexaroteno, cladribina, clofarabina, darbepoetina alfa, denileucina, dextrazoxano, epoetina alfa, elotinib, filgrastim, acetato de histrelina, ibritumomab, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, lenalidomida, levamisol, mesna,

metoxaleno, nandrolona, nelarabina, nofetumomab, oprelvecina, palifermina, pamidronato, pegademasa, pegaspargasa, pegfilgrastim, pemetrexed disódico, plicamicina, porfímero de sodio, mepacrina, rasburicasa, sargramostim, temozolomida, VM-26, 6-TG, toremifeno, tretinoína, ATRA, valrubicina, zoledronato y ácido zoledrónico, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

5 Los agentes quimioterápicos también incluyen hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, acetato de cortisona, pivalato de tixocortol, acetónido de triamcinolona, alcohol de triamcinolona, mometasona, amcinonida, budesonida, desonida, fluocinonida, acetónido de fluocinolona, betametasona, fosfato sódico de betametasona, dexametasona, fosfato sódico de dexametasona, fluocortolona, 17-butilato de hidrocortisona, 17-valerato de hidrocortisona, dipropionato de aclometasona, valerato de betametasona, dipropionato de betametasona, prednicarbato, 17-butilato de clobetasona, 17-propionato de clobetasol, caproato de fluocortolona, pivalato de fluocortolona y acetato de fluprednidenol; péptidos antiinflamatorios selectivos inmunitarios (ASIM) tales como fenilalanina-glutamina-glicina (FEG) y su forma isomérica D (feG) (IMULAN BioTherapeutics, LLC); fármacos antirreumáticos tales como azatioprina, ciclosporina (ciclosporina A), D-penicilamina, sales de oro, hidroxycloquinina, leflunomida minociclina, sulfasalazina, bloqueantes del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) tales como etanercept (Enbrel), infliximab (Remicade), adalimumab (Humira), certolizumab pegol (Cimzia), golimumab (Simponi), bloqueantes de interleucina 1 (IL-1) tales como anakinra (Kineret), bloqueantes de la coestimulación de linfocitos T tales como abatacept (Orencia), bloqueantes de la interleucina 6 (IL-6) tales como tocilizumab (ACTEMERA®); bloqueantes de la interleucina 13 (IL-13) tales como lebrikizumab; bloqueantes del interferón alfa (IFN) tales como rontalizumab; bloqueantes de la integrina beta 7 tales como rhuMab Beta7; bloqueantes de la vía de la IgE tales como anti-M1 prima; LTa3 homotrímico secretado y LTa1 heterotrímico unido a membrana/(bloqueantes de β 2 tales como antilinfotoxina alfa (LTa); isótopos radiactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radiactivos de Lu); diversos agentes en investigación tales como tioplatino, PS-341, fenilbutirato, ET-18-OCH₃ o inhibidores de la farnesil transferasa (L-739749, L-744832); polifenoles tales como quercetina, resveratrol, piceatanol, galato de epigallocatequina, teaflavinas, flavanoles, procianidinas, ácido betulínico y derivados de los mismos; inhibidores de la autofagia tales como cloroquina; delta-9-tetrahidrocanabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colquicinas; ácido betulínico; acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina; podofilotoxina; tegafur (UFTORAL®); bexaroteno (TARGRETIN®); bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®) o risedronato (ACTONEL®); y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como la vacuna THERATOPE®; perifosina, inhibidor de la COX-2 (por ejemplo, celecoxib o etoricoxib), inhibidor del complejo endopeptidásico multicatalítico (por ejemplo, PS341); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inhibidor de Bcl-2 tal como oblimersén sódico (GENASENSE®); pixantrona; inhibidores de la farnesiltransferasa tales como lonafarnib (SCH 6636, SARASAR™); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, las siglas para un tratamiento combinado de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona; y FOLFOX, las siglas para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y ácido folínico.

Los agentes quimioterápicos también incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos con efectos analgésicos, antitérmicos y antiinflamatorios. Los AINE incluyen inhibidores no selectivos de la enzima ciclooxigenasa. Los ejemplos específicos de AINE incluyen ácido acetilsalicílico, derivados del ácido propiónico tales como ibuprofeno, fenoprofeno, ketoprofeno, flurbiprofeno, oxaprozina y naproxeno, derivados del ácido acético tales como indometacina, sulindaco, etodolaco, diclofenaco, derivados del ácido enólico tales como piroxicam, meloxicam, tenoxicam, lornoxicam e isoxicam, derivados del ácido fenámico tales como ácido mefenámico, ácido meclofenámico, ácido flufenámico, ácido tolfenámico, e inhibidores de la COX-2 tales como celecoxib, etoricoxib, lumiracoxib, parecoxib, rofecoxib, rofecoxib y valdecoxib. Los AINE pueden estar indicados en general para el alivio sintomático de afecciones tales como artritis reumatoide, artrosis, artropatías inflamatorias, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, síndrome de Reiter, gota aguda, dismenorrea, dolor óseo metastático, cefalea y migraña, dolor posoperatorio, dolor leve a moderado debido a inflamación y lesión tisular, fiebre, íleo y cólico renal.

50 Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, ya sea *in vitro* o *in vivo*. En una divulgación, un agente inhibidor del crecimiento es un anticuerpo inhibidor del crecimiento que evita o reduce la proliferación de una célula que expresa un antígeno al que se une el anticuerpo. En otra divulgación, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la interrupción de G1 y la interrupción de la fase M. Los bloqueantes clásicos de la fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de la topoisomerasa II, tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Estos agentes que interrumpen la G1 también actúan extendiéndose a la interrupción de la fase S, por ejemplo, los agentes alquilantes del ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluoruracilo y Ara-C. Otra información se puede encontrar en Mendelsohn e Israel, eds., *The Molecular Basis of Cancer*, capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs", por Murakami *et al.* (W.B. Saunders, Filadelfia, 1995), por ejemplo, pág. 13.

65 Por "radioterapia" se quiere decir el uso de rayos beta o rayos gamma dirigidos para inducir suficiente daño a una célula para limitar su capacidad de funcionar normalmente o destruir la célula por completo. Se aprecia que habrá muchas maneras conocidas en la técnica para determinar la dosificación y duración del tratamiento. Los tratamientos típicos se

proporcionan como una administración en una sola dosis y las dosificaciones típicas varían de 10 a 200 unidades (grays) al día.

Un "sujeto" o un "individuo" para propósitos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, para la práctica de deportes o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, ganado bovino, etc. Preferentemente, el mamífero es un ser humano. Un sujeto o individuo puede ser un paciente.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten la actividad biológica deseada.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían en usos de investigación, diagnóstico o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En algunas divulgaciones, un anticuerpo se purifica (1) hasta más de un 95 % en peso de anticuerpo como se determina mediante, por ejemplo, el procedimiento de Lowry, y en algunas divulgaciones hasta más de un 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N terminal o interna mediante el uso de, por ejemplo, un secuenciador de cubilete giratorio o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando, por ejemplo, azul de Coomassie o tinción con plata. Un anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, puesto que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Habitualmente, sin embargo, un anticuerpo aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

Los "anticuerpos naturales" son normalmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150 000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se enlaza a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de isotipos de inmunoglobulina diferentes. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos aminoacídicos particulares forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada.

El término "dominio constante" se refiere a la parte de una molécula de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos más conservada con respecto a la otra parte de la inmunoglobulina, el dominio variable, que contiene el sitio de unión al antígeno. El dominio constante contiene los dominios C_H1 , C_H2 y C_H3 (conjuntamente, CH) de la cadena pesada y el dominio CHL (o CL) de la cadena ligera.

La "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios aminoterminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada se puede denominar " V_H ". El dominio variable de la cadena ligera se puede denominar " V_L ". Estos dominios son, en general, las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión a antígeno.

El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas partes de los dominios variables difieren ampliamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente por los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables (HVR), en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones estructurales (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , que se conectan mediante tres HVR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Las HVR en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad mediante las regiones FR y, con las HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie vertebrada se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (" K ") y lambda (" λ "), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

El término "isotipo" o "subclase" de IgG, como se usa en el presente documento, significa cualquiera de las subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes.

Dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , γ , ϵ , μ y δ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas y se describen en general en, por ejemplo, Abbas *et al.*, *Cellular and Mol. Immunology*, 4.^a ed., (W.B. Saunders, Co., 2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión más grande, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo inalterado" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente inalterada, no a fragmentos de anticuerpo como se definen a continuación. Los términos se refieren en particular a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen una región Fc.

Un "anticuerpo no marcado" para los propósitos del presente documento es un anticuerpo que no está conjugado con un resto citotóxico o radiomarcador.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una parte de un anticuerpo inalterado, que comprende preferentemente la región de unión a antígeno del mismo. En algunas divulgaciones, el fragmento de anticuerpo descrito en el presente documento es un fragmento de unión a antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un sitio de unión a antígeno único, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación con antígeno y todavía se puede reticular con el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión a antígeno completo. En una divulgación, una especie de Fv bicatenario consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y uno de la ligera en asociación estrecha no covalente. En una especie de Fv monocatenario (scFv) se pueden enlazar covalentemente un dominio variable de la cadena pesada y uno de la ligera mediante un conector peptídico flexible, de modo que las cadenas ligera y pesada se puedan asociar en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie de Fv bicatenario. Es en esta configuración en la que las tres HVR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Conjuntamente, las seis HVR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena pesada y ligera, y contiene también el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxílico del dominio CH1 de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región de bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para un Fab' en el que el(los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de bisagra entre ellos. También son conocidos otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenarios" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una cadena polipeptídica única. En general, el polipéptido de scFv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL, que posibilita que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de los scFv, véase, por ejemplo, Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York, 1994), pág. 269-315.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo los fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Usando un conector que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a que los dominios se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen con más detalle en, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO 1993/01161; Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993). También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, por ejemplo, los anticuerpos individuales que comprenden

la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones naturales, que pueden estar presentes en cantidades menores. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica la naturaleza del anticuerpo que no es una mezcla de distintos anticuerpos. En determinadas divulgaciones, dicho anticuerpo monoclonal incluye típicamente un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en el que la secuencia polipeptídica de unión a la diana se obtuvo mediante un procedimiento que incluye la selección de una única secuencia polipeptídica de unión a la diana de una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el procedimiento de selección puede ser la selección de un clon único de una pluralidad de clones, tales como un grupo de clones de hibridoma, clones de fagos o clones de ADN recombinante. Se debe entender que una secuencia de unión a la diana seleccionada se puede alterar, además, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a la diana, para mejorar su producción en un cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a la diana alterada es también un anticuerpo monoclonal de la presente invención. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes (epítopos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas al no estar típicamente contaminadas por otras inmunoglobulinas.

El modificador "monoclonal" indica la naturaleza del anticuerpo que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se ha de interpretar que requiera la producción del anticuerpo por algún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la invención se pueden producir mediante una variedad de técnicas, que incluyen, por ejemplo, el procedimiento del hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2.^a ed. 1988); Hammerling *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, NY, 1981)), procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.816.567), tecnologías de presentación en fagos (véase, por ejemplo, Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004) y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o similares a humanos en animales que tienen partes o la totalidad de los locus de inmunoglobulina humana o genes que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, los documentos WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); las patentes de EE. UU. n.ºs 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425 y 5.661.016; Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); y Lonberg *et al.*, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE. UU. n.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos PRIMATTZED® en los que la región de unión a antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido, por ejemplo, por la inmunización de macacos con el antígeno de interés.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En una divulgación, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los residuos de una HVR del receptor se reemplazan por residuos de una HVR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos FR de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se pueden elaborar para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase, por ejemplo, Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Véase también, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); y las patentes de EE. UU. n.ºs 6.982.321 y 7.087.409.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos como se divulga en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente a un

anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo colecciones de presentación en fagos. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). También están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos los procedimientos descritos en Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Véase también van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Se pueden preparar anticuerpos humanos administrando el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a la exposición antigénica, pero cuyos locus endógenos se han desactivado, por ejemplo, xenorratones inmunizados (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 6.075.181 y 6.150.584 con respecto a la tecnología XENOMOUSE™). Véase también, por ejemplo, Li *et al. Proc. Natl Acad Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) con respecto a anticuerpos humanos generados por medio de una tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos.

Un "anticuerpo dependiente de la especie" es uno que tiene una afinidad de unión más fuerte por un antígeno de una primera especie de mamífero que la que tiene por un homólogo de ese antígeno de una segunda especie de mamífero. Normalmente, el anticuerpo dependiente de la especie se "une específicamente" a un antígeno humano (por ejemplo, tiene un valor de afinidad de unión (Kd) de no más de aproximadamente 1×10^{-7} M, preferentemente no más de aproximadamente 1×10^{-8} M y preferentemente no más de aproximadamente 1×10^{-9} M) pero tiene una afinidad de unión por un homólogo del antígeno de una segunda especie de mamífero no humano que es al menos aproximadamente 50 veces, o al menos aproximadamente 500 veces, o al menos aproximadamente 1000 veces, más débil que su afinidad de unión por el antígeno humano. El anticuerpo dependiente de la especie puede ser cualquiera de los diversos tipos de anticuerpos como se define anteriormente, pero es preferentemente un anticuerpo humanizado o humano.

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

Una serie de delimitaciones de HVR están en uso y se engloban en el presente documento. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las más comúnmente usadas (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Chothia se refiere en cambio a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las HVR de AbM representan un término medio entre las HVR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se usan en el programa informático de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las HVR de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los residuos de cada una de estas HVR se indican a continuación.

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

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

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

El término "numeración de residuos del dominio variable según Kabat" o "numeración de la posición de aminoácidos según Kabat", y las variaciones del mismo, se refieren al sistema de numeración usado para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, *supra*. Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un único inserto de aminoácido (residuo 52a de acuerdo con Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del residuo FR 82 de cadena pesada. La numeración de residuos de Kabat se puede determinar para un anticuerpo dado por alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada

según Kabat "estándar".

El sistema de numeración de Kabat se usa, en general, cuando se hace referencia a un residuo en el dominio variable (aproximadamente los residuos 1-107 de la cadena ligera y los residuos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat *et al.*, *Sequences of Immunological Interest*. 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). El "sistema de numeración EU" o "índice EU" se usa, en general, cuando se hace referencia a un residuo en una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU del que se informa en Kabat *et al.*, *supra*). El "índice EU según Kabat" se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo humano IgG1 EU.

La expresión "anticuerpos lineales" se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata *et al.* (1995 *Protein Eng.* 8(10):1057-1062). En resumen, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, conjuntamente con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

Como se usa en el presente documento, el término "se une", "se une específicamente a" o "es específico para" se refiere a interacciones mensurables y reproducibles, tales como la unión entre una diana y un anticuerpo, que es determinante de la presencia de la diana en presencia de una población heterogénea de moléculas, incluyendo moléculas biológicas. Por ejemplo, un anticuerpo que se une o se une específicamente a una diana (que puede ser un epítipo) es un anticuerpo que se une a esta diana con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración que con la que se une a otras dianas. En una divulgación, el grado de unión de un anticuerpo a una diana no relacionada es inferior a aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo a la diana como se mide, por ejemplo, mediante un radioinmunoanálisis (RIA). En determinadas divulgaciones, un anticuerpo que se une específicamente a una diana tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ o $\leq 0,1 \text{ nM}$. En determinadas divulgaciones, un anticuerpo se une específicamente a un epítipo en una proteína que está conservada entre las proteínas de diferentes especies. En otra divulgación, la unión específica puede incluir, pero no requiere, una unión exclusiva.

II. Antagonistas de la unión al eje de PD-1

En el presente documento se proporcionan procedimientos para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano. En el presente documento también se proporcionan procedimientos de potenciación de la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer, que comprenden administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano. Por ejemplo, un antagonista de la unión al eje de PD-1 incluye un antagonista de la unión a PD-1, un antagonista de la unión a PD-L1 y un antagonista de la unión a PD-L2. PD-1 (muerte programada 1) también se conoce en la técnica como "muerte celular programada 1", "PDCD1", "CD279" y "SLEB2". Un PD-1 humano ejemplar se muestra en el n.º de acceso a UniProtKB/Swiss-Prot Q15116. PD-L1 (ligando de muerte programada 1) también se conoce en la técnica como "ligando 1 de muerte celular programada 1", "PDCD1LG1", "CD274", "B7-H" y "PDL1". Un PD-L1 humano ejemplar se muestra en el n.º de acceso a UniProtKB/Swiss-Prot Q9NZQ7.1. PD-L2 (ligando de muerte programada 2) también se conoce en la técnica como "ligando 2 de muerte celular programada 2", "PDCD1LG2", "CD273", "B7-DC", "Btdc" y "PDL2". Un PD-L2 humano ejemplar se muestra en el n.º de acceso a UniProtKB/Swiss-Prot Q9BQ51. En algunas divulgaciones, PD-1, PD-L1 y PD-L2 son PD-1, PD-L1 y PD-L2 humanos.

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

En algunas divulgaciones, el antagonista de la unión a PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 (por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico). En algunas divulgaciones, el anticuerpo anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste en MDX-1106 (nivolumab), MK-3475 (lambrolizumab) y CT-011 (pidilizumab). En algunas divulgaciones, el antagonista de la unión a PD-1 es una inmunoadhesina (por ejemplo, una inmunoadhesina que comprende una parte extracelular o de unión a PD-1 de PD-L1 o PD-L2 fusionada a una región constante (por ejemplo, una región Fc de una secuencia de inmunoglobulina). En algunas divulgaciones, el antagonista de la unión a PD-1 es AMP-224. En algunas divulgaciones, el antagonista de la unión a PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1. En algunas divulgaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 se selecciona del grupo que consiste en YW243.55.S70, MPDL3280A, MDX-1105 y MEDI4736. El anticuerpo YW243.55.S70 es un anticuerpo anti-PD-L1 descrito en el documento WO 2010/077634. MDX-1105, también conocido como BMS-936559, es un anticuerpo anti-PD-L1 descrito en el documento WO 2007/005874. MEDI4736 es un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 descrito en los documentos WO 2011/066389 y US 2013/034559. MDX-1106, también conocido como MDX-1106-04, ONO-4538 o BMS-936558 o nivolumab, es un anticuerpo anti-PD-1 descrito en el documento WO 2006/121168. MK-3475, también conocido como lambrolizumab, es un anticuerpo anti-PD-1 descrito en el documento WO 2009/114335. CT-011, también conocido como hBAT, hBAT-1 o pidilizumab, es un anticuerpo anti-PD-1 descrito en el documento WO 2009/101611. AMP-224, también conocido como B7-DCIg, es un receptor soluble de fusión de PD-L2-Fc descrito en los documentos WO 2010/027827 y WO 2011/066342.

En algunas divulgaciones, el antagonista de la unión al eje de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1. En algunas divulgaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 puede inhibir la unión entre PD-L1 y PD-1 y/o entre PD-L1 y B7-1. En algunas divulgaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal. En algunas divulgaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en fragmentos Fab, Fab'-SH, Fv, scFv y (Fab')₂. En algunas divulgaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo humanizado. En algunas divulgaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo humano.

Se describen ejemplos de anticuerpos anti-PD-L1 útiles para el uso de la presente invención en la solicitud de patente PCT WO 2010/077634, WO 2007/005874, WO 2011/066389 y US 2013/034559.

Anticuerpos anti-PD-1

En algunas divulgaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es MDX-1106. Los nombres alternativos para "MDX-1106" incluyen MDX-1106-04, ONO-4538, BMS-936558 o nivolumab. En algunas divulgaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es nivolumab (número de registro CAS: 946414-94-4). Todavía en otra divulgación se proporciona un anticuerpo anti-PD-1 aislado que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:1 y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:2. Todavía en otra divulgación se proporciona un anticuerpo anti-PD-1 aislado que comprende una secuencia de la cadena pesada y/o cadena ligera, en el que:

(a) la secuencia de la cadena pesada tiene al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la cadena pesada:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDYDGSKRYYADSVKGR
FTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA
LGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKV
DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO:1), y

(b) la secuencia de la cadena ligera tiene al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la cadena ligera:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTD
FTLTISSELEPEDFAVYYCQQSSNWPRFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPY
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC (SEQ ID NO:2).

