

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 789 500**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2016 PCT/US2016/034664**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016 WO16196298**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2016 E 16732373 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020 EP 3303632**

54 Título: **Procedimientos terapéuticos y de diagnóstico para el cáncer**

30 Prioridad:

29.05.2015 US 201562168669 P
29.02.2016 US 201662301599 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.10.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

HEGDE, PRITI;
KOWANETZ, MARCIN;
FINE, GREGG;
MARIATHASAN, SANJEEV y
BOURGON, RICHARD

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 789 500 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 terapéuticos y de diagnóstico para el cáncer

5 **LISTADO DE SECUENCIAS**

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se ha enviado electrónicamente en formato ASCII y se incorpora por la presente como referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 20 de mayo de 2016, se denomina 50474-116WO3_Sequence_Listing_5_20_16_ST25 y tiene un tamaño de 23.626 bytes.

10 **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

En el presente documento se proporcionan procedimientos y composiciones terapéuticos y de diagnóstico para afecciones patológicas, tales como cáncer (por ejemplo, cáncer de vejiga (por ejemplo, cáncer de vejiga urotelial)), y procedimientos para usar antagonistas de unión al eje de PD-L1. En particular, la invención proporciona biomarcadores para la selección y diagnóstico de pacientes, procedimientos de tratamiento, artículos de fabricación, kits de diagnóstico y procedimientos de detección.

20 **ANTECEDENTES**

El cáncer sigue siendo una de las amenazas más mortales para la salud humana. Los cánceres, o tumores malignos, metastatizan y crecen rápidamente de manera incontrolada, lo que hace que la detección y el tratamiento a tiempo sean extremadamente difíciles. En EE. UU., el cáncer afecta a casi 1,3 millones de pacientes nuevos cada año, y es la segunda causa principal de muerte después de cardiopatía, lo que representa aproximadamente 1 de cada 4 muertes. Los tumores sólidos son responsables de la mayoría de esas muertes. El cáncer de vejiga es la quinta neoplasia maligna más común en todo el mundo, con casi 400.000 casos nuevos diagnosticados y aproximadamente 150.000 muertes asociadas registradas al año. En particular, el cáncer de vejiga urotelial metastásico se asocia con un desenlace desfavorable y representa una necesidad médica no cubierta importante con pocos tratamientos eficaces hasta la fecha.

El ligando de muerte programada 1 (PD-L1) es una proteína que ha estado implicada en la supresión de las respuestas del sistema inmunitario durante infecciones crónicas, embarazo, aloinjertos de tejidos, enfermedades autoinmunitarias y cáncer. El PD-L1 regula la respuesta inmunitaria uniéndose a un receptor inhibitor, conocido como muerte programada 1 (PD-1), que se expresa en la superficie de linfocitos T, linfocitos B y monocitos. El PD-L1 regula negativamente la función de los linfocitos T también a través de la interacción con otro receptor, B7-1. La formación de los complejos PD-L1/PD-1 y PD-L1/B7-1 regula negativamente la señalización del receptor de linfocitos T, lo que da como resultado la posterior regulación por disminución de la activación de linfocitos T y la supresión de la actividad inmunitaria antitumoral. El documento WO 2014/151006 divulga que la expresión de PD-L1 es indicativa de una mayor probabilidad de respuesta de pacientes con cáncer (por ejemplo, cáncer de vejiga) al tratamiento contra el eje PD-L1.

A pesar del avance significativo en el tratamiento del cáncer (por ejemplo, cáncer de vejiga (por ejemplo, cáncer de vejiga urotelial)), todavía se buscan tratamientos y procedimientos de diagnóstico mejorados.

45 **SUMARIO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención es como se define en las reivindicaciones. En un primer aspecto, la invención presenta un antagonista de unión al eje de PD-L1 para su uso en el tratamiento de un paciente que padece un cáncer de vejiga, en el que se ha determinado que una muestra tumoral obtenida del paciente tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en las células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 1 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 1 %, aproximadamente un 2 %, aproximadamente un 3 % o aproximadamente un 4 % o más), aproximadamente un 5 % o más, o aproximadamente un 10 % o más de la muestra tumoral, y en el que se ha determinado que la muestra tumoral obtenida del paciente es un tumor de subtipo luminal. En algunos modos de realización se ha determinado que una muestra tumoral obtenida del paciente tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 65 % o más (por ejemplo, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 5 %, de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 10 %, de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 20 %, de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 30 %, de aproximadamente un 30 % a aproximadamente un 40 %, de aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 50 %, o de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 65 %) de la muestra tumoral. En algunos modos de realización, la mediana del tiempo de supervivencia global de un paciente al que se le administró una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-L1 es de al menos aproximadamente 8 meses. En algunos modos de realización, la mediana del tiempo de supervivencia global de un paciente al que se le administró una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-L1 es de al menos aproximadamente 8,8 meses. En otros modos de realización, la mediana del tiempo de supervivencia global de un paciente al que se le administró una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-L1 es de entre al menos aproximadamente 7 y aproximadamente 11 meses. En otro modo de realización, la tasa de respuesta objetiva de un paciente al que se le administró una cantidad terapéuticamente eficaz

de un antagonista de unión al eje de PD-L1 es de entre aproximadamente un 10 % y aproximadamente un 35 % (por ejemplo, de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 20 %, de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 30 %, de aproximadamente un 30 % a aproximadamente un 35 %). Aún en otro modo de realización, la tasa de respuesta objetiva de un paciente al que se le administró una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-L1 es de entre aproximadamente un 13 % y aproximadamente un 24 %. En otros modos de realización, la tasa de respuesta objetiva de un paciente al que se le administró una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-L1 es de al menos aproximadamente un 12 %. En otros modos de realización, la tasa de respuesta objetiva de un paciente al que se le administró una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-L1 es de al menos aproximadamente un 21 %. En algunos modos de realización, la tasa de respuesta objetiva de un paciente al que se le administró una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-L1 es de aproximadamente un 18 %.

En algunos modos de realización se ha determinado que la muestra tumoral obtenida del paciente tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 5 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 6 %, aproximadamente un 7 %, aproximadamente un 8 % o aproximadamente un 9 % o más) de la muestra tumoral. En algunos modos de realización, la mediana del tiempo de supervivencia global de un paciente al que se le administró una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-L1 es de al menos aproximadamente 9 meses. En algunos modos de realización, la mediana del tiempo de supervivencia global de un paciente al que se le administró una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-L1 es de al menos aproximadamente 11 meses. En algunos modos de realización, la mediana del tiempo de supervivencia sin progresión de un paciente al que se le administró una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-L1 es de al menos aproximadamente 4 meses. En algunos modos de realización, la mediana del tiempo de supervivencia sin progresión de un paciente al que se le administró una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-L1 es de entre al menos aproximadamente 3 y aproximadamente 6 meses. En otros modos de realización, la tasa de respuesta objetiva de un paciente al que se le administró una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-L1 es de entre aproximadamente un 10 % y aproximadamente un 45 %. En algunos modos de realización, la tasa de respuesta objetiva de un paciente al que se le administró una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-L1 es de entre aproximadamente un 35 % y aproximadamente un 45 %. Aún en otros modos de realización, la tasa de respuesta objetiva de un paciente al que se le administró una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-L1 es de entre aproximadamente un 18 % y aproximadamente un 37 %. En otros modos de realización, la tasa de respuesta objetiva de un paciente al que se le administró una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-L1 es de al menos aproximadamente un 14 %. En otros modos de realización, la tasa de respuesta objetiva de un paciente al que se le administró una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-L1 es de al menos aproximadamente un 25 %. En