Anticuerpos anti-PD-L1

En algunas divulgaciones, el anticuerpo en la formulación comprende al menos un triptófano (por ejemplo, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro) en la secuencia de la cadena pesada y/o ligera. En algunas divulgaciones, el aminoácido triptófano está en las regiones HVR, regiones estructurales y/o regiones constantes del anticuerpo. En algunas divulgaciones, el anticuerpo comprende dos o tres residuos de triptófano en las regiones HVR. En algunas divulgaciones, el anticuerpo en la formulación es un anticuerpo anti-PD-L1. PD-L1 (ligando de muerte programada 1), también conocido como PDL1, B7-H1, B7-4, CD274 y B7-H, es una proteína transmembranaria, y su interacción con PD-1 inhibe la activación de los linfocitos T y la producción de citocinas. En algunas divulgaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 descrito en el presente documento se une a PD-L1 humano. Ejemplos de anticuerpos anti-PD-L1 que se pueden usar en los procedimientos descritos en el presente documento se describen en la solicitud de patente PCT WO 2010/077634 A1 y el documento US 8.217.149.

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

Los anticuerpos anti-PD-L1 descritos en los documentos WO 2010/077634 A1 y US 8.217.149 se pueden usar en los

procedimientos descritos en el presente documento. En algunas divulgaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 comprende una secuencia de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:3 y/o una secuencia de la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:4. Todavía en otra divulgación, se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de la región variable de cadena pesada y una de la región variable de cadena ligera, en el que:

la secuencia de la cadena pesada tiene al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la cadena pesada: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAVISPYGGSTYYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTSA (SEQ ID NO:3), y

(a) la secuencia de la cadena ligera tiene al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la cadena ligera: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAWYQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:4).

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

- (a) la secuencia de HVR-H1 es GFTFSX₁SWIH (SEQ ID NO:5);
- (b) la secuencia de HVR-H2 es AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG (SEQ ID NO:6);
- (c) la secuencia de HVR-H3 es RHWPGGFDY (SEQ ID NO:7);

en la que, además: X₁ es D o G; X₂ es S o L; X₃ es T o S. En un aspecto específico, X₁ es D; X₂ es S y X₃ es T.

En otro aspecto, el polipéptido comprende además secuencias estructurales de cadena pesada de la región variable yuxtapuestas entre las HVR de acuerdo con la fórmula: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4). Aún en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. En otro aspecto, las secuencias estructurales son la secuencia estructural consenso de subgrupo III de VH. Todavía en otro aspecto, al menos una de las secuencias estructurales es la siguiente:

HC-FR1 es EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:8)
 HC-FR2 es WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:9)
 HC-FR3 es RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:10)
 HC-FR4 es WGQGLTVTSA (SEQ ID NO:11).

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

- (a) la secuencia de HVR-L1 es RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A (SEQ ID NO:12);
- (b) la secuencia de HVR-L2 es SASX₉LX₁₀S (SEQ ID NO:13);
- (c) la secuencia de HVR-L3 es QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T (SEQ ID NO:14);

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

Todavía en otro aspecto, la cadena ligera comprende además secuencias estructurales de cadena ligera de la región variable yuxtapuestas entre las HVR de acuerdo con la fórmula: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales son una estructura consenso de kappa I de VL. Todavía en otro aspecto, al menos una de las secuencias estructurales es la siguiente:

LC-FR1 es DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:15)
 LC-FR2 es WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:16)
 LC-FR3 es GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:17)
 LC-FR4 es FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:18).

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

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

- (i) la secuencia de HVR-H1 es GFTFSX₁SWIH; (SEQ ID NO:5)
- (ii) la secuencia de HVR-H2 es AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG (SEQ ID NO:6)
- (iii) la secuencia de HVR-H3 es RHWPGGFDY, y (SEQ ID NO:7)

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

- (i) la secuencia de HVR-L1 es RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A (SEQ ID NO:12)
- (ii) la secuencia de HVR-L2 es SASX₉LX₁₀S; y (SEQ ID NO:13)
- (iii) la secuencia de HVR-L3 es QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T; (SEQ ID NO:14)

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

10 En otro aspecto, la región variable de cadena pesada comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), y las regiones variables de cadena ligera comprenden una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena pesada se derivan de una secuencia del subgrupo I, II o III de Kabat. Todavía en otro aspecto, la secuencia estructural de la cadena pesada es una secuencia estructural consenso de subgrupo III de VH. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena pesada se exponen como SEQ ID NO:8, 9, 10 y 11. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo kappa I, II, III o IV de Kabat. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera son una secuencia estructural consenso de kappa I de VL. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena ligera se exponen como SEQ ID NO:15, 16, 17 y 18.

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

Aún en otra divulgación, se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 que comprende una secuencia de la región variable de cadena pesada y una de cadena ligera, en el que:

35 (a) la cadena pesada comprende además una secuencia de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con GFTFSDSWIH (SEQ ID NO:19), AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:20) y RHWPGGFDY (SEQ ID NO:21), respectivamente, o

40 (b) la cadena ligera comprende además una secuencia de HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:22), SASFLYS (SEQ ID NO:23) y QQYLYHPAT (SEQ ID NO:24), respectivamente.

45 En un aspecto específico, la identidad de secuencia es un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 %.

50 En otro aspecto, la región variable de cadena pesada comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), y las regiones variables de cadena ligera comprenden una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Aún en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena pesada se derivan de una secuencia del subgrupo I, II o III de Kabat. Todavía en otro aspecto, la secuencia estructural de la cadena pesada es una secuencia estructural consenso de subgrupo III de VH. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena pesada se exponen como SEQ ID NO:8, 9, 10 y 11. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo kappa I, II, III o IV de Kabat. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera son una secuencia estructural consenso de kappa I de VL. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena ligera se exponen como SEQ ID NO:15, 16, 17 y 18.

60 Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo comprende además una región constante humana o murina. Todavía

en otro aspecto, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Todavía en otro aspecto específico, la región constante humana es IgG1. Todavía en otro aspecto, la región constante murina se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Todavía en otro aspecto, la región constante murina es IgG2A. Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo tiene una función efectora reducida o mínima. Todavía en otro aspecto específico, la función efectora mínima es el resultado de una "mutación de Fc sin efector" o aglucosilación. Todavía en otra divulgación, la mutación de Fc sin efector es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

En otra divulgación se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de la región variable de cadena pesada y una de cadena ligera, en el que:

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRF
TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWQGGLTVTVSS (SEQ ID NO:25) y/o

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

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAWAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISLQPEDFATYYCQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:4).

En un aspecto específico, la identidad de secuencia es un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 %. En otro aspecto, la región variable de cadena pesada comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), y las regiones variables de cadena ligera comprenden una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Aún en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. En otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena pesada se derivan de una secuencia del subgrupo I, II o III de Kabat. Todavía en otro aspecto, la secuencia estructural de la cadena pesada es una secuencia estructural consenso de subgrupo III de VH. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena pesada se exponen como SEQ ID NO:8, 9, 10 y WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:27).

Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo kappa I, II, III o IV de Kabat. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera son una secuencia estructural consenso de kappa I de VL. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena ligera se exponen como SEQ ID NO:15, 16, 17 y 18.

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

En otro aspecto, la región variable de cadena pesada comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), y las regiones variables de cadena ligera comprenden una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena pesada se derivan de una secuencia del subgrupo I, II o III de Kabat. Todavía en otro aspecto, la secuencia estructural de la cadena pesada es una secuencia estructural consenso de subgrupo III de VH. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de cadena pesada es la siguiente:

HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	(SEQ ID NO:29)
HC-FR2	WVRQAPGKGLEWVA	(SEQ ID NO:30)
HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO:10)
HC-FR4	WGQGLTVTVSS	(SEQ ID NO:27).

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

LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	(SEQ ID NO:15)
LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO:16)
LC-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO:17)
LC-FR4	FGQGTKVEIK	(SEQ ID NO:28).

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

Aún en otra divulgación, se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 que comprende una secuencia de la región variable de cadena pesada y una de cadena ligera, en el que:

(c) la cadena pesada comprende además una secuencia de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con GFTFSDSWIH (SEQ ID NO:19), AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:20) y RHWPGGFDY (SEQ ID NO:21), respectivamente, y/o

(d) la cadena ligera comprende además una secuencia de HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:22), SASFLYS (SEQ ID NO:23) y QQYLYHPAT (SEQ ID NO:24), respectivamente.

En un aspecto específico, la identidad de secuencia es un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 %.

En otro aspecto, la región variable de cadena pesada comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), y las regiones variables de cadena ligera comprenden una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Aún en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena pesada se derivan de una secuencia del subgrupo I, II o III de Kabat. Todavía en otro aspecto, la secuencia estructural de la cadena pesada es una secuencia estructural consenso de subgrupo III de VH. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena pesada se exponen como SEQ ID NO:8, 9, 10 y WGQGLTVTVSSASTK (SEQ ID NO:31).

Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo kappa I, II, III o IV de Kabat. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera son una secuencia estructural consenso de kappa I de VL. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena ligera se exponen como SEQ ID NO:15, 16, 17 y 18. Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo comprende además una región constante humana o murina. Todavía en otro aspecto, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Todavía en otro aspecto específico, la región constante humana es IgG1. Todavía en otro aspecto, la región constante murina se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Todavía en otro aspecto, la región constante murina es IgG2A. Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo tiene una función efectora reducida o mínima. Todavía en otro aspecto específico, la función efectora mínima es el resultado de una "mutación de Fc sin efector" o aglucosilación. Todavía en otra divulgación, la mutación de Fc sin efector es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

Todavía en otra divulgación, se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de la región variable de cadena pesada y una de cadena ligera, en el que:

(a) la secuencia de la cadena pesada tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de la cadena pesada: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSSASTK (SEQ ID NO:26) o

(b) la secuencia de la cadena ligera tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de la cadena ligera: DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSYGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:4).

En algunas divulgaciones se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de la región variable de cadena pesada y cadena ligera, en el que la secuencia de la región variable de cadena ligera tiene al menos

un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4. En algunas divulgaciones se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de la región variable de cadena pesada y cadena ligera, en el que la secuencia de la región variable de cadena pesada tiene al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26. En algunas divulgaciones se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de la región variable de cadena pesada y cadena ligera, en el que la secuencia de la región variable de cadena ligera tiene al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y la secuencia de la región variable de cadena pesada tiene al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26. En algunas divulgaciones, uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos aminoacídicos en el extremo N terminal de la cadena pesada y/o ligera se pueden eliminar, sustituir o modificar.

Todavía en otra divulgación, se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que:

(a) la secuencia de la cadena pesada tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de la cadena pesada:
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAVISPYGGSTYYADSVKGRF
 TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
 GGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
 SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
 PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:32) y/o

(b) la secuencia de la cadena ligera tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de la cadena ligera:
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD
 FTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYF
 REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
 RGEK (SEQ ID NO:33).

En algunas divulgaciones se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que la secuencia de la cadena ligera tiene al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33. En algunas divulgaciones se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que la secuencia de la cadena pesada tiene al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32. En algunas divulgaciones se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que la secuencia de la cadena ligera tiene al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y la secuencia de la cadena pesada tiene al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32.

En algunas divulgaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 aislado está aglucosilado. La glucosilación de anticuerpos está

típicamente unida a N o bien unida a O. Unida a N se refiere al acoplamiento del resto glucídico a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para el acoplamiento enzimático del resto glucídico a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación unida a O se refiere al acoplamiento de uno de los glúcidos N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, lo más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. La eliminación de sitios de glucosilación para formar un anticuerpo se logra convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se elimine una de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glucosilación unida a N). La alteración se puede realizar por sustitución de un residuo de asparagina, serina o treonina dentro del sitio de glucosilación con otro residuo aminoacídico (por ejemplo, glicina, alanina o una sustitución conservadora).

En cualquiera de las divulgaciones en el presente documento, el anticuerpo anti-PD-L1 aislado se puede unir a un PD-L1 humano, por ejemplo, un PD-L1 humano como se muestra en el n.º de acceso a UniProtKB/Swiss-Prot Q9NZQ7.1, o una variante del mismo.

Todavía en otra divulgación, se proporcionan ácidos nucleicos aislados que codifican cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento. En algunas divulgaciones, el ácido nucleico comprende además un vector adecuado para la expresión del ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 descritos previamente. Todavía en otro aspecto específico, el vector es una célula huésped adecuada para la expresión del ácido nucleico. Todavía en otro aspecto específico, la célula huésped es una célula eucariota o una célula procariota. Todavía en otro aspecto específico, la célula eucariota es una célula de mamífero, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO).

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

III. Preparación de anticuerpos

El anticuerpo descrito en el presente documento se prepara usando técnicas disponibles en la técnica para generar anticuerpos, cuyos procedimientos ejemplares se describen con más detalle en las siguientes secciones.

El anticuerpo se dirige contra un antígeno de interés (por ejemplo, PD-L1 (tal como un PD-L1 humano), PD1 (tal como PD-L1 humano), PD-L2 (tal como PD-L2 humano), etc.). Preferentemente, el antígeno es un polipéptido biológicamente importante y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece un trastorno puede dar como resultado un beneficio terapéutico en dicho mamífero.

En determinadas divulgaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 150 \text{ nM}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 50 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

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

De acuerdo con otra divulgación, la K_d se mide usando ensayos de resonancia de plasmones superficiales usando un BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR). En resumen, se activan matrices de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore, Inc.) con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio

10 mM, pH 4,8, hasta 5 µg/ml (aproximadamente 0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Tras la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones seriadas al 2 % de Fab (de 0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo polisorbato 20 (TWEEN-20™) (PBST) al 0,05 % a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Se calculan las velocidades de asociación (k_{aso}) y velocidades de disociación (k_{dis}) usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno sencillo (programa informático de evaluación de BIACORE®, versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensoigramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calcula como la proporción k_{dis}/k_{aso} . Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). Si la velocidad de asociación supera $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmones superficiales anterior, entonces la velocidad de asociación se puede determinar usando una técnica de extinción fluorescente que mide el incremento o disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo (forma Fab) antiantígeno 20 nM en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con interrupción de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

(i) *Preparación de antígeno*

Se pueden usar antígenos o fragmentos de los mismos solubles, opcionalmente conjugados con otras moléculas, como inmunógenos para generar anticuerpos. Para moléculas transmembranarias, tales como receptores, se pueden usar fragmentos de estos (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor) como inmunógeno. De forma alternativa, se pueden usar células que expresan la molécula transmembranaria como inmunógeno. Se pueden derivar dichas células de una fuente natural (por ejemplo, líneas celulares de cáncer) o pueden ser células que se han transformado por técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembranaria. Otros antígenos y formas de los mismos útiles para preparar anticuerpos serán evidentes para los expertos en la técnica.

(ii) *Determinados procedimientos basados en anticuerpos*

Los anticuerpos policlonales se obtienen preferentemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (s.c.) o intraperitoneales (i.p.) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente con una proteína que sea inmunógena en la especie que se va a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, seroalbúmina, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja, usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

Se inmunizan animales contra el antígeno, conjugados inmunógenos o derivados combinando, por ejemplo, 100 µg o 5 µg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes más tarde, se administra a los animales una dosis de refuerzo con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 días más tarde se extrae sangre de los animales y el suero se somete a ensayo para determinar el valor de los anticuerpos. Se administra una dosis de refuerzo a los animales hasta alcanzar una meseta del valor. Preferentemente, se administra una dosis de refuerzo al animal con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. También se pueden preparar conjugados en cultivo celular recombinante como fusiones de proteínas. Además, se usan adecuadamente agentes de agregación, tales como alumbre, para potenciar la respuesta inmunitaria.

Se pueden preparar anticuerpos monoclonales de la invención usando el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), y descrito además, por ejemplo, en Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2.ª ed. 1988); Hammerling *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981), y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) con respecto a los hibridomas humanos-humanos. Procedimientos adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.189.826 con respecto a la producción de anticuerpos monoclonales IgM natural humana a partir de líneas celulares de hibridoma. La tecnología de hibridomas humanos (tecnología de triomas) se describe en Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y en Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

Para otras técnicas de hibridoma diversas, véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de EE. UU. n.ºs 2006/258841; 2006/183887 (anticuerpos totalmente humanos), 2006/059575; 2005/287149; 2005/100546; y 2005/026229; y las patentes de EE. UU. n.ºs 7.078.492 y 7.153.507. Un protocolo ejemplar para producir anticuerpos monoclonales usando el procedimiento de hibridoma se describe como sigue. En una divulgación, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, se inmuniza para generar linfocitos que producen o pueden producir anticuerpos que se unen específicamente a la proteína usada para la inmunización. Los anticuerpos se generan en los animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (s.c.) o intraperitoneales (i.p.) de un polipéptido de la divulgación o un fragmento del mismo, y un adyuvante, tal como monofosforil lípido A (MPL)/dicrinomicolato de trehalosa (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT). Se puede preparar un polipéptido de la divulgación (por ejemplo, antígeno) o un fragmento del mismo usando procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como procedimientos recombinantes,

de los que algunos se describen además en el presente documento. Se somete a ensayo el suero de los animales inmunizados para detectar anticuerpos antiantígeno, y se administran opcionalmente inmunizaciones de refuerzo. Se aíslan los linfocitos de animales que producen anticuerpos antiantígeno. De forma alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*.

Los linfocitos se fusionan a continuación con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Véase, por ejemplo, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pág. 59-103 (Academic Press, 1986). Se pueden usar células de mieloma que se fusionan eficazmente, mantienen una producción estable de alto nivel de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio, tal como el medio HAT. Las células de mieloma ejemplares incluyen, pero no se limitan a, líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles de Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EE. UU., y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la American Type Culture Collection, Rockville, Md., EE. UU. También se han descrito líneas celulares de heteromieloma de ratón-humano y mieloma humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo, un medio que contenga una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma originales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma originales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), evitando dichas sustancias el crecimiento de células carentes de HGPRT. Preferentemente, se usan procedimientos de cultivo de células de hibridoma sin suero para reducir el uso de suero derivado de animales tal como suero fetal bovino, como se describe, por ejemplo, en Even *et al.*, *Trends in Biotechnology*, 24(3), 105-108 (2006).

Los oligopéptidos como herramientas para mejorar la productividad de los cultivos de células de hibridoma se describen en Franek, *Trends in Monoclonal Antibody Research*, 111-122 (2005). Específicamente, se enriquecen medios de cultivo estándar con determinados aminoácidos (alanina, serina, asparagina, prolina) o con fracciones de hidrolizado de proteínas, y la apoptosis se puede suprimir significativamente por oligopéptidos sintéticos, constituidos por tres a seis residuos aminoacídicos. Los péptidos están presentes en concentraciones milimolares o mayores.

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se puede someter a ensayo para la producción de anticuerpos monoclonales que se unen a un anticuerpo de la invención. Se determina la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA). La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante análisis de Scatchard. Véase, por ejemplo, Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Después de que se identifican las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y cultivar mediante procedimientos estándar. Véase, por ejemplo, Goding, *supra*. Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como tumores ascíticos en un animal. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, líquido ascítico o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. Un procedimiento para el aislamiento de proteínas a partir de células de hibridoma se describe en el documento US 2005/176122 y la patente de EE. UU. n.º 6.919.436. El procedimiento incluye el uso de sales mínimas, tales como sales liotrópicas, en el procedimiento de unión y preferentemente también el uso de pequeñas cantidades de disolventes orgánicos en el procedimiento de elución.

(iii) Anticuerpos derivados de colecciones

Se pueden aislar los anticuerpos de la invención cribando colecciones combinatorias para determinar los anticuerpos con la actividad o actividades deseada(s). Por ejemplo, una variedad de procedimientos es conocida en la técnica para generar colecciones de presentación en fagos y cribar dichas colecciones para determinar anticuerpos que posean las características de unión deseadas. Procedimientos adicionales se revisan, por ejemplo, en Hoogenboom *et al.*, en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen, además, por ejemplo, en McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554; Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992); Marks y Bradbury, en *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004).

En determinados procedimientos de presentación en fagos, los repertorios de genes de VH y VL se clonan por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en colecciones de fagos, que a continuación se pueden cribar para determinar el fago de unión a antígeno como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev.*

Immunol., 12: 433-455 (1994). Típicamente, los fagos presentan fragmentos de anticuerpo, como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o bien como fragmentos Fab. Las colecciones de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad por el inmunógeno sin el requisito de construir hibridomas. De forma alternativa, se puede clonar el repertorio sin exposición previa (por ejemplo, de un ser humano) para proporcionar una única fuente de anticuerpos para una amplia gama de antígenos propios y también no propios sin ninguna inmunización como se describe por Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Finalmente, también se pueden preparar de manera sintética colecciones sin exposición previa clonando segmentos génicos V no reordenados a partir de células madre y usando cebadores de PCR que contienen secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 altamente variables y conseguir el reordenamiento *in vitro*, como se describe por Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patente que describen colecciones de fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: la patente de EE. UU. n.º 5.750.373 y las publicaciones de patente de EE. UU. n.ºs 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo aislados de colecciones de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpo humano en el presente documento.

(iv) *Anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos*

En determinadas divulgaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo quimérico. Determinados anticuerpos quiméricos se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En otro ejemplo, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo de "clase cambiada" en el que se ha cambiado la clase o subclase respecto a la del anticuerpo original. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

En determinadas divulgaciones, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente, se humaniza un anticuerpo no humano para reducir la inmunogenicidad en los seres humanos, mientras que se retienen la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano original. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR (o partes de las mismas), se derivan de un anticuerpo no humano y las FR (o partes de las mismas) se derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante humana. En algunas divulgaciones, se sustituyen algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado con los residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que se derivan los residuos de HVR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los procedimientos para prepararlos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), y se describen, además, por ejemplo, en Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); las patentes de EE. UU. n.ºs 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Kashmiri *et al.*, *Methods* 36:25-34 (2005) (que describe el injerto en la SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (que describe el "rebornizado"); Dall'Acqua *et al.*, *Methods* 36:43-60 (2005) (que describe el "barajado de FR"); y Osbourn *et al.*, *Methods* 36:61-68 (2005) y Klimka *et al.*, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (que describe el enfoque de "selección guiada" para el barajado de FR).

Las regiones estructurales humanas que se pueden usar para la humanización incluyen, pero no se limitan a: regiones estructurales seleccionadas usando el procedimiento de "mejor ajuste" (véase, por ejemplo, Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993)); regiones estructurales derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de la cadena ligera o pesada (véase, por ejemplo, Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); y Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regiones estructurales maduras (mutadas somáticamente) humanas o regiones estructurales de la estirpe germinal humana (véase, por ejemplo, Almagro y Fransson, *Front. Biosci.*, 13:1619-1633 (2008)); y regiones estructurales derivadas del cribado de colecciones de FR (véase, por ejemplo, Baca *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) y Rosok *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

En determinadas divulgaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo humano. Se pueden producir anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Se describen, en general, anticuerpos humanos en van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) y Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

Se pueden preparar anticuerpos humanos administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se haya modificado para producir anticuerpos humanos inalterados o anticuerpos inalterados con regiones variables humanas en respuesta a la exposición antigénica. Dichos animales típicamente contienen la totalidad o una parte de los locus de inmunoglobulina humana, que reemplazan a los locus de inmunoglobulina endógena, o que están presentes de forma extracromosómica o integrados aleatoriamente en los cromosomas del animal. En dichos ratones transgénicos, los locus de inmunoglobulina endógena, en general, se han inactivado. Para una revisión de los procedimientos para obtener anticuerpos humanos de animales transgénicos, véase Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Véanse también, por ejemplo, las patentes de

EE. UU. n.ºs 6.075.181 y 6.150.584 que describen la tecnología XENOMOUSE™; la patente de EE. UU. n.º 5.770.429 que describe la tecnología HUMAB®; la patente de EE. UU. n.º 7.041.870 que describe la tecnología K-M MOUSE® y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®. Las regiones variables humanas de anticuerpos inalterados generados por dichos animales se pueden modificar adicionalmente, por ejemplo, mediante combinación con una región constante humana diferente.

También se pueden preparar anticuerpos humanos mediante procedimientos basados en hibridoma. Se han descrito líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma humano-murino para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Véase, por ejemplo, Kozbor *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147:86 (1991).) Los anticuerpos humanos generados a través de la tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos también se describen en Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Procedimientos adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales a partir de líneas celulares de hibridomas) y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (que describe hibridomas humanos-humanos). La tecnología de hibridomas humanos (tecnología de triomas) también se describe en Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y en Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

También se pueden generar anticuerpos humanos aislando secuencias de dominio variable del clon Fv seleccionadas de colecciones de presentación en fagos derivadas de seres humanos. A continuación, se pueden combinar dichas secuencias de dominio variable con un dominio constante humano deseado. Las técnicas para seleccionar anticuerpos humanos de colecciones de anticuerpos se describen a continuación.

(v) Fragmentos de anticuerpo

Se pueden generar fragmentos de anticuerpo por medios tradicionales, tales como digestión enzimática, o por técnicas recombinantes. En determinadas circunstancias, existen ventajas del uso de fragmentos de anticuerpo, en lugar de anticuerpos completos. El tamaño más pequeño de los fragmentos permite un aclaramiento rápido y puede dar lugar a un acceso mejorado a tumores sólidos. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson *et al.* (2003) *Nat. Med.* 9:129-134.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban por medio de digestión proteolítica de anticuerpos inalterados (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir ahora directamente mediante células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv se pueden expresar en y secretar a partir de *E. coli*, permitiendo de este modo la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Se pueden aislar fragmentos de anticuerpo de las colecciones de fagos de anticuerpos analizadas anteriormente. De forma alternativa, se pueden recuperar directamente fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplar químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, se pueden aislar directamente fragmentos F(ab')₂ a partir del cultivo de células huésped recombinantes. El fragmento Fab y F(ab')₂ con semivida *in vivo* incrementada que comprende residuos de epítipo de unión a receptor de rescate se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el experto en la técnica. En determinadas divulgaciones, un anticuerpo es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véanse, por ejemplo, el documento WO 93/16185; las patentes de EE. UU. n.ºs 5.571.894 y 5.587.458. El Fv y el scFv son las únicas especies con sitios de combinación inalterados que carecen de regiones constantes; por tanto, pueden ser adecuados para una unión no específica reducida durante el uso *in vivo*. Se pueden construir proteínas de fusión de scFv para producir la fusión de una proteína efectora en el extremo amínico o bien carboxílico de un scFv. Véase *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, *supra*. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.641.870, por ejemplo. Dichos anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

(vi) Anticuerpos multiespecíficos

Los anticuerpos multiespecíficos tienen especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes, donde los epítopos son habitualmente de diferentes antígenos. Si bien dichas moléculas normalmente solo se unirán a dos antígenos (es decir, anticuerpos biespecíficos, BsAb), los anticuerpos con especificidades adicionales tales como anticuerpos triespecíficos están englobados por esta expresión cuando se usan en el presente documento. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

En la técnica son conocidos procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes (véase, por ejemplo, Millstein *et al.*, *Nature* 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las que solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza normalmente mediante etapas de

cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa y los rendimientos de producto son bajos. Se divulgan procedimientos similares en el documento WO 93/08829 y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

Un enfoque conocido en la técnica para preparar anticuerpos biespecíficos es el enfoque de "botones en ojales" o "protuberancia en cavidad" (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.731.168). En este enfoque, dos polipéptidos de inmunoglobulina (por ejemplo, polipéptidos de cadena pesada) comprenden cada uno una interfase. Una interfase de un polipéptido de inmunoglobulina interactúa con una interfase correspondiente en el otro polipéptido de inmunoglobulina, permitiendo de este modo que los dos polipéptidos de inmunoglobulina se asocien. Estas interfaces se pueden genomanipular de modo que un "botón" o "protuberancia" (estos términos se pueden usar de manera intercambiable en el presente documento) localizado en la interfase de un polipéptido de inmunoglobulina se corresponda con un "ojal" o "cavidad" (estos términos se pueden usar de manera intercambiable en el presente documento) localizado en la interfase del otro polipéptido de inmunoglobulina. En algunas divulgaciones, el orificio tiene un tamaño idéntico o similar al ojal y está situado adecuadamente de modo que, cuando las dos interfaces interactúan, el botón de una interfase se puede situar en el ojal correspondiente de la otra interfase. Sin deseo de limitación a teoría alguna, se cree que esto estabiliza el heteromultímero y favorece la formación del heteromultímero sobre otras especies, por ejemplo, homomultímeros. En algunas divulgaciones, este enfoque se puede usar para promover la heteromultimerización de dos polipéptidos de inmunoglobulina diferentes, creando un anticuerpo biespecífico que comprende dos polipéptidos de inmunoglobulina con especificidades de unión para diferentes epítopos.

En algunas divulgaciones, se puede construir un botón reemplazando una pequeña cadena lateral aminoacídica con una cadena lateral más grande. En algunas divulgaciones, se puede construir un ojal reemplazando una cadena lateral aminoacídica grande con una cadena lateral más pequeña. Pueden existir botones u ojales en la interfase original, o se pueden introducir sintéticamente. Por ejemplo, se pueden introducir botones u ojales sintéticamente alterando la secuencia de ácido nucleico que codifica la interfase para reemplazar al menos un residuo aminoacídico "original" con al menos un residuo aminoacídico "importado". Los procedimientos para alterar las secuencias de ácido nucleico pueden incluir técnicas estándar de biología molecular bien conocidas en la técnica. Los volúmenes de cadena lateral de diversos residuos aminoacídicos se muestran en la siguiente tabla. En algunas divulgaciones, los residuos originales tienen un volumen pequeño de cadena lateral (por ejemplo, alanina, asparagina, ácido aspártico, glicina, serina, treonina o valina), y los residuos de importación para formar un botón son aminoácidos naturales y pueden incluir arginina, fenilalanina, tirosina y triptófano. En algunas divulgaciones, los residuos originales tienen un gran volumen de cadena lateral (por ejemplo, arginina, fenilalanina, tirosina y triptófano), y los residuos de importación para formar un ojal son aminoácidos naturales y pueden incluir alanina, serina, treonina y valina.

Tabla 1. Propiedades de residuos aminoacídicos

Aminoácido	Abreviatura de una letra	Masa ^a (dalton)	Volumen ^b (Å ³)	Área de superficie accesible ^c (Å ²)
Alanina (Ala)	A	71,08	88,6	115
Arginina (Arg)	R	156,20	173,4	225
Asparagina (Asn)	N	114,11	117,7	160
Ácido aspártico (Asp)	D	115,09	111,1	150
Cisteína (Cys)	C	103,14	108,5	135
Glutamina (Gln)	Q	128,14	143,9	180
Ácido glutámico (Glu)	E	129,12	138,4	190
Glicina (Gly)	G	57,06	60,1	75
Histidina (His)	H	137,15	153,2	195
Isoleucina (Ile)	I	113,17	166,7	175
Leucina (Leu)	L	113,17	166,7	170
Lisina (Lys)	K	128,18	168,6	200
Metionina (Met)	M	131,21	162,9	185
Fenilalanina (Phe)	F	147,18	189,9	210
Prolina (Pro)	P	97,12	122,7	145
Serina (Ser)	S	87,08	89,0	115
Treonina (Thr)	T	101,11	116,1	140
Triptófano (Trp)	W	186,21	227,8	255
Tirosina (Tyr)	Y	163,18	193,6	230

Aminoácido	Abreviatura de una letra	Masa ^a (dalton)	Volumen ^b (Å ³)	Área de superficie accesible ^c (Å ²)
Valina (Val)	V	99,14	140,0	155

^a Peso molecular del aminoácido menos el del agua. Valores de *Handbook of Chemistry and Physics*, 43.^a ed. Cleveland, Chemical Rubber Publishing Co., 1961.

5 ^b Valores de A.A. Zamyatin, Prog. Biophys. Mol. Biol. 24:107-123, 1972.

^c Valores de C. Chothia, J. Mol. Biol. 105:1-14, 1975. El área de superficie accesible se define en las figuras 6-20 de esta referencia.

10 En algunas divulgaciones, los residuos originales para formar un botón u ojal se identifican en base a la estructura tridimensional del heteromultímero. Las técnicas conocidas en la técnica para obtener una estructura tridimensional pueden incluir cristalografía de rayos X y RMN. En algunas divulgaciones, la interfase es el dominio CH3 de un dominio constante de inmunoglobulina. En estas divulgaciones, la interfase CH3/CH3 de IgG₁ humana implica dieciséis residuos en cada dominio localizado en cuatro hebras β antiparalelas. Sin deseo de limitación a teoría alguna, los residuos mutados se localizan preferentemente en las dos hebras β antiparalelas centrales para minimizar el riesgo de que el disolvente circundante pueda acomodar los botones, en lugar de los ojales compensatorios en el dominio CH3 compañero. En algunas divulgaciones, las mutaciones que forman los botones y ojales correspondientes en dos polipéptidos de inmunoglobulina corresponden a uno o más pares proporcionados en la siguiente tabla.

20 **Tabla 2. Conjuntos ejemplares de mutaciones que forman los botones y ojales correspondientes**

CH3 de primera inmunoglobulina	CH3 de segunda inmunoglobulina
T366Y	Y407T
T366W	Y407A
F405A	T394W
Y407T	T366Y
T366Y:F405A	T394W:Y407T
T366W:F405W	T394S:Y407A
F405W:Y407A	T366W:T394S
F405W	T394S

25 Las mutaciones se indican por el residuo original, seguido de la posición usando el sistema de numeración de Kabat, y a continuación el residuo de importación (todos los residuos se dan en código de aminoácidos de una letra). Las mutaciones múltiples están separadas por dos puntos.

30 En algunas divulgaciones, un polipéptido de inmunoglobulina comprende un dominio CH3 que comprende una o más sustituciones aminoacídicas enumeradas en la tabla 2 anterior. En algunas divulgaciones, un anticuerpo biespecífico comprende un primer polipéptido de inmunoglobulina que comprende un dominio CH3 que comprende una o más sustituciones aminoacídicas enumeradas en la columna izquierda de la tabla 2, y un segundo polipéptido de inmunoglobulina que comprende un dominio CH3 que comprende una o más sustituciones aminoacídicas correspondientes enumeradas en la columna derecha de la tabla 2.

35 Después de la mutación del ADN como se analiza anteriormente, los polinucleótidos que codifican polipéptidos de inmunoglobulina modificada con una o más mutaciones que forman los botones u ojales correspondientes se pueden expresar y purificar usando técnicas recombinantes estándar y sistemas celulares conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 5.731.168; 5.807.706; 5.821.333; 7.642.228; 7.695.936; 8.216.805; la publicación de EE. UU. n.º 2013/0089553; y Spiess *et al.*, Nature Biotechnology 31: 753-758, 2013. Se pueden producir polipéptidos de inmunoglobulina modificada usando células huésped procariotas, tal como *E. coli*, o células huésped eucariotas, tales como células CHO. Los polipéptidos de inmunoglobulina que portan los botones y ojales correspondientes se pueden expresar en células huésped en cocultivo y purificar conjuntamente como un heteromultímero, o se pueden expresar en cultivos individuales, purificar por separado y ensamblar *in vitro*. En algunas divulgaciones, dos cepas de células huésped bacterianas (una que expresa un polipéptido de inmunoglobulina con un botón y la otra que expresa un polipéptido de inmunoglobulina con un ojal) se cocultivan usando técnicas de cultivo bacteriano estándar conocidas en la técnica. En algunas divulgaciones, las dos cepas se pueden mezclar en una proporción específica, por ejemplo, para lograr niveles de expresión iguales en cultivo. En algunas divulgaciones, las dos cepas se pueden mezclar en una proporción 50:50, 60:40 o 70:30. Después de la expresión del polipéptido, las células se pueden lisar conjuntamente y se pueden extraer las proteínas. Las técnicas estándar conocidas en la técnica que permiten medir la abundancia de especies homomultiméricas frente a heteromultiméricas pueden incluir cromatografía de exclusión por tamaño. En algunas

divulgaciones, cada polipéptido de inmunoglobulina modificada se expresa por separado usando técnicas recombinantes estándar, y se pueden ensamblar conjuntamente *in vitro*. El ensamblaje se puede lograr, por ejemplo, purificando cada polipéptido de inmunoglobulina modificada, mezclándolos e incubándolos conjuntamente en igual masa, reduciendo los disulfuros (por ejemplo, mediante tratamiento con ditiotreitól), concentrando y reoxidando los polipéptidos. Los anticuerpos

5 bienespecíficos formados se pueden purificar usando técnicas estándar que incluyen cromatografía de intercambio catiónico y medir usando técnicas estándar que incluyen cromatografía de exclusión por tamaño. Para una descripción más detallada de estos procedimientos, véase Speiss *et al.*, *Nat. Biotecnología* 31:753-8, 2013. En algunas divulgaciones, los polipéptidos de inmunoglobulina modificada se pueden expresar por separado en células CHO y ensamblar *in vitro* usando los procedimientos descritos anteriormente.

10 De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Es típico que la primera región constante de cadena pesada (CH1) contenga

15 el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones con la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad al ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en divulgaciones en las que proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos

20 óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las proporciones no son de particular importancia.

25 En una divulgación de este enfoque, los anticuerpos bienespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto bienespecífico deseado de combinaciones indeseadas de cadenas de inmunoglobulina, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula bienespecífica proporciona una manera fácil de separación. Este enfoque se divulga en el documento WO 94/04690. Para

30 obtener más detalles de la generación de anticuerpos bienespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en el documento WO 96/27011, la interfase entre un par de moléculas de anticuerpo se puede genomanipular para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. Una interfase comprende al menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En

35 este procedimiento, una o más cadenas laterales aminoácidas pequeñas de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando las cadenas laterales aminoácidas grandes con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos

40 finales indeseados, tales como homodímeros.

Los anticuerpos bienespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, se puede acoplar uno de los anticuerpos en el heteroconjugado a avidina, el otro a biotina. Por ejemplo, se han propuesto dichos anticuerpos

45 para dirigir células del sistema inmunitario a células indeseadas (patente de EE. UU. n.º 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por el VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Se pueden preparar anticuerpos heteroconjugados usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se divulgan en la patente de EE. UU. n.º 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

50 En la literatura también se han descrito técnicas para generar anticuerpos bienespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos bienespecíficos usando enlace químico. Brennan *et al.*, *Science* 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que se escinden proteolíticamente anticuerpos inalterados para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente arsenito de sodio que forma complejos con ditiol para estabilizar los ditiolos vecinos y evitar la formación de disulfuro intermolecular. A continuación, los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). A continuación, uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte en Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro

55 derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo bienespecífico. Los anticuerpos bienespecíficos producidos se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

60 Los recientes progresos han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos bienespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de F(ab')₂ de anticuerpo bienespecífico totalmente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo bienespecífico.

65 También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar directamente fragmentos de anticuerpo bienespecífico del

cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun se enlazaron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región de bisagra para formar monómeros y, a continuación, se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V_L) mediante un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, se obliga a que los dominios V_H y V_L de un fragmento se emparejen con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha informado de otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico mediante el uso de dímeros de Fv monocatenario (sFv). Véase Gruber *et al.*, *J. Immunol.* 152:5368 (1994).

Otra técnica para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico es el "acoplador de linfocitos T biespecífico" o enfoque BiTE® (véanse, por ejemplo, los documentos WO 2004/106381, WO 2005/061547, WO 2007/042261 y WO 2008/119567). Este enfoque utiliza dos dominios variables de anticuerpos dispuestos en un único polipéptido. Por ejemplo, una cadena polipeptídica única incluye dos fragmentos Fv monocatenarios (scFv), teniendo cada uno de ellos un dominio de cadena pesada variable (V_H) y uno de cadena ligera variable (V_L) separados por un conector polipeptídico de una longitud suficiente para permitir la asociación intramolecular entre los dos dominios. Este polipéptido único incluye además una secuencia espaciadora polipeptídica entre los dos fragmentos scFv. Cada scFv reconoce un epítipo diferente, y estos epítipos pueden ser específicos para diferentes tipos de células, de modo que las células de dos tipos de células diferentes se acercan o anclan cuando cada scFv se conecta con su epítipo afín. Una divulgación particular de este enfoque incluye un scFv que reconoce un antígeno de la superficie celular expresado por una célula inmunitaria, por ejemplo, un polipéptido CD3 en un linfocito T, enlazado a otro scFv que reconoce un antígeno de la superficie celular expresado por una célula diana, tal como una célula cancerosa o tumoral.

Como es un polipéptido único, el acoplador de linfocitos T biespecífico se puede expresar usando cualquier sistema de expresión de células procariotas o eucariotas conocido en la técnica, por ejemplo, una línea celular CHO. Sin embargo, pueden ser necesarias técnicas de purificación específicas (véase, por ejemplo, el documento EP 1691833) para separar acopladores de linfocitos T biespecíficos monoméricos de otras especies multiméricas, que pueden tener actividades biológicas distintas de la actividad prevista del monómero. En un esquema de purificación ejemplar, una solución que contiene polipéptidos secretados se somete en primer lugar a una cromatografía de afinidad por metales, y los polipéptidos se eluyen con un gradiente de concentraciones de imidazol. Este eluido se purifica además usando cromatografía de intercambio aniónico, y los polipéptidos se eluyen usando un gradiente de concentraciones de cloruro de sodio. Finalmente, este eluido se somete a cromatografía de exclusión por tamaño para separar monómeros de especies multiméricas.

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

(vii) Anticuerpos de dominio único

En algunas divulgaciones, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo de dominio único. Un anticuerpo de dominio único es una cadena polipeptídica única que comprende la totalidad o una parte del dominio variable de cadena pesada o la totalidad o una parte del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En determinadas divulgaciones, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, Mass.; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.248.516 B1). En una divulgación, un anticuerpo de dominio único consiste en la totalidad o una parte del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo.

(viii) Variantes de anticuerpos

En algunas divulgaciones, se contempla una o más modificaciones de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo se pueden preparar introduciendo cambios apropiados en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácidos se pueden introducir en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo del sujeto en el momento en que se prepara esa secuencia.

(ix) Variantes de sustitución, inserción y deleción

En determinadas divulgaciones, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones aminoacídicas. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las HVR y las FR. En la tabla 1 se

muestran sustituciones conservadoras bajo el encabezado de "sustituciones conservadoras". Se proporcionan cambios más sustanciales en la tabla 1 bajo el encabezado de "sustituciones ejemplares" y como se describe además a continuación en referencia a las clases de cadena lateral aminoacídica. Se pueden introducir sustituciones aminoacídicas en un anticuerpo de interés y cribar los productos para determinar una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno retenida/mejorada, inmunogenicidad disminuida, o ADCC o CDC mejorada.

Tabla 3. Sustituciones ejemplares.

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

10 Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con propiedades de cadena lateral comunes:

- a. hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- b. hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- c. ácidos: Asp, Glu;
- d. básicos: His, Lys, Arg;
- e. residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- f. aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras supondrán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo original (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para su estudio adicional tendrá(n) modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad incrementada, inmunogenicidad reducida) en relación con el anticuerpo original y/o habrá(n) retenido sustancialmente determinadas propiedades biológicas del anticuerpo original. Una variante de sustitución ejemplar es un anticuerpo madurado en afinidad, que se puede generar convenientemente, por ejemplo, usando técnicas de maduración de la afinidad basadas en presentación en fagos, tales como las descritas en el presente documento. En resumen, se mutan uno o más residuos de HVR y los anticuerpos variantes se presentan en fagos y se criban para determinar una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión).

Se pueden realizar alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en las HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Se pueden realizar dichas alteraciones en "puntos calientes" de la HVR, es decir, residuos codificados por codones que se someten a una mutación con alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (véase, por

ejemplo, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), y/o en las SDR (las a-CDR), sometiendo a prueba el VH o VL variante resultante para determinar su afinidad de unión. La maduración de la afinidad mediante construcción y reelección de colecciones secundarias se ha descrito, por ejemplo, en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). En algunas divulgaciones de la maduración de la afinidad, se introduce diversidad en los genes variables elegidos para la maduración mediante cualquiera de una variedad de procedimientos (por ejemplo, PCR propensa a error, barajado de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). A continuación, se crea una segunda colección. A continuación, se criba la colección para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro procedimiento para introducir diversidad implica enfoques dirigidos a HVR, en los que se aleatorizan varios residuos de HVR (por ejemplo, 4-6 residuos a la vez). Se pueden identificar específicamente los residuos de HVR implicados en la unión a antígeno, por ejemplo, usando modelado o mutagénesis por barrido de alanina. A menudo se seleccionan en particular CDR-H3 y CDR-L3.

En determinadas divulgaciones, se pueden producir sustituciones, inserciones o deleciones dentro de una o más HVR, siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo de unirse al antígeno. Por ejemplo, se pueden realizar alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras como se proporciona en el presente documento) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión en las HVR. Dichas alteraciones pueden estar fuera de los "puntos calientes" de la HVR o las SDR. En determinadas divulgaciones de las secuencias de VH y VL variantes proporcionadas anteriormente, cada HVR está inalterada o bien no contiene más de una, dos o tres sustituciones aminoacídicas.

Un procedimiento útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que se pueden seleccionar como diana para la mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe por Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. En este procedimiento se identifica un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados, tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Se pueden introducir otras sustituciones en las localizaciones de aminoácidos que demuestren sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. De forma alternativa, o adicionalmente, una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos adyacentes se pueden seleccionar o eliminar como candidatos para la sustitución. Se pueden cribar variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxiterminales que varían en longitud desde un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuenciales de residuos aminoacídicos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que incrementa la semivida en suero del anticuerpo.

(x) Variantes de glucosilación

En determinadas divulgaciones, se altera un anticuerpo proporcionado en el presente documento para incrementar o disminuir el grado en el que el anticuerpo se glucosila. La adición o deleción de sitios de glucosilación a un anticuerpo se puede conseguir convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se creen o eliminen uno o más sitios de glucosilación.

Si el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el glúcido fijado a la misma. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero comprenden típicamente un oligosacárido biantenarico ramificado que se fija, en general, mediante un enlace de N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright *et al.* *TIBTECH* 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos glúcidos, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura de oligosacárido biantenarico. En algunas divulgaciones, se pueden realizar modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención para crear variantes de anticuerpo con determinadas propiedades mejoradas.

En una divulgación, se proporcionan variantes de anticuerpo que comprenden una región Fc en la que una estructura glucídica unida a la región Fc tiene fucosa reducida o carece de fucosa, lo que puede mejorar la función de ADCC. Específicamente, se contemplan anticuerpos en el presente documento que tienen fucosa reducida en relación con la cantidad de fucosa en el mismo anticuerpo producido en una célula CHO natural. Es decir, se caracterizan por tener una cantidad menor de fucosa de la que de otro modo tendrían si se produjeran por células CHO naturales (por ejemplo, una célula CHO que produce un patrón de glucosilación natural, tal como una célula CHO que contiene un gen FUT8 natural). En determinadas divulgaciones, el anticuerpo es uno en el que menos de aproximadamente un 50 %, un 40 %, un 30 %, un 20 %, un 10 % o un 5 % de los glucanos unidos a N en el mismo comprenden fucosa. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser de un 1 % a un 80 %, de un 1 % a un 65 %, de un 5 % a un 65 % o de un 20 % a un 40 %. En determinadas divulgaciones, el anticuerpo es uno en el que ninguno de los glucanos unidos a N comprende fucosa, es decir, en el que el anticuerpo está completamente sin fucosa, o no tiene fucosa o está afucosilado. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena glucídica en Asn297, en relación con la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y de alto contenido en manosa) como se mide mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe, por ejemplo, en

el documento WO 2008/077546. Asn297 se refiere al residuo de asparagina localizado en aproximadamente la posición 297 en la región Fc (numeración EU de los residuos de la región Fc); sin embargo, la Asn297 también se puede localizar aproximadamente ± 3 aminoácidos en dirección 5' o en dirección 3' de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a pequeñas variaciones de secuencia en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una función de ADCC mejorada. Véase, por ejemplo, las publicaciones de patente de EE. UU. n.ºs US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpo "desfucosilados" o "carentes de fucosa" incluyen: los documentos US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki *et al.*, *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al.*, *Biotech. Bioeng.* 87:614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares que pueden producir anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lec13 carentes de fucosilación de proteínas (Ripka *et al.* *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); la solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2003/0157108 A1; y el documento WO 2004/056312 A1, especialmente en el ejemplo 11) y líneas celulares con genes inactivados, tales como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO con genes inactivados (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki *et al.* *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); y el documento WO 2003/085107).

Se pueden proporcionar además variantes de anticuerpo con oligosacáridos bisegmentados, por ejemplo, en las que un oligosacárido biantenarío fijado a la región Fc del anticuerpo está bisegmentado por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una fucosilación reducida y/o función de ADCC mejorada. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpos, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878; la patente de EE. UU. n.º 6.602.684; el documento US 2005/0123546, y Ferrara *et al.*, *Biotechnology and Bioengineering*, 93 (5): 851-861 (2006). También se proporcionan variantes de anticuerpo con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido fijado a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una función de CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en los documentos WO 1997/30087; WO 1998/58964; y WO 1999/22764.

En determinadas divulgaciones, las variantes de anticuerpo que comprenden una región Fc descritas en el presente documento se pueden unir a un Fc γ RIII. En determinadas divulgaciones, las variantes de anticuerpo que comprenden una región Fc descritas en el presente documento tienen actividad de ADCC en presencia de células efectoras humanas o tienen una actividad de ADCC incrementada en presencia de células efectoras humanas en comparación con el anticuerpo por lo demás igual que comprende una región IgG1Fc natural humana.

(xi) Variantes de la región Fc

En determinadas divulgaciones, se pueden introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en el presente documento, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprenda una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácido.

En determinadas divulgaciones, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas, pero no todas, las funciones efectoras, que le convierten en un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* sea importante, aunque determinadas funciones efectoras (tales como el complemento y ADCC) sean innecesarias o perjudiciales. Se pueden llevar a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/disminución de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo ensayos de unión al receptor de Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carece de unión a Fc γ R (de ahí que sea probable que carezca de actividad de ADCC), pero retiene su capacidad de unión a Fc γ Rn. Las células principales para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, expresan Fc γ RIII solo, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362 (véase, por ejemplo, Hellstrom *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); y 5.821.337 (véase Bruggemann *et al.*, *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). De forma alternativa, se pueden emplear procedimientos de ensayos no radiactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACT1™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, se puede evaluar *in vivo* la actividad de ADCC de la molécula de interés, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.* *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo no se puede unir a C1q y, de ahí que carezca de actividad de CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (véanse, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg *et al.*, *Blood* 101:1045-1052 (2003); y Cragg *et al.*, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). También se pueden realizar determinaciones de la unión a Fc γ Rn y del aclaramiento/semivida *in vivo* usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, *et al.*, *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente de EE. UU. n.º 6.737.056). Dichos mutantes con respecto a Fc incluyen mutantes con respecto a Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácido 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el llamado mutante con respecto a Fc "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 con alanina (patente de EE. UU. n.º 7.332.581).

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

En determinadas divulgaciones, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones aminoacídicas que mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de residuos). En una divulgación ejemplar, el anticuerpo comprende las siguientes sustituciones aminoacídicas en su región Fc: S298A, E333A y K334A.

En algunas divulgaciones, se realizan alteraciones en la región Fc, que dan como resultado una unión a C1q y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alteradas (es decir, mejoradas o disminuidas), por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 6.194.551, el documento WO 99/51642 e Idusogie *et al.* *J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000).

En el documento US 2005/0014934A1 (Hinton *et al.*) se describen anticuerpos con semividas incrementadas y unión mejorada al receptor de Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc al FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más de los residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, sustitución del residuo 434 de la región Fc (patente de EE. UU. n.º 7.371.826). Véase también Duncan y Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); la patente de EE. UU. n.º 5.648.260; la patente de EE. UU. n.º 5.624.821; y el documento WO 94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

(xii) Derivados de anticuerpo

Los anticuerpos de la invención se pueden modificar además para que contengan restos no proteínicos adicionales que son conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles. En determinadas divulgaciones, los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o bien copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros fijados al anticuerpo puede variar, y si se fija más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, se pueden determinar el número y/o el tipo de polímeros usados para la derivatización en base a consideraciones que incluyen, pero sin limitarse a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se va a mejorar, si el derivado del anticuerpo se usará en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

(xiii) Vectores, células huésped y procedimientos recombinantes

También se pueden producir anticuerpos usando procedimientos recombinantes. Para la producción recombinante de un anticuerpo antiantígeno, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo se aísla y se inserta en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que se puedan unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes del vector en general incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

(a) Componente de secuencia señal

Un anticuerpo de la invención se puede producir de forma recombinante no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterógeno, que es preferentemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o polipéptido maduro. La secuencia señal heterógena seleccionada preferentemente es una que la reconoce y procesa (es decir, se escinde por una peptidasa señal) la célula huésped. Para las células huésped procariotas que no reconocen y procesan una secuencia señal de anticuerpo natural, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariótica seleccionada, por ejemplo, del grupo de las secuencias líder de fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o enterotoxina II termoestable. Para la secreción en levadura, la

secuencia señal natural se puede sustituir, por ejemplo, por la secuencia líder de invertasa de levadura, secuencia líder de factor α (incluyendo las secuencias líder de factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*) o la secuencia líder de la fosfatasa ácida, la secuencia líder de la glucoamilasa de *C. albicans* o la secuencia señal descrita en el documento WO 90/13646. En la expresión de células de mamífero, están disponibles secuencias señal de mamífero, así como

(b) Origen de replicación

Tanto los vectores de expresión como los de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que posibilita que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. En general, en los vectores de clonación, esta secuencia es una que posibilita que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico del huésped, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Dichas secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias gramnegativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para levaduras y diversos orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero. En general, el componente de origen de replicación no es necesario para los vectores de expresión de mamífero (el origen de SV40 se puede usar típicamente solo porque contiene el promotor temprano).

(c) Componente de gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Típicamente, los genes de selección codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa de bacilos.

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

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son los que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico que codifica el anticuerpo, tales como DHFR, glutamina sintetasa (GS), timidina cinasa, metalotioneína-I y -II, preferentemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, se identifican células transformadas con el gen DHFR cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. En estas condiciones, el gen DHFR se amplifica junto con cualquier otro ácido nucleico cotransformado. Se puede usar una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) carente de actividad de DHFR endógena (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

De forma alternativa, se identifican células transformadas con el gen GS cultivando los transformantes en un medio de cultivo que contiene L-metionina sulfoximina (Msx), un inhibidor de GS. En estas condiciones, el gen GS se amplifica junto con cualquier otro ácido nucleico cotransformado. El sistema de selección/amplificación de GS se puede usar en combinación con el sistema de selección/amplificación de DHFR descrito anteriormente.

De forma alternativa, las células huésped (en particular huéspedes naturales que contienen DHFR endógena) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de interés, un gen DHFR natural y otro marcador seleccionable tal como la aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) se pueden seleccionar mediante crecimiento celular en un medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418. Véase la patente de EE. UU. n.º 4.965.199.

Un gen de selección adecuado para su uso en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb *et al.*, *Nature* 282:39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC n.º 44076 o PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85:12 (1977). La presencia de la lesión de *trp1* en el genoma de la célula huésped de levadura proporciona a continuación un entorno eficaz para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano. De forma similar, las cepas de levadura carentes de *Leu2* (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan mediante plásmidos conocidos que portan el gen *Leu2*.

Además, se pueden usar vectores derivados del plásmido circular de 1,6 m pKD1 para la transformación de levaduras *Kluyveromyces*. De forma alternativa, se ha informado de un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina de ternero recombinante para *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990). También se han divulgado vectores de expresión estables de múltiples copias para la secreción de seroalbúmina humana recombinante madura por cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer *et al.*, *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991).

(d) Componente de promotor

Los vectores de expresión y clonación contienen, en general, un promotor que lo reconoce el organismo huésped y está enlazado de forma funcional al ácido nucleico que codifica un anticuerpo. Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procariotas incluyen el promotor de *phoA*, los sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa, el promotor de fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) enlazada de forma funcional al ADN que codifica un anticuerpo.

Son conocidas secuencias de promotor para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucarióticos tienen una región rica en AT localizada aproximadamente de 25 a 30 bases en dirección 5' del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada de 70 a 80 bases en dirección 5' del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT, donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucarióticos hay una secuencia AATAAA que puede ser la secuencia señal para la adición de la cola poli A en el extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan de forma adecuada en vectores de expresión eucarióticos.

Los ejemplos de secuencias de promotor adecuadas para su uso con huéspedes de levadura incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosafofosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de una transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones de promotor de la alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión en levaduras se describen además en el documento EP 73.657. También se usan de forma ventajosa potenciadores de levadura con promotores de levadura.

La transcripción del anticuerpo a partir de vectores en células huésped de mamífero se puede controlar, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el virus del poliovirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B, virus de simio 40 (SV40) o de promotores de mamífero heterógenos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación vírico de SV40. El promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E. En la patente de EE. UU. n.º 4.419.446 se divulga un sistema para expresar ADN en huéspedes de mamífero usando el virus del papiloma bovino como un vector. Una modificación de este sistema se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.601.978. Véase también Reyes *et al.*, *Nature* 297:598-601 (1982) sobre la expresión del ADNc de β -interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple. De forma alternativa, se puede usar la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous como promotor.

(e) Componente de elemento potenciador

La transcripción de ADN que codifica un anticuerpo de la presente invención por eucariotas superiores se incrementa a menudo insertando una secuencia potenciadora en el vector. Muchas secuencias potenciadoras son conocidas ahora a partir de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Típicamente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el promotor/potenciador temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliovirus en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucarióticos. El potenciador se puede empalmar en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia codificante del anticuerpo, pero se localiza preferentemente en un sitio 5' del promotor.

(f) Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión usados en células huésped eucariotas (levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos o células nucleadas de otros organismos multicelulares) contendrán también las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están comúnmente disponibles de regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente, 3' de ADN o ADNc eucarióticos o víricos. Estas regiones contienen segmentos nucleotídicos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO 94/11026 y el vector de expresión divulgado en el mismo.

(g) Selección y transformación de células huésped

Las células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en el presente documento son las células procariotas, de levaduras o eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas adecuados para este propósito incluyen eubacterias, tales como organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P divulgado en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Un huésped de clonación de *E. coli* preferente es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) son adecuadas. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes.

Se pueden producir anticuerpos de longitud completa, proteínas de fusión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos en bacterias, en particular cuando no se necesitan la glucosilación y la función efectora de Fc, tal como cuando el anticuerpo terapéutico está conjugado a un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) que por sí mismo muestra eficacia en la destrucción de células tumorales. Los anticuerpos de longitud completa tienen una semivida mayor en circulación. La producción en *E. coli* es más rápida y más rentable. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias, véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.648.237 (Carter *et al.*), la patente de EE. UU. n.º 5.789.199 (Joly *et al.*), la patente de EE. UU. n.º 5.840.523 (Simmons *et al.*), que describe la región de iniciación de la traducción (TIR) y las secuencias señal para optimizar la expresión y la secreción. Véase también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pág. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*. Después de la expresión, el anticuerpo se puede aislar de la pasta de células de *E. coli* en una fracción soluble y se puede purificar a través, por ejemplo, de una columna de proteína A o G dependiendo del isotipo. La purificación final se puede llevar a cabo de forma similar al procedimiento para purificar el anticuerpo expresado, por ejemplo, en células de CHO.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es la más usada entre los microorganismos huéspedes eucariotas inferiores. Sin embargo, otros varios géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, huéspedes de *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*. Para una revisión que analiza el uso de levaduras y hongos filamentosos para la producción de proteínas terapéuticas, véase, por ejemplo, Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004).

Se pueden seleccionar determinadas cepas de hongos y levaduras en las que las vías de glucosilación se han "humanizado", lo que da como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o totalmente humano. Véase, por ejemplo, Li *et al.*, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006) (que describe la humanización de la vía de glucosilación en *Pichia pastoris*); y Gerngross *et al.*, *supra*.

Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo glucosilado también derivan de organismos pluricelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovíricas y las correspondientes células huésped permisivas de insectos de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Están públicamente disponibles una variedad de cepas víricas para transfección, por ejemplo, la variante L-1 de NPV de *Autographa californica* y la cepa Bm-5 de NPV de *Bombyx mori*, y dichos virus se pueden usar como el virus en el presente documento de acuerdo con la divulgación, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate, lenteja de agua (*Leninaceae*), alfalfa (*M. truncatula*) y tabaco también se pueden utilizar como huéspedes. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

Se pueden usar células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para su cultivo en cultivo de suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); linfocitos TRI (Mather *et al.*, *Annals*

N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR (Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); y líneas de células de mieloma, tales como NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pág. 255-268.

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o de clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios nutritivos convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

(h) Cultivo de las células huésped

Las células huésped usadas para producir un anticuerpo de la presente invención se pueden cultivar en una variedad de medios. Los medios comercialmente disponibles tales como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma) son adecuados para cultivar las células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), las patentes de EE. UU. n.ºs 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; el documento WO 90/03430; el documento WO 87/00195; o la patente de EE. UU. re. 30.985 se pueden usar como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede complementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos presentes normalmente en concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro complemento necesario también se puede incluir en concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las usadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la técnica.

(xiv) Purificación de anticuerpo

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o se puede secretar directamente al medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, se retiran los restos de partículas, células huésped o bien fragmentos lisados, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, se descongela la pasta de células en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los restos celulares se pueden retirar mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se concentran en primer lugar, en general, usando un filtro de concentración de proteína disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de la proteasa, tal como PMSF, en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes casuales.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células se puede purificar usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de interacción hidrófoba, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad una de las etapas de purificación típicamente preferentes. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y del isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. Se puede usar proteína A para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss *et al.*, *EMBOJ.* 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es lo más a menudo agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estireno-divinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_{H3} , la resina Bakerbond ABX™ (J.T. Baker, Phillipsburg, N.J.) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, la precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina-SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna con poli(ácido aspártico)), cromatografía de exclusión, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar.

En general, diversas metodologías para preparar anticuerpos para su uso en investigación, pruebas y en clínica están bien establecidas en la técnica, consecuentes con las metodologías descritas anteriormente y/o según lo considere apropiado un experto en la técnica para un anticuerpo particular de interés.

(xv) Selección de anticuerpos biológicamente activos

Los anticuerpos producidos como se describe anteriormente se pueden someter a uno o más ensayos de "actividad

biológica" para seleccionar un anticuerpo con propiedades beneficiosas desde una perspectiva terapéutica o seleccionar formulaciones y condiciones que retengan la actividad biológica del anticuerpo. El anticuerpo se puede someter a prueba para determinar su capacidad de unirse al antígeno contra el que se generó. Por ejemplo, se pueden usar procedimientos conocidos en la técnica (tales como ELISA, inmunoelectrotransferencia, etc.).

Por ejemplo, para un anticuerpo anti-PD-L1, las propiedades de unión al antígeno del anticuerpo se pueden evaluar en un ensayo que detecte la capacidad de unirse a PD-L1. En algunas divulgaciones, la unión del anticuerpo se puede determinar mediante unión por saturación; ELISA; y/o ensayos de competencia (por ejemplo, RIA), por ejemplo. Además, el anticuerpo se puede someter a otros ensayos de actividad biológica, por ejemplo, para evaluar su eficacia como agente terapéutico. Dichos ensayos son conocidos en la técnica y dependen del antígeno diana y del uso previsto del anticuerpo. Por ejemplo, los efectos biológicos del bloqueo de PD-L1 por el anticuerpo se pueden evaluar en linfocitos T CD8+, un modelo de ratón de virus de la coriomeningitis linfocítica (VCML) y/o un modelo de tumor singénico, por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. 8.217.149.

Para cribar anticuerpos que se unan a un epítipo particular en el antígeno de interés (por ejemplo, aquellos que bloquean la unión del anticuerpo anti-PD-L1 del ejemplo a PD-L1), se pueden realizar un ensayo de bloqueo cruzado de rutina como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). De forma alternativa, se puede realizar cartografiado de epítopos, por ejemplo, como se describe en Champe *et al.*, *J. Biol. Chem* 270:1388-1394 (1995), para determinar si el anticuerpo se une a un epítipo de interés.

IV. Composiciones farmacéuticas y formulaciones

También se proporcionan en el presente documento composiciones farmacéuticas y formulaciones que comprenden un antagonista de la unión al eje de PD-1 y/o un anticuerpo descrito en el presente documento (tal como un anticuerpo anti-PD-L1) y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas y formulaciones que comprenden taxanos, por ejemplo, nab-paclitaxel (ABRAXANE®), paclitaxel o docetaxel.

Las composiciones farmacéuticas y formulaciones como se describen en el presente documento se pueden preparar mezclando los ingredientes activos (por ejemplo, un antagonista de la unión al eje de PD-1 y/o un taxano) que tengan el grado deseado de pureza con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables, en general, no son tóxicos para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen, pero no se limitan a: tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos, tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros glúcidos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos de metal (por ejemplo, complejos Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos, tales como polietilenglicol (PEG). Los vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares del presente documento incluyen, además, agentes de dispersión intersticial del fármaco tales como glucoproteínas de hialuronidasa neutra-activa soluble (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa PH-20 soluble humana, tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Se describen determinadas sHASEGP ejemplares y procedimientos de uso, incluyendo rHuPH20, en las publicaciones de patente de EE. UU. n.ºs 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, se combina una sHASEGP con una o más glucosaminoglucanasas adicionales, tales como condroitinasas.

Se describen formulaciones de anticuerpos liofilizadas ejemplares en la patente de EE. UU. n.º 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpos acuosas incluyen las descritas en la patente de EE. UU. n.º 6.171.586 y el documento WO 2006/044908, incluyendo estas últimas formulaciones un tampón histidina-acetato.

Las composiciones y formulaciones en el presente documento también pueden contener más de un ingrediente activo, según sea necesario, para la indicación particular que se trate, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se vean afectadas de forma adversa entre sí. Dichos ingredientes activos están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16.^a edición, Osol, A. (ed.) (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación prolongada. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación mantenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que

están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Las formulaciones que se van a usar para su administración *in vivo* son, en general, estériles. Se puede conseguir fácilmente la esterilidad, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles.

5 IV. Procedimientos de tratamiento

En el presente documento se proporcionan procedimientos para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo que comprenden administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano (por ejemplo, nab-paclitaxel (ABRAXANE®) o paclitaxel). En algunas divulgaciones, el tratamiento da como resultado una
10 respuesta en el individuo después del tratamiento. En algunas divulgaciones, la respuesta es una respuesta completa. En algunas divulgaciones, el tratamiento da como resultado una respuesta sostenida en el individuo después de la interrupción del tratamiento. Los procedimientos descritos en el presente documento pueden encontrar uso en el tratamiento de afecciones en las que se desea una inmunogenicidad potenciada, tal como una inmunogenicidad tumoral creciente para el tratamiento del cáncer. En el presente documento también se proporcionan procedimientos de
15 potenciación de la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer que comprenden administrar una cantidad eficaz de un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano (por ejemplo, nab-paclitaxel (ABRAXANE®) o paclitaxel). Cualquiera de los antagonistas de la unión al eje de PD-1 y los taxanos conocidos en la técnica o descritos en el presente documento se pueden usar en los procedimientos. En algunas divulgaciones, los procedimientos comprenden además administrar un agente quimioterápico con derivado de platino. En algunas divulgaciones, el agente quimioterápico con
20 derivado de platino es carboplatino.

En algunas divulgaciones, el individuo es un ser humano. En algunas divulgaciones, el individuo padece cáncer. En algunas divulgaciones, el cáncer es cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo), cáncer de vejiga (por ejemplo, CVU, CVMI y CVNMI), cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma de pulmón
25 no microcítico que puede ser escamoso o no escamoso), glioblastoma, linfoma no hodgkiniano (LNH), cáncer de células renales (por ejemplo, CCR), cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer pancreático, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma de Kaposi, carcinoma carcinoide, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer esofágico, cáncer de próstata, cáncer endometrial, cáncer de riñón, cáncer ovárico, mesotelioma y neoplasias malignas hemáticas (por ejemplo, SMD y mieloma múltiple). En algunas divulgaciones, el cáncer se selecciona de: cáncer de pulmón microcítico,
30 glioblastoma, neuroblastomas, melanoma, carcinoma de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal (CCR) o carcinoma hepatocelular. En divulgaciones particulares, el cáncer se selecciona de cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma de pulmón no microcítico que puede ser escamoso o no escamoso, cáncer de vejiga (por ejemplo, CVU), cáncer de mama (por ejemplo, CMTN), CCR, melanoma, colorrectal cáncer y una neoplasia maligna hemática (por ejemplo, SMD y mieloma múltiple). En algunas divulgaciones, el cáncer de pulmón es un carcinoma de pulmón no microcítico que puede ser
35 escamoso o no escamoso. En algunas divulgaciones, el cáncer de vejiga es CVU. En algunas divulgaciones, el cáncer de seno es CMTN. En algunas divulgaciones, la neoplasia maligna hemática es un SMD o mieloma múltiple.

En algunas divulgaciones, el individuo se ha tratado con un tratamiento contra el cáncer antes del tratamiento combinado con un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano. En algunas divulgaciones, el individuo tiene cáncer que es
40 resistente a uno o más tratamientos contra el cáncer. En algunas divulgaciones, la resistencia al tratamiento contra el cáncer incluye recidiva del cáncer o cáncer insensible al tratamiento. La recidiva se puede referir a la reaparición del cáncer, en el sitio original o en un sitio nuevo, después del tratamiento. En algunas divulgaciones, la resistencia a un tratamiento contra el cáncer incluye la progresión del cáncer durante el tratamiento con el tratamiento antineoplásico. En algunas divulgaciones, la resistencia a un tratamiento contra el cáncer incluye cáncer que no responde al tratamiento. El
45 cáncer puede ser resistente al comienzo del tratamiento o se puede volver resistente durante el tratamiento. En algunas divulgaciones, el cáncer está en una fase precoz o en una fase tardía.

En algunas divulgaciones, la politerapia comprende la administración de un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano. El antagonista de la unión al eje de PD-1 y el taxano (por ejemplo, nab-paclitaxel (ABRAXANE®) o paclitaxel) se
50 pueden administrar de cualquier manera adecuada conocida en la técnica. Por ejemplo, el antagonista de la unión al eje de PD-1 y el taxano se pueden administrar secuencialmente (en diferentes momentos) o simultáneamente (al mismo tiempo). En algunas divulgaciones, el antagonista de la unión al eje de PD-1 está en una composición separada del taxano. En algunas divulgaciones, el antagonista de la unión al eje de PD-1 está en la misma composición que el taxano.

El antagonista de la unión al eje de PD-1 y el taxano se pueden administrar por la misma vía de administración o por
55 diferentes vías de administración. En algunas divulgaciones, el antagonista de la unión al eje de PD-1 se administra por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, tópica, oral, transdérmica, intraperitoneal, intraorbital, por implantación, por inhalación, por vía intratecal, intraventricular o intranasal. En algunas divulgaciones, el taxano se administra por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, tópica, oral, transdérmica, intraperitoneal, intraorbital, por implantación, por
60 inhalación, por vía intratecal, intraventricular o intranasal. Se puede administrar una cantidad eficaz del antagonista de la unión al eje de PD-1 y el taxano para la prevención o el tratamiento de una enfermedad. La dosificación apropiada del antagonista de la unión al eje de PD-1 y/o el taxano se puede determinar en base al tipo de enfermedad que se va a tratar, el tipo de antagonista de la unión del eje de PD-1 y el taxano, la gravedad y la evolución de la enfermedad, el estado clínico del individuo, la anamnesis del individuo y la respuesta al tratamiento, y el criterio del médico especialista.

65 Como una proposición general, la cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-

L1) administrada a un ser humano estará en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal del paciente, ya sea mediante una o más administraciones. En algunas divulgaciones, el anticuerpo usado es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 45 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 40 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 35 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 25 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 15 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mg/kg o de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1 mg/kg administrado diariamente, por ejemplo. En algunas divulgaciones, el anticuerpo se administra a 15 mg/kg. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. En una divulgación, un anticuerpo anti-PD-L1 descrito en el presente documento se administra a un ser humano a una dosis de aproximadamente 100 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 600 mg, aproximadamente 700 mg, aproximadamente 800 mg, aproximadamente 900 mg, aproximadamente 1000 mg, aproximadamente 1100 mg, aproximadamente 1200 mg, aproximadamente 1300 mg, aproximadamente 1400 mg o aproximadamente 1500 mg el día 1 de ciclos de 21 días. En algunas divulgaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 MPDL3280A se administra a 1200 mg i.v. cada tres semanas (C3S). La dosis se puede administrar como una dosis única o como dosis múltiples (por ejemplo, 2 o 3 dosis), tal como infusiones. La dosis del anticuerpo administrado en un tratamiento combinado se puede reducir en comparación con un tratamiento único. La evolución de este tratamiento se supervisa fácilmente por técnicas convencionales.

Como proposición general, la cantidad terapéuticamente eficaz de un taxano (por ejemplo, nab-paclitaxel (ABRAXANE®) o paclitaxel) administrada a un ser humano estará en el intervalo de aproximadamente 25 a aproximadamente 300 mg/m² (por ejemplo, aproximadamente 25 mg/m², aproximadamente 50 mg/m², aproximadamente 75 mg/m², aproximadamente 100 mg/m², aproximadamente 125 mg/m², aproximadamente 150 mg/m², aproximadamente 175 mg/m², aproximadamente 200 mg/m², aproximadamente 225 mg/m², aproximadamente 250 mg/m², aproximadamente 275 mg/m², o aproximadamente 300 mg/m²) ya sea mediante una o más administraciones. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, se administran aproximadamente 100 mg/m² de nab-paclitaxel (ABRAXANE®). En algunas divulgaciones, nab-paclitaxel (ABRAXANE®) se administra a 100 mg/m² i.v. cada semana (C1S). En algunas divulgaciones, se administran aproximadamente 200 mg/m² de paclitaxel. En algunas divulgaciones, se administra paclitaxel a 200 mg/m² i.v. cada 3 semanas. En algunas divulgaciones, el taxano (por ejemplo, nab-paclitaxel (ABRAXANE®) o paclitaxel) se puede administrar semanalmente, cada 2 semanas, cada 3 semanas, cada 4 semanas, en los días 1,8 y 15 de cada ciclo de 21 días, o en los días 1,8 y 15 de cada ciclo de 28 días.

En algunas divulgaciones, los procedimientos pueden comprender además un tratamiento adicional. El tratamiento adicional puede ser radioterapia, cirugía (por ejemplo, tumorectomía y una mastectomía), quimioterapia, genoterapia, tratamiento de ADN, tratamiento antiviral, tratamiento de ARN, inmunoterapia, trasplante de médula ósea, nanoterapia, tratamiento con anticuerpos monoclonales o una combinación de lo anterior. El tratamiento adicional puede ser en forma de tratamiento prequirúrgico o posquirúrgico. En algunas divulgaciones, el tratamiento adicional es la administración de inhibidor enzimático de molécula pequeña o agente antimetastático. En algunas divulgaciones, el tratamiento adicional es la administración de agentes limitantes de efectos secundarios (por ejemplo, agentes destinados a disminuir la aparición y/o la gravedad de los efectos secundarios del tratamiento, tales como agentes antieméticos, etc.). En algunas divulgaciones, el tratamiento adicional es radioterapia. En algunas divulgaciones, el tratamiento adicional es cirugía. En algunas divulgaciones, el tratamiento adicional es una combinación de radioterapia y cirugía. En algunas divulgaciones, el tratamiento adicional es irradiación gamma. En algunas divulgaciones, el tratamiento adicional es un tratamiento dirigido a la vía de PI3K/AKT/mTOR, inhibidor de HSP90, inhibidor de tubulina, inhibidor de apoptosis y/o agente quimioprofiláctico. El tratamiento adicional puede ser uno o más de los agentes quimioterápicos descritos en el presente documento.

En algunas divulgaciones, los procedimientos comprenden además administrar un agente quimioterápico con derivado de platino con el antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano. En algunas divulgaciones, el agente quimioterápico con derivado de platino es carboplatino. Las dosificaciones y la administración de carboplatino son bien conocidas en la técnica. Se administra una dosificación ejemplar de carboplatino con un área bajo la curva (ABC) objetivo de 6 mg/ml. En algunas divulgaciones, el carboplatino se administra por vía intravenosa cada 3 semanas.

En algunas divulgaciones, los procedimientos incluyen la administración del anticuerpo anti-PD-L1 MPDL3280A a 1200 mg i.v. administrados cada tres semanas (C3S), nab-paclitaxel (ABRAXANE®) a 100 mg/m² i.v. cada semana (C1S) y carboplatino i.v. cada 3 semanas (C3S) con una ABC objetivo de 6 mg/ml. En algunas divulgaciones, los procedimientos incluyen la administración del anticuerpo anti-PD-L1 MPDL3280A a 1200 mg i.v. administrados cada tres semanas (C3S), paclitaxel a 200 mg/m² i.v. cada 3 semanas (C3S) y carboplatino i.v. cada 3 semanas (C3S) con un ABC objetivo de 6 mg/ml.

V. Otras politerapias

También se proporcionan en el presente documento procedimientos para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo que comprenden administrar al individuo un antagonista de la unión al eje de PD-1 humano y un taxano junto con otro agente antineoplásico o tratamiento contra el cáncer. En algunas divulgaciones, los procedimientos comprenden administrar al individuo un antagonista de la unión al eje de PD-1 humano, un taxano y un agente quimioterápico con

derivado de platino junto con otro agente antineoplásico o tratamiento contra el cáncer.

En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con una quimioterapia o agente quimioterápico. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con una radioterapia o un agente radioterápico. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un tratamiento dirigido o un agente terapéutico dirigido. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con una inmunoterapia o agente inmunoterápico, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal.

Sin el deseo de limitación a teoría alguna, se cree que potenciar la estimulación de los linfocitos T, promoviendo una molécula coestimuladora activadora o inhibiendo una molécula coestimuladora negativa, puede promover la muerte de las células tumorales, tratando o retrasando de este modo la progresión del cáncer. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un agonista dirigido contra una molécula coestimuladora activadora. En algunas divulgaciones, una molécula coestimuladora activadora puede incluir CD40, CD226, CD28, OX40, GITR, CD137, CD27, HVEM o CD127. En algunas divulgaciones, el agonista dirigido contra una molécula coestimuladora activadora es un anticuerpo agonista que se une a CD40, CD226, CD28, OX40, GITR, CD137, CD27, HVEM o CD127. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un antagonista dirigido contra una molécula coestimuladora inhibidora. En algunas divulgaciones, una molécula coestimuladora inhibidora puede incluir CTLA-4 (también conocida como CD152), PD-1, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3, B7-H3, B7-H4, IDO, TIGIT, MICA/B o arginasa. En algunas divulgaciones, el antagonista dirigido contra una molécula coestimuladora inhibidora es un anticuerpo antagonista que se une a CTLA-4, PD-1, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3, B7-H3, B7-H4, IDO, TIGIT, MICA/B o arginasa.

En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un antagonista dirigido contra CTLA-4 (también conocido como CD152), por ejemplo, un anticuerpo bloqueante. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con ipilimumab (también conocido como MDX-010, MDX-101 o YERVOY®). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con tremelimumab (también conocido como ticilimumab o CP-675.206). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un antagonista dirigido contra B7-H3 (también conocido como CD276), por ejemplo, un anticuerpo bloqueante. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con MGA271. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un antagonista dirigido contra un TGF beta, por ejemplo, metelimumab (también conocido como CAT-192), fresolimumab (también conocido como GC1008) o LY2157299.

En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un tratamiento que comprende la transferencia adoptiva de un linfocito T (por ejemplo, un linfocito T citotóxico o CTL) que expresa un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un tratamiento que comprende la transferencia adoptiva de un linfocito T que comprende un receptor de TGF beta dominante negativo, por ejemplo, un receptor de tipo II de TGF beta dominante negativo. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un tratamiento que comprende un protocolo HERCREEM (véase, por ejemplo, ClinicalTrials.gov, identificador NCT00889954).

En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un agonista dirigido contra CD137 (también conocido como TNFRSF9, 4-1BB o ILA), por ejemplo, un anticuerpo activador. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con urelumab (también conocido como BMS-663513). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un agonista dirigido contra CD40, por ejemplo, un anticuerpo activador. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un agonista dirigido contra OX40 (también conocido como CD134), por ejemplo, un anticuerpo activador. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un anticuerpo anti-OX40 (por ejemplo, AgonOX). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un agonista dirigido contra CD27, por ejemplo, un anticuerpo activador. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con CDX-1127. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un antagonista dirigido contra indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO). En algunas divulgaciones, el antagonista de IDO es 1-metil-D-triptófano (también conocido como 1-D-MT).

En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un conjugado de anticuerpo-fármaco. En algunas divulgaciones, el conjugado de anticuerpo-fármaco comprende mertansina o monometil auristatina E (MMAE). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un conjugado de anticuerpo anti-NaPi2b-MMAE (también conocido como DNIB0600A o RG7599). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con trastuzumab emtansina (también conocido como T-DM1, ado-trastuzumab emtansina o KADCYLA®, Genentech). En

algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con DMUC5754A. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un conjugado de anticuerpo-fármaco dirigido al receptor de endotelina B (EDNBR), por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra EDNBR conjugado con MMAE.

5

En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un inhibidor de la angiogénesis. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un anticuerpo dirigido contra un VEGF, por ejemplo, VEGF-A. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con bevacizumab (también conocido como AVASTIN®, Genentech). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un anticuerpo dirigido contra la angiopoyetina 2 (también conocida como Ang2). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con MEDI3617.

10

En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un agente antineoplásico. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un agente dirigido a CSF-1R (también conocido como M-CSFR o CD115). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con anti-CSF-1 R (también conocido como IMC-CS4). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un interferón, por ejemplo, interferón alfa o interferón gamma. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con Roferón-A (también conocido como interferón alfa-2a recombinante). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con GM-CSF (también conocido como factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos humano recombinante, rhu GM-CSF, sargramostim o LEUKINE®). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con IL-2 (también conocido como aldesleucina o PROLEUKIN®). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con IL-12. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un anticuerpo dirigido a CD20. En algunas divulgaciones, el anticuerpo dirigido a CD20 es obinutuzumab (también conocido como GA101 o GAZYVA®) o rituximab. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un anticuerpo dirigido a GTR. En algunas divulgaciones, el anticuerpo dirigido a GTR es TRX518.

25

En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con una vacuna contra el cáncer. En algunas divulgaciones, la vacuna contra el cáncer es una vacuna contra el cáncer de péptidos, que en algunas divulgaciones es una vacuna de péptidos personalizada. En algunas divulgaciones, la vacuna contra el cáncer de péptidos es un péptido largo multivalente, un péptido múltiple, un cóctel de péptidos, un péptido híbrido o una vacuna de células dendríticas pulsadas por péptidos (véase, por ejemplo, Yamada *et al.*, Cancer Sci, 104:14 -21, 2013). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un adyuvante. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un tratamiento que comprende un agonista de TLR, por ejemplo, Poli-ICLC (también conocido como HILTONOL®), LPS, MPL o CpG ODN. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con factor de necrosis tumoral (TNF) alfa. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con IL-1. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con HMGB1. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un antagonista de IL-10. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un antagonista de IL-4. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un antagonista de IL-13. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un antagonista de HVEM. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un agonista de ICOS, por ejemplo, mediante la administración de ICOS-L, o un anticuerpo agonista dirigido contra ICOS. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un tratamiento dirigido a CX3CL1. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un tratamiento dirigido a CXCL9. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un tratamiento dirigido a CXCL10. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un tratamiento dirigido a CCL5. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un agonista de LFA-1 o ICAM1. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un agonista de selectina.

40

En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un tratamiento dirigido. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un inhibidor de B-Raf. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con vemurafenib (también conocido como ZELBORAF®). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con dabrafenib (también conocido como TAFINLAR®). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con erlotinib (también conocido como TARCEVA®). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un inhibidor de MEK, como MEK1 (también conocido como MAP2K1) o MEK2 (también conocido como MAP2K2). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de

60

65

PD-1 y un taxano junto con cobimetinib (también conocido como GDC-0973 o XL-518). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con trametinib (también conocido como MEKINIST®). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un inhibidor de K-Ras. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un inhibidor de c-Met. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con onartuzumab (también conocido como MetMab). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un inhibidor de ALK. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con AF802 (también conocido como CH5424802 o alectinib). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un inhibidor de una fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con BKM120. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con idelalisib (también conocido como GS-1101 o CAL-101). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con perifosina (también conocido como KRX-0401). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un Akt. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con MK2206. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con GSK690693. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con GDC-0941. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un inhibidor de mTOR. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con sirónimus (también conocido como rapamicina). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con temsironimus (también conocido como CCI-779 o TORISEL®). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con everónimus (también conocido como RAD001). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con ridaforónimus (también conocido como AP-23573, MK-8669 o deforónimus). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con OSI-027. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con AZD8055. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con INK128. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con un inhibidor dual de PI3K/mTOR. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con XL765. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con GDC-0980. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con BEZ235 (también conocido como NVP-BEZ235). En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con BGT226. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con GSK2126458. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con PF-04691502. En algunas divulgaciones, se puede administrar un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un taxano junto con PF-05212384 (también conocido como PKI-587).

40 VI. Artículos de fabricación o kits

En otra divulgación de la divulgación, se proporciona un artículo de fabricación o un kit que comprende un antagonista de la unión al eje de PD-1 y/o un taxano. En algunas divulgaciones, el artículo de fabricación o kit comprende además un prospecto del envase que comprende instrucciones para usar el antagonista de la unión al eje de PD-1 junto con un taxano para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo o para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer. Cualquiera del antagonista de la unión al eje de PD-1 y/o taxanos descritos en el presente documento se puede incluir en el artículo de fabricación o los kits.

En algunas divulgaciones, el antagonista de la unión al eje de PD-1 y el taxano están en el mismo recipiente o en recipientes separados. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, bolsas y jeringas. El recipiente se puede formar a partir una variedad de materiales tales como vidrio, plástico (como cloruro de polivinilo o poliolefina) o aleación de metal (tal como acero inoxidable o hastelloy). En algunas divulgaciones, el recipiente contiene la formulación y la etiqueta en, o asociada con, el recipiente puede indicar instrucciones de uso. El artículo de fabricación o kit puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas y prospectos del envase con instrucciones para su uso. En algunas divulgaciones, el artículo de fabricación incluye además uno o más de otro agente (por ejemplo, un agente quimioterápico y un agente antineoplásico). Los recipientes adecuados para los uno o más agentes incluyen, por ejemplo, frascos, viales, bolsas y jeringas.

60 EJEMPLOS

La invención se entenderá mejor con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos no se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención. Se entiende que los ejemplos y divulgaciones descritos en el presente documento son solo para propósitos ilustrativos y que diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos se sugerirán a los expertos en la técnica y se incluirán dentro del espíritu y el ámbito de esta solicitud y el alcance de reclamaciones adjuntas.

Ejemplo 1: El tratamiento combinado con anticuerpo anti-PD-L1 y nab-paclitaxel (ABRAXANE®) + carboplatino logró respuestas completas duraderas en un modelo de tumor colorrectal MC38

Materiales y procedimientos

Modelos de tumores in vivo

Las líneas celulares de tumor colorrectal MC38 se mantuvieron en Genentech. Se inocularon por vía subcutánea ratones hembra C57BL/6 de 7-10 semanas (Charles River Laboratories; Hollister, CA) en el flanco unilateral derecho con 0,1 millones de células MC38. Cuando los tumores alcanzaron un volumen tumoral medio de aproximadamente 100-300 mm³, los ratones fueron reclutados y aleatorizados en grupos de tratamiento y el tratamiento con anticuerpos y/o quimioterapia comenzó al día siguiente 1.

Se usó un enfoque de modelado mixto para analizar la medición repetida de volúmenes tumorales de los mismos animales a lo largo del tiempo (Pinheiro et al. *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models*. R. versión del paquete 3.1-108 (2013)). Este enfoque aborda tanto las mediciones repetidas como los abandonos modestos antes del final del estudio. Se utilizaron splines de regresión cúbicos para ajustar un perfil no lineal a las evoluciones en el tiempo de log2 (volumen tumoral) en los diferentes tratamientos. El ajuste se realizó por medio de un modelo lineal de efectos mixtos dentro de R, versión 2.15.2, usando el paquete nlme, versión 3.1 108 (R Foundation for Statistical Computing; Viena, Austria).

Para el experimento de reexposición con MC38 que se muestra en las figuras 5A-5B, se inocularon ratones curados, tratados previamente con la combinación anti-PD-L1 + ABRAXANE® + carboplatino, por vía subcutánea con 0,1 millones de células MC38 en el flanco opuesto al de la exposición del tumor primario. Paralelamente, se inocularon ratones C57BL/6 hembra sin exposición previa con 0,1 millones de células MC38. Siete días después, todos los ratones se sacrificaron y se recogieron los bazo para análisis por citometría de flujo. Todos los estudios en animales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices y reglamentos establecidos en la Ley de Bienestar Animal y la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y las directrices del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC).

Estimulación in vitro de cultivos de esplenocitos de ratones con reexposición

Se cultivaron esplenocitos a 1 millón de células/pocillo por triplicado en una placa de fondo en U de 96 pocillos con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) a 10 ng/ml e ionomicina a 1 µg/ml (Sigma-Alrich; St. Louis, MO) más GOLGIPLUG™ (brefeldina A) (BD Biosciences; San Jose, CA) durante 4 horas a 37 °C. Se recogieron las células y se tiñeron con marcadores de superficie CD4 FITC (isotiocianato de fluoresceína), CD3 PE (ficoeritrina) y CD8 PerCp-Cy5.5 (BD Biosciences), y se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 30 minutos en hielo. Se permeabilizaron las células con tampón de permeabilización 1x (BD Biosciences) y se tiñeron con anticuerpos de rata antiinterferón-γ de ratón (IFN-γ) conjugados con alofococianina (APC) o anticuerpos de rata de control de isotipo IgG1-APC (BD Biosciences) y se analizaron en un BD Biosciences LSRII usando el programa informático FACSDIVA™. El análisis de citometría de flujo se realizó utilizando el programa informático FlowJo (TreeStar).

Anticuerpos y tratamientos

Todos los anticuerpos de tratamiento se generaron en Genentech. El anticuerpo de control fue IgG1 murina anti-gp120 (mIgG1), clon 10E7.1D2. Anti-PD-L1 era una quimera inversa humana/de ratón, el clon YW243.55.S70 mIgG2a.DANA o bien un clon completo de ratón 25A1 mIgG2a.DANA. ABRAXANE® se obtuvo de Abraxis Bioscience, Inc. (propiedad de Celgene; Summit, NJ). El carboplatino se obtuvo de Hospira, Inc. (Lake Forest, IL). La dexametasona se obtuvo de West-Ward Pharmaceuticals (Eatontown, NJ). Las pautas de dosificación y las vías de administración fueron las indicadas en la breve descripción de los dibujos. Se diluyeron los anticuerpos en PBS o acetato de histidina 20 mM, sacarosa 240 mM, polisorbato 20 al 0,02%, pH 5,5. Las quimioterapias y la dexametasona se diluyeron en solución salina.

Estudio de vacunación in vivo

Se aislaron linfocitos T OTI Thy1.1 CD8 + mediante selección negativa usando un kit de aislamiento MACS CD8 (Miltenyi Biotec) de los bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos de hembras OTI Thy1-1 donantes (colonia Genentech). Se marcaron células CD8+ purificadas con CFSE (Life Technologies; Grand Island, NY) y se inyectaron 2,5 x 10⁶ células por vía intravenosa (i.v.) en hembras C57BL/6 receptoras (Charles River Laboratories). Al día siguiente, se vacunó a los ratones mediante inyección intraperitoneal (i.p.) con 250 ng de anti-DEC205 fusionado a ovoalbúmina de longitud completa (producida en Genentech) más solución salina o dexametasona a 4 mg/kg inyectada i.v. Dos días después de la vacunación, los ratones se sacrificaron y se recogieron los bazo para su análisis. Se determinaron los recuentos celulares totales de suspensiones de células esplénicas por citometría de flujo usando una proporción de eventos de células vivas respecto una cantidad fija de microesferas fluorescentes (catálogo n.º 9003-53-6, Polysciences, Inc.; Warrington, PA) de concentración conocida. Se identificaron los linfocitos T OTI CD8+ por citometría de flujo mediante tinción con Thy1.1 PE-Cy7 y CD8 Pacific Blue (BD Biosciences) y se analizaron en un BD Biosciences LSRII usando el programa informático FACSDIVA™. El análisis de citometría de flujo se realizó utilizando el programa informático FlowJo (TreeStar).

Resultados

Este estudio evaluó la eficacia de un anticuerpo anti-PD-L1 en el contexto de tratamiento contra el cáncer en un modelo tumoral preclínico de ratón. El tratamiento combinado con un anticuerpo anti-PD-L1 (clon 25A1 mIgG2a.DANA) y paclitaxel + carboplatino dio como resultado una respuesta antitumoral sinérgica, en comparación con el tratamiento con un anticuerpo de control o paclitaxel + carboplatino solo, en el modelo de tumor colorrectal MC38 singénico (figura 1). Un 10 % de los ratones (1/10) tuvieron una respuesta parcial al tratamiento combinado con anti-PD-L1 y paclitaxel + carboplatino, en comparación con ningún ratón en los grupos de anticuerpo de control o paclitaxel + carboplatino solo (figura 1). Se realizó un seguimiento de las respuestas antitumorales fuertes que dieron como resultado reducciones en el tamaño del tumor como respuestas parciales (RP), definidas en este ejemplo como una disminución del volumen tumoral inicial de >50 % y <100 %, o respuestas completas, definidas en este ejemplo como una disminución de un 100 % en el volumen tumoral. El tratamiento combinado con anticuerpo anti-PD-L1 y paclitaxel + carboplatino también retrasó el tiempo hasta la progresión. El tiempo hasta la progresión (THP) (definido como 5x el volumen tumoral inicial en este ejemplo) para el anticuerpo de control fue de 11 días, para el paclitaxel + carboplatino fue de 15,5 días, y para el tratamiento combinado con el anticuerpo anti-PD-L1 y paclitaxel + carboplatino fue de 25 días.

En un entorno clínico, el tratamiento con paclitaxel (que está formulado en un disolvente potencialmente tóxico) implica, en general, la premedicación con corticoesteroides tal como dexametasona para reducir la probabilidad de reacciones de hipersensibilidad. Sin embargo, los corticoesteroides tal como la dexametasona tienen efectos inmunosupresores y pueden inhibir las respuestas de los linfocitos T, lo que a su vez puede reducir la actividad de los antagonistas de la unión al eje de PD-1, tal como los agentes anti-PD-L1. Consecuentemente, la administración de dexametasona anuló la eficacia del tratamiento con un único agente anti-PD-L1 en el modelo de tumor colorrectal MC38 singénico (figuras 2A y 2B). Además, la dexametasona inhibió las respuestas de los linfocitos T específicos de antígeno en un modelo de y transferencia y vacunación de linfocitos T adoptivas de OTI (figura 3). Por lo tanto, sin deseo de limitación teoría alguna, el tratamiento con corticoesteroides tal como la dexametasona puede amortiguar o desviar algunos de los beneficios de los antagonistas de la unión al eje de PD-1, tal como el tratamiento anti-PD-L1, reduciendo de este modo la potenciación de la función de los linfocitos T y su capacidad de promover respuestas antitumorales, tal como la destrucción de tumores mediada por linfocitos T CD8+.

El tratamiento combinado con un anticuerpo anti-PD-L1 (YW243.55.S70.mIgG2a.DANA quimérico) y nab-paclitaxel (ABRAXANE®) + carboplatino dio como resultado una eficacia antitumoral sinérgica inesperadamente fuerte en comparación con el tratamiento con un anticuerpo de control, anticuerpo con un único agente anti-PD-L1 o ABRAXANE® + carboplatino solo, en el modelo de tumor colorrectal MC38 singénico (figuras 4A y 4B). El anticuerpo combinado anti-PD-L1 y el tratamiento con ABRAXANE® + carboplatino lograron respuestas completas duraderas que duraron más de 90 días en 4/8 ratones (figuras 4A y 4B). Esta sinergia fue aún más fuerte que la sinergia observada como resultado del tratamiento combinado con anti-PD-L1 y paclitaxel + carboplatino. El THP (5x el volumen tumoral inicial) fue de 11,5 días para el anticuerpo de control solo, 9 días para el anticuerpo anti-PD-L1 solo, 13,5 días para el ABRAXANE® + carboplatino solo, y no aplicable para la politerapia del anticuerpo anti-PD-L1 y ABRAXANE® + carboplatino, donde 4/8 ratones mostraron regresión completa. Esto indica que la politerapia del anticuerpo anti-PD-L1 y ABRAXANE® + carboplatino retrasa fuertemente el tiempo hasta la progresión, en mayor medida que el tratamiento combinado con anticuerpo anti-PD-L1 y paclitaxel + carboplatino. Además, todos los ratones curados (es decir, ratones que presentan respuestas completas) del tratamiento combinado con anti-PD-L1 y ABRAXANE® + carboplatino pudieron rechazar por completo una exposición secundaria con la misma línea celular tumoral MC38, lo que indica que el tratamiento generó respuestas de memoria de los linfocitos T (figuras 5A-5B). La reestimulación *in vitro* de esplenocitos de estos ratones curados mostró una función efectora de los linfocitos T incrementada como se observa por la producción potenciada de interferón gamma (IFN- γ) tanto de linfocitos T CD4+ como de linfocitos T CD8+ en comparación con los ratones con exposición primaria sin exposición previa (figuras 5A-5B).

La actividad sinérgica antitumoral sorprendentemente fuerte y la capacidad inesperada de obtener respuestas completas y la generación de respuestas de memoria de los linfocitos T representan importantes ventajas terapéuticas para la politerapia con antagonistas de la unión al eje de PD-1 y taxanos, tales como nab-paclitaxel (ABRAXANE®). Adicionalmente, a diferencia del tratamiento con paclitaxel, el tratamiento con nab-paclitaxel (ABRAXANE®) típicamente no implica premedicación con corticoesteroides, tales como dexametasona. Los resultados presentados aquí indican que el tratamiento combinado con un antagonista de la unión al eje de PD-1 (tal como un anticuerpo anti-PD-L1) y nab-paclitaxel (ABRAXANE®) también posibilita un régimen de tratamiento más simple que puede evitar el uso de corticoesteroides y reducir de este modo la probabilidad de posibles efectos adversos.

Ejemplo 2: El tratamiento combinado con el anticuerpo anti-PD-L1 con nab-paclitaxel (ABRAXANE®) y carboplatino logró respuestas completas en un ensayo clínico de fase 1b para pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico

Se realizó un estudio clínico de fase 1b para evaluar la eficacia del tratamiento combinado con un anticuerpo anti-PD-L1 (MPDL3280A) en combinación con un taxano (nab-paclitaxel (ABRAXANE®) o paclitaxel) y carboplatino para pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM).

El protocolo de dosificación para este estudio clínico fue como sigue:

1) Politerapia con MPDL3280A/ABRAXANE®/carboplatino: (a) MPDL3280A a 1200 mg i.v. administrados cada 3 semanas (C3S); (b) ABRAXANE® a 100 mg/m² i.v. cada semana (C1S); y (c) carboplatino i.v. cada 3 semanas (C3S) con un área bajo la curva (ABC) objetivo de 6 mg/ml.

2) Politerapia con MPDL3280A/paclitaxel/carboplatino: (a) MPDL3280A a 1200 mg i.v. administrados cada 3 semanas (C3S); (b) paclitaxel a 200 mg/m² i.v. cada 3 semanas (C3S); y (c) carboplatino i.v. cada 3 semanas (C3S) con un ABC objetivo de 6 mg/ml.

La tabla 4 muestra los resultados de un estudio de 14 pacientes tratados con MPDL3280A en combinación con ABRAXANE® y carboplatino. La tabla 5 muestra los resultados de un estudio de 6 pacientes tratados con MPDL3280A en combinación con paclitaxel y carboplatino.

Tabla 4: Eficacia del tratamiento combinado con MPDL3280A/ABRAXANE®/carboplatino

Resultado	Porcentaje (n/N)
Tasa de respuesta objetiva (TRO)	64,3 % (9/14)
Respuesta completa (RC)	21,4 % (3/14)
Respuesta parcial (RP)	42,9 % (6/14)
Enfermedad estable (EE)	28,6 % (4/14)
Enfermedad progresiva (EP)	7,1 % (1/14)

Tabla 5: Eficacia del tratamiento combinado con MPDL3280A/paclitaxel/carboplatino

Resultado	Porcentaje (n/N)
Tasa de respuesta objetiva (TRO)	33,3 % (2/6)
Respuesta completa (RC)	0
Respuesta parcial (RP)	33,3 % (2/6)
Enfermedad estable (EE)	66,7 % (4/6)
Enfermedad progresiva (EP)	0

Como se muestra en la tabla 4 y la figura 6A, el tratamiento combinado con MPDL3280A y nab-paclitaxel (ABRAXANE®) + carboplatino dio como resultado una eficacia antitumoral inesperadamente fuerte, con una tasa de respuesta objetiva de un 64,3% (TRO, RC+RP). Sorprendentemente, un 21,4 % (3/14) de los pacientes tratados con la politerapia con MPDL3280A y nab-paclitaxel (ABRAXANE®) + carboplatino lograron una respuesta completa (es decir, una ausencia completa de masa tumoral detectable). Un 42,9 % (6/14) de los pacientes experimentaron una respuesta parcial.

El tratamiento combinado con MPDL3280A y paclitaxel + carboplatino también dio como resultado una eficacia antitumoral, aunque fue algo menos robusta que la de la politerapia con MPDL3280A/nab-paclitaxel (ABRAXANE®) + carboplatino en el tamaño de muestra relativamente pequeño sometido a prueba. La TRO para la politerapia con MPDL3280A y paclitaxel + carboplatino fue de un 33,3 %, experimentando ambos pacientes con respuesta una respuesta parcial (tabla 5 y figura 6B).

Consecuente con los estudios preclínicos presentados en el ejemplo 1, la actividad antitumoral sorprendentemente fuerte y la capacidad inesperada de obtener respuestas completas mantenidas representan importantes ventajas terapéuticas para la politerapia con antagonistas de la unión al eje de PD-1 (tales como anticuerpos anti-PD-L1) y taxanos, tales como nab-paclitaxel (ABRAXANE®).

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Genentech, Inc.
F. Hoffman-La Roche AG

10 <120> PROCEDIMIENTOS DE TRATAMIENTO DE CÁNCERES USANDO ANTAGONISTAS DE LA UNIÓN AL EJE
DE PD-1 Y TAXANOS

15 <130> 50474-103WO2

20 <150> US 61/917264
<151> 17/12/2013

25 <160> 33
<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 440
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 1

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

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

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
115 120 125

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

ES 2 763 429 T3

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

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

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
210 215 220

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
245 250 255

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
260 265 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
275 280 285

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
305 310 315 320

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
370 375 380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
385 390 395 400

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
405 410 415

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

- 5 <210> 2
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> Construcción sintética
- <400> 2

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

ES 2 763 429 T3

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 3

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

5

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Construcción sintética

15

<220>
<221> Xaa
<222> (6)..(6)
<223> Xaa es D o G

20

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

25

<210> 6
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> Construcción sintética

35

<220>
<221> Xaa
<222> (4)..(4)
<223> Xaa es S o L

<220>
<221> Xaa
<222> (10)..(10)

<223> Xaa es T o S

<400> 6

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

5 Lys Gly

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

15 <400> 7

Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr
 1 5

20 <210> 8
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> Construcción sintética

<400> 8

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

30 <210> 9
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 9

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

<210> 10
 <211> 32
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

50 <400> 10

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

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

5

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 11

	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala
	1				5					10	

15

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

25

<220>

<221> Xaa

<222> (5)..(5)

<223> Xaa es D o V

30

<220>

<221> Xaa

<222> (6)..(6)

<223> Xaa es V o I

35

<220>

<221> Xaa

<222> (7)..(7)

<223> Xaa es S o N

40

<220>

<221> Xaa

<222> (9)..(9)

<223> Xaa es A o F

45

<220>

<221> Xaa

<222> (10)..(10)

<223> Xaa es V o L

<400> 12

	Arg	Ala	Ser	Gln	Xaa	Xaa	Xaa	Thr	Xaa	Xaa	Ala
	1			5					10		

50

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Construcción sintética

<220>
 <221> Xaa
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es F o T
 5
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es Y o A
 10
 <400> 13
 Ser Ala Ser Xaa Leu Xaa Ser
 1 5
 15 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Construcción sintética
 <220>
 <221> Xaa
 25 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa es Y, G, F o S
 <220>
 <221> Xaa
 30 <222> (4).. (4)
 <223> Xaa es L, Y, F o W
 <220>
 <221> Xaa
 35 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es Y, N, A, T, G, F o I
 <220>
 <221> Xaa
 40 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es H, V, P, T o I
 <220>
 <221> Xaa
 45 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa es A, W, R, P o T
 <400> 14
 Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr
 50 1 5
 <210> 15
 <211> 23
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 60 <400> 15

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

5 <210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética
10
<400> 16

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

15 <210> 17
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética
20
<400> 17

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

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

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 18
35

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

40 <210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética
45
<400> 19

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His
1 5 10

50 <210> 20
<211> 18

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Construcción sintética
 <400> 20
 Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15
 Lys Gly
 10 <210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 21
 20 Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr
 1 5
 <210> 22
 <211> 11
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Construcción sintética
 <400> 22
 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10
 35 <210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 23
 45 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5
 <210> 24
 <211> 9
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 55 <400> 24

Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr
1 5

<210> 25
5 <211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Construcción sintética

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
15 115

<210> 26
20 <211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Construcción sintética

<400> 26

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120

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

10 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 27

15 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 28

25 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

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

30 <220>
<223> Construcción sintética

35 <400> 29

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

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

40 <210> 30

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 30

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

10

<210> 31
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Construcción sintética

20

<400> 31

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 1 5 10 15

25

<210> 32
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

30

<400> 32

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

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

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

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

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

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

35

ES 2 763 429 T3

Ala	Arg	Arg	His	Trp	Pro	Gly	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr		
			100					105					110				
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro		
		115					120					125					
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly		
	130					135					140						
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn		
145					150					155					160		
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln		
				165					170						175		
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser		
			180					185						190			
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser		
	195						200					205					
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr		
	210					215					220						
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser		
225					230					235					240		
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg		
				245					250					255			
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro		
			260					265					270				
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala		
	275						280					285					
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val		
	290					295					300						
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr		
305					310					315					320		

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

5

<210> 33

<211> 214

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15

<400> 33

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

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

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

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

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

ES 2 763 429 T3

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista de la unión a PD-L1 para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del carcinoma de pulmón no microcítico en un individuo, en el que el antagonista de la unión a PD-L1 se administra en combinación con nab-paclitaxel y carboplatino, y en el que el antagonista de la unión a PD-L1 es un anticuerpo.
2. El antagonista de la unión a PD-L1 para su uso de la reivindicación 1, en el que el antagonista de la unión a PD-L1 (i) inhibe la unión de PD-L1 a PD-1; (ii) inhibe la unión de PD-L1 a B7-1; o (iii) inhibe la unión de PD-L1 tanto a PD-1 como a B7-1.
3. El antagonista de la unión a PD-L1 para su uso de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: MPDL3280A, YW243.55.S70, MDX-1105 y MEDI4736.
4. El antagonista de la unión a PD-L1 para su uso de la reivindicación 3, en el que el anticuerpo es MPDL3280A.
5. El antagonista de la unión a PD-L1 para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de HVR-H1 de SEQ ID NO:19, una secuencia de HVR-H2 de SEQ ID NO:20 y una secuencia de HVR-H3 de SEQ ID NO:21; y una cadena ligera que comprende una secuencia de HVR-L1 de SEQ ID NO:22, una secuencia de HVR-L2 de SEQ ID NO:23 y una secuencia de HVR-L3 de SEQ ID NO:24.
6. El antagonista de la unión a PD-L1 para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4.
7. El antagonista de la unión a PD-L1 para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el individuo tiene cáncer o se ha diagnosticado de cáncer.
8. El antagonista de la unión a PD-L1 para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que las células cancerosas en el individuo expresan PD-L1.
9. El antagonista de la unión a PD-L1 para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el nab-paclitaxel y/o el carboplatino se administran antes que el antagonista de la unión a PD-L1, simultáneamente con el antagonista de la unión a PD-L1 o después del antagonista de la unión a PD-L1.
10. El antagonista de la unión a PD-L1 para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el antagonista de la unión a PD-L1, el nab-paclitaxel y/o el carboplatino se administran por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, tópica, oral, transdérmica, intraperitoneal, intraorbital, por implantación, por inhalación, por vía intratecal, intraventricular o intranasal.

Figura 1

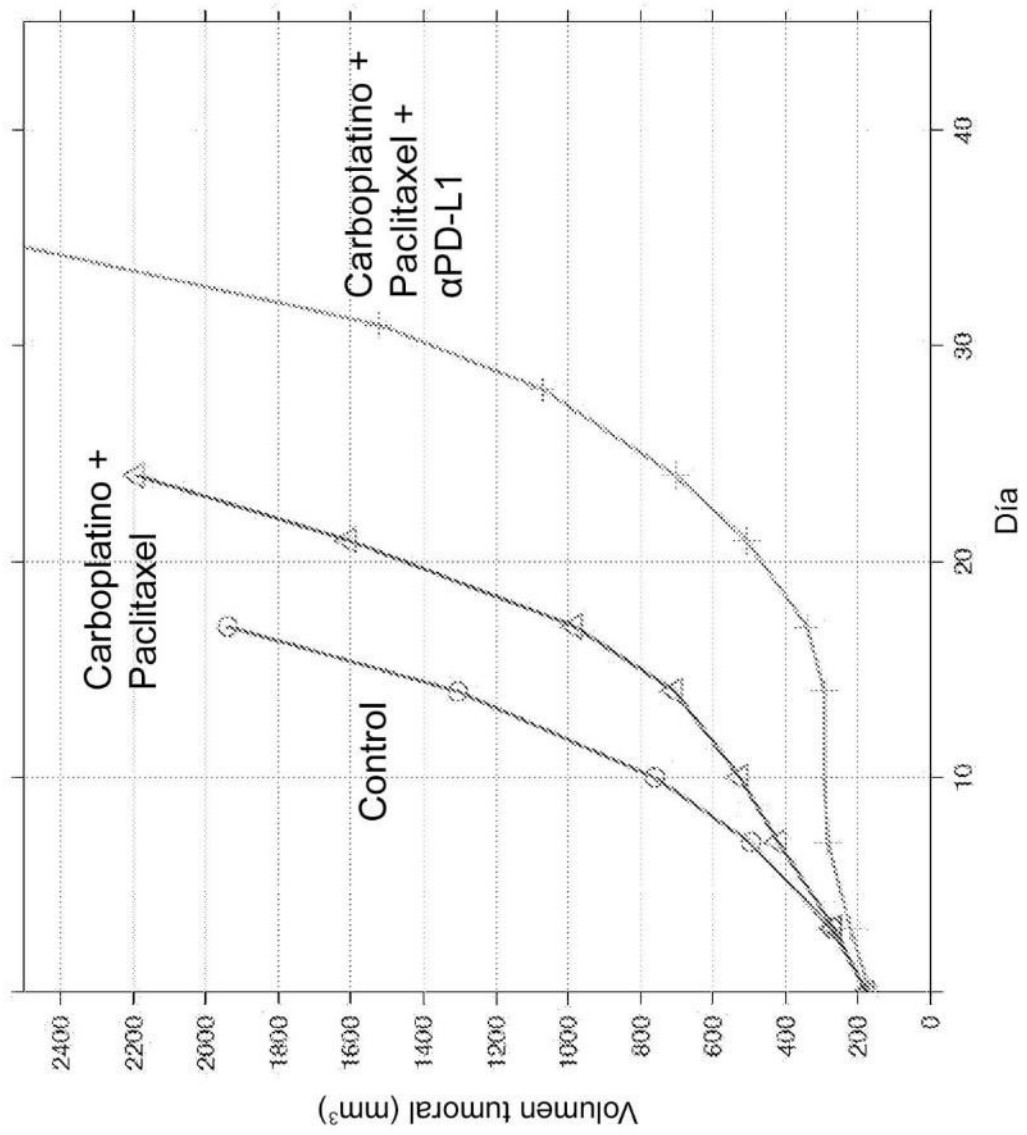


Figura 2A

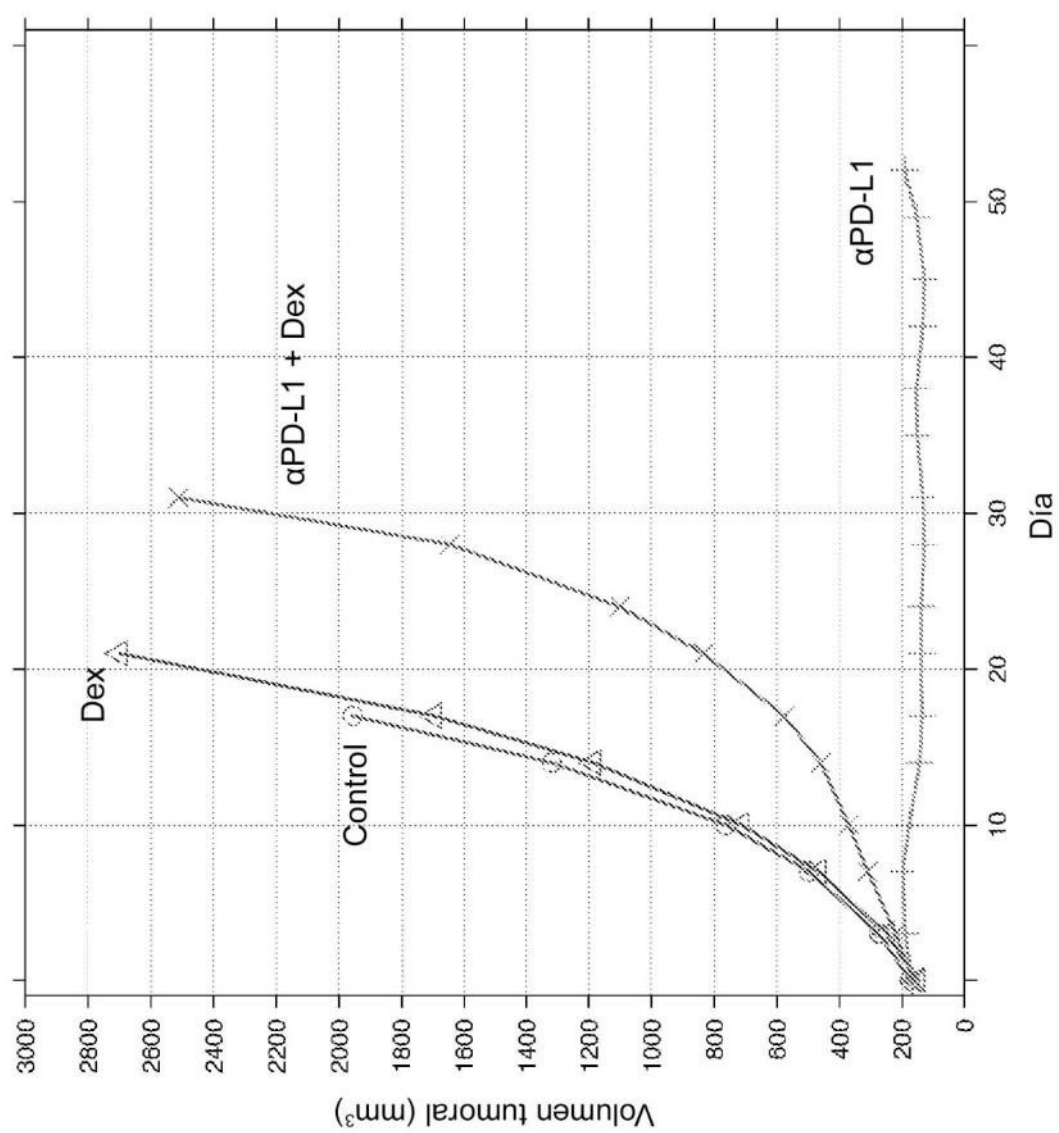


Figura 2B

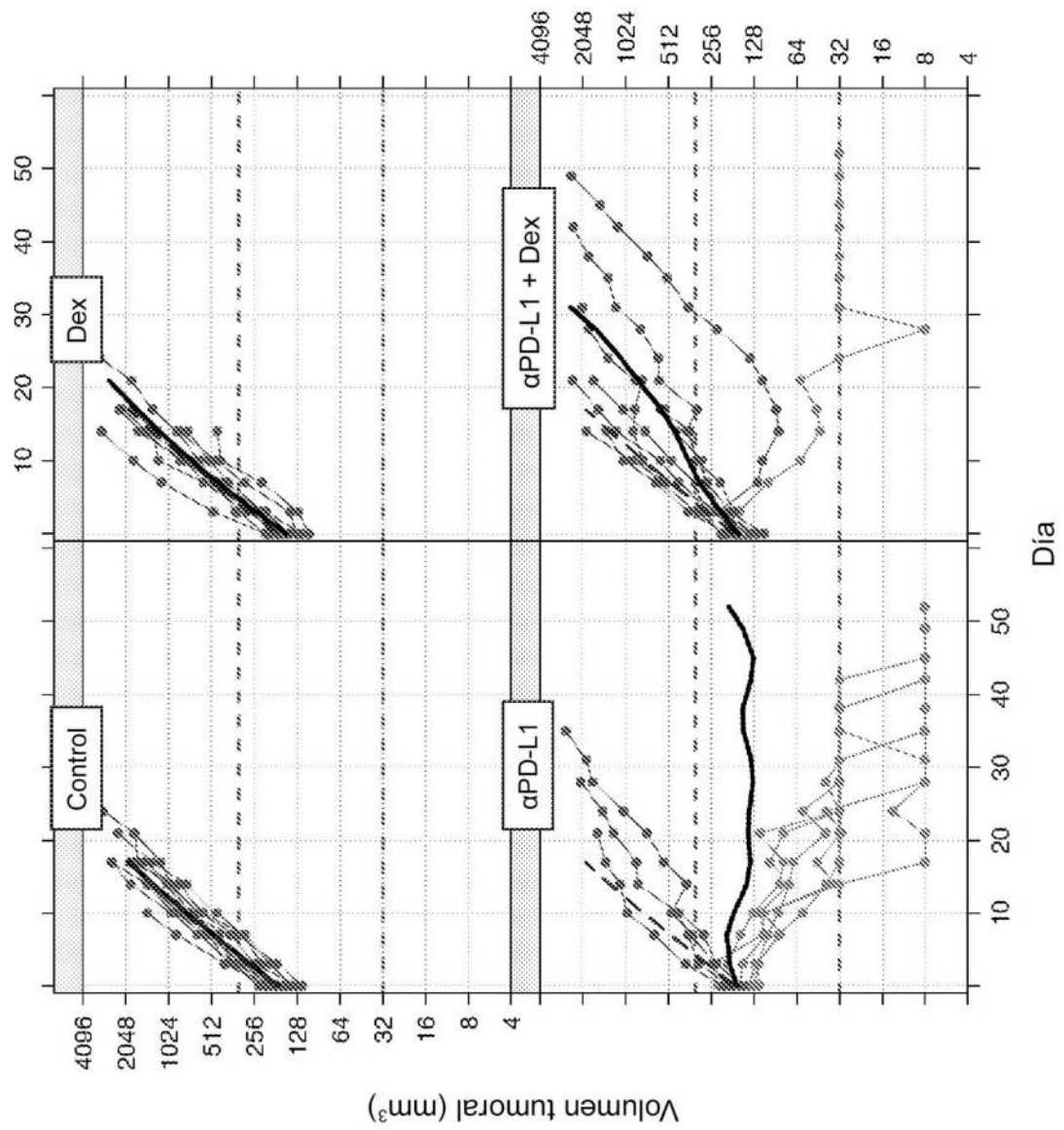


Figura 3

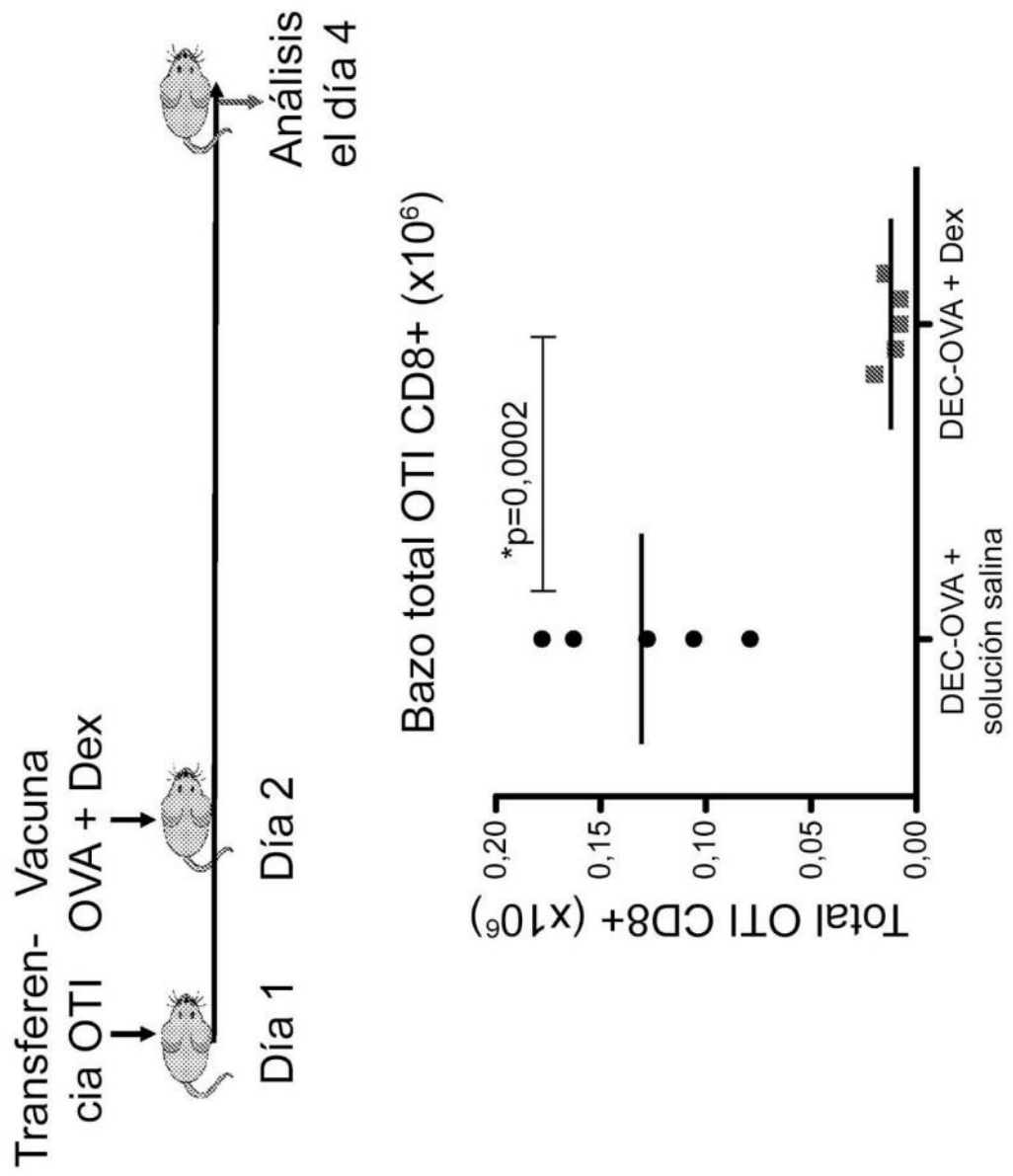


Figura 4A

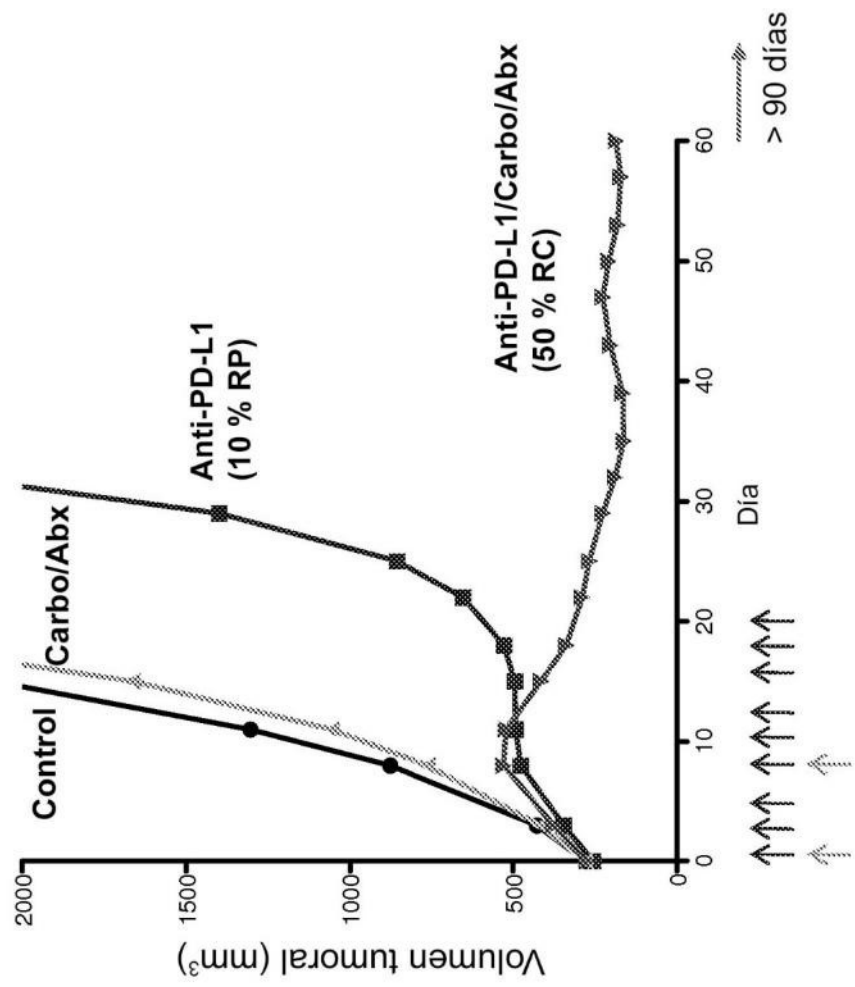


Figura 4B

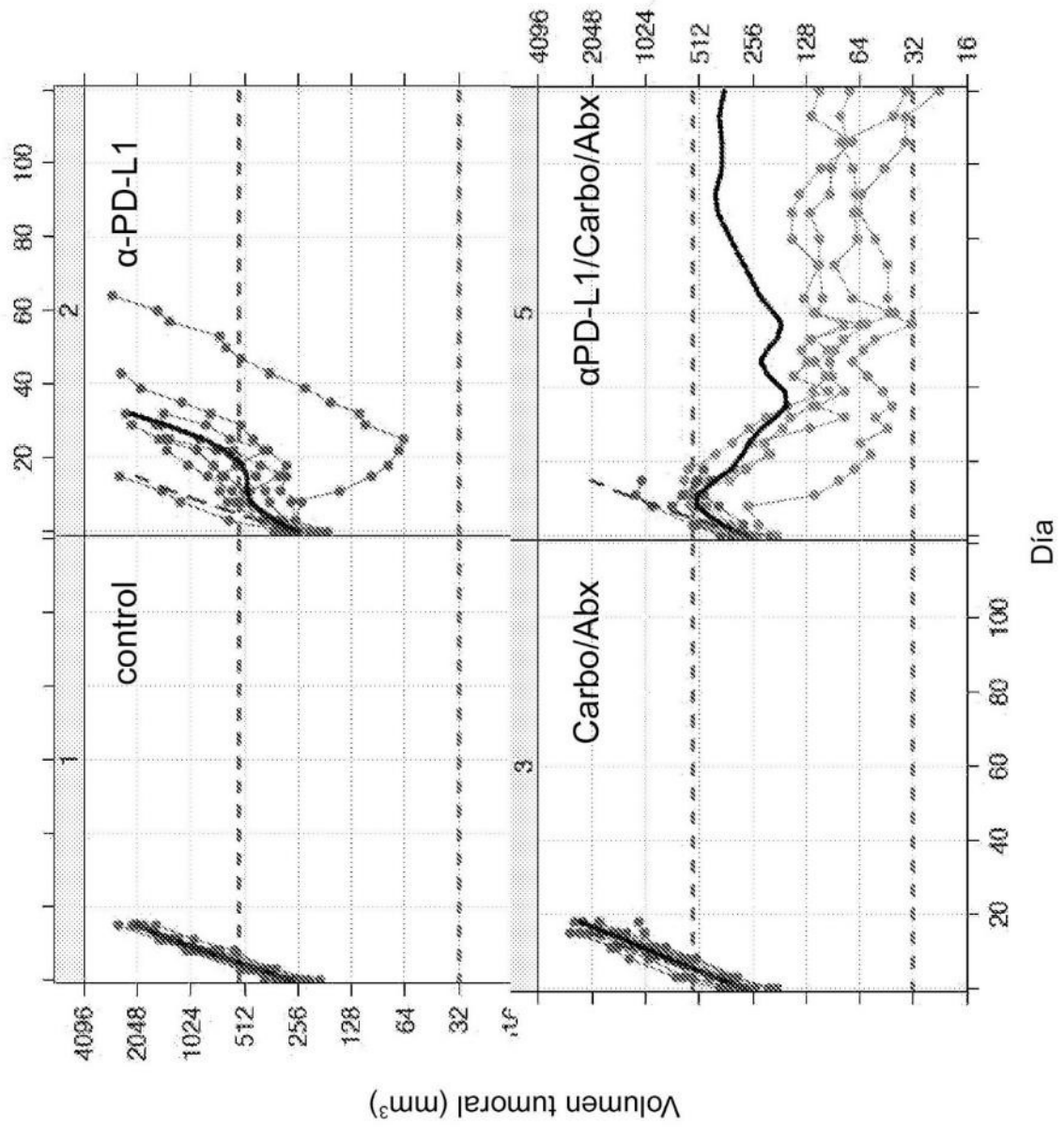


Figura 5A

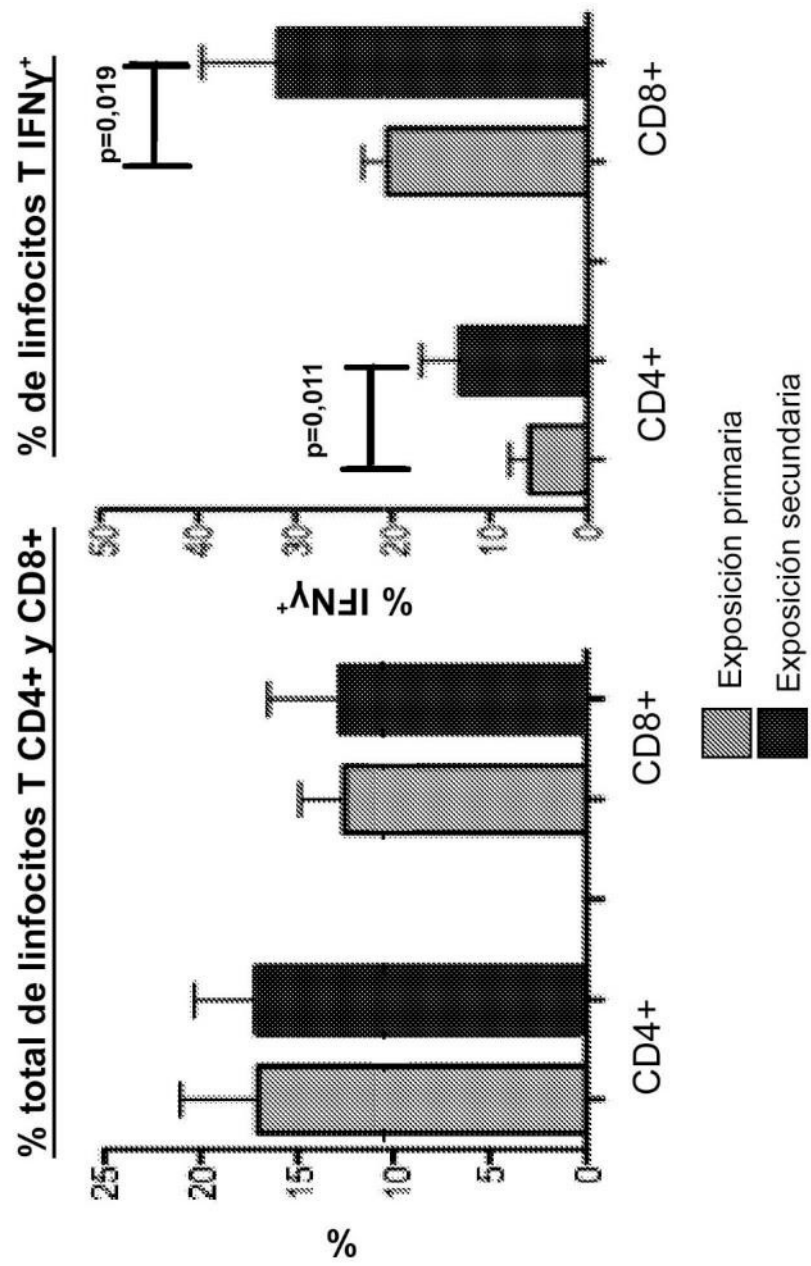


Figura 5B

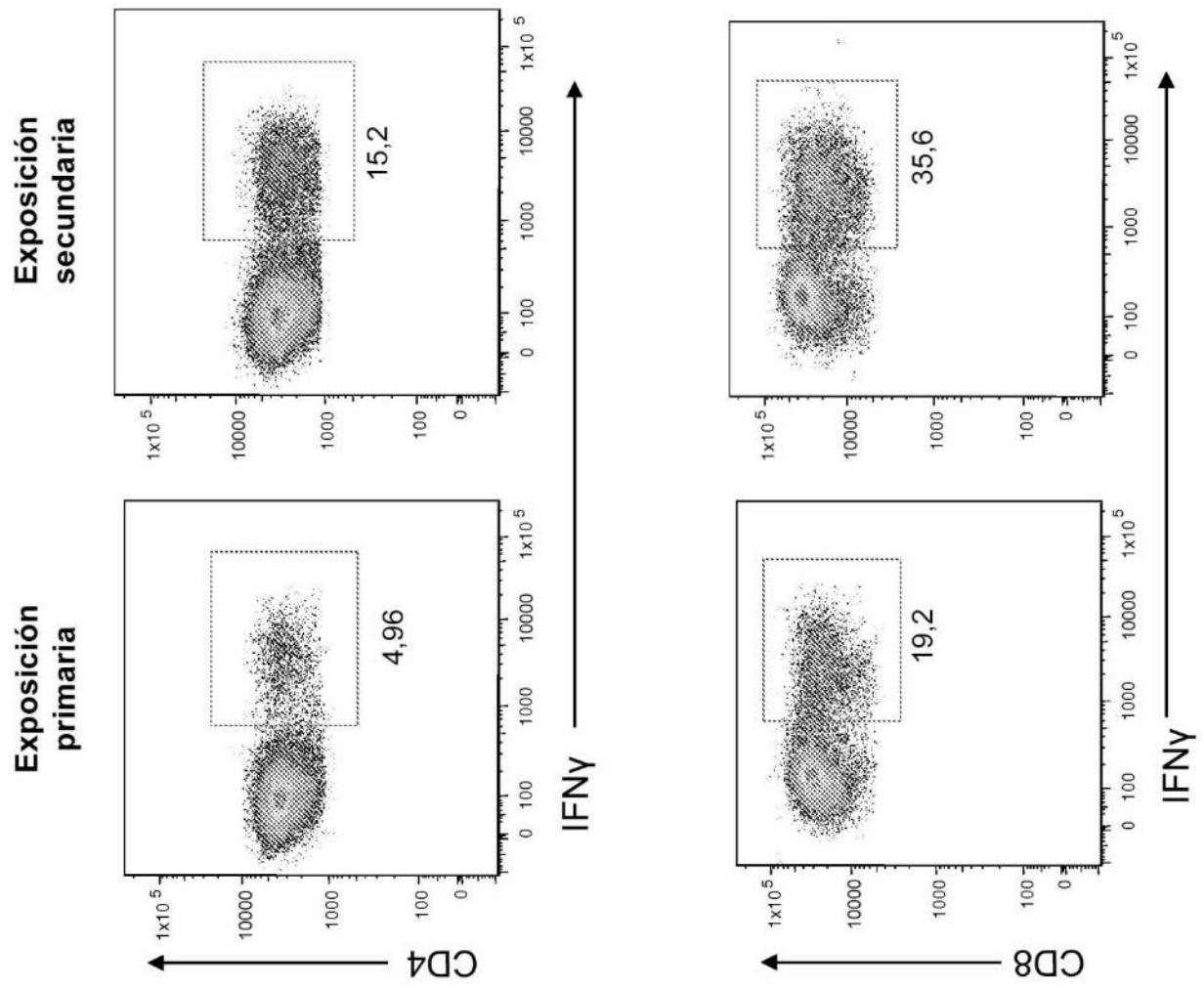


Figura 6A

MPDL3280A/ABRAXANE®/carboplatino

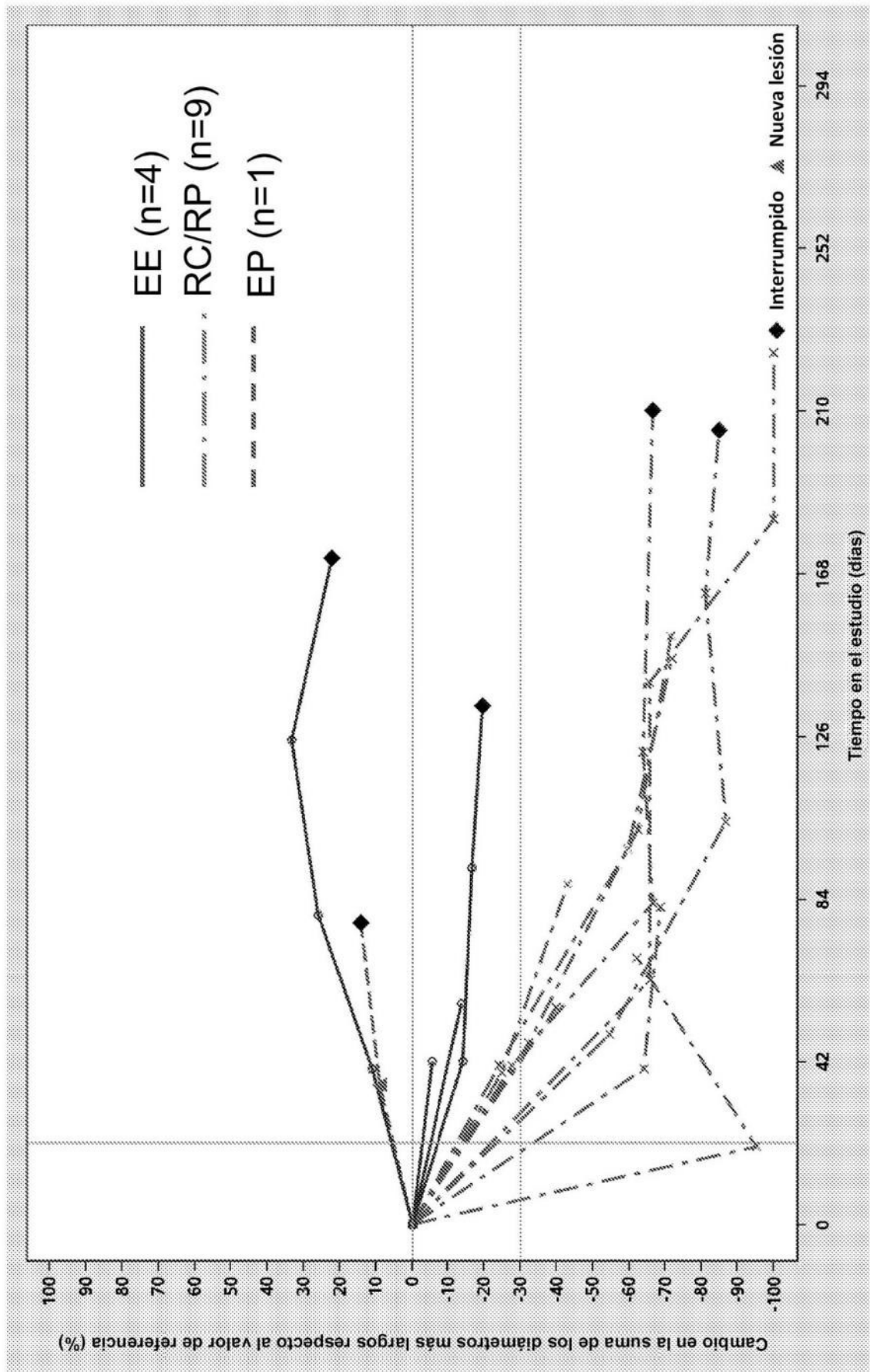


Figura 6B

MPDL3280A/paclitaxel/carboplatino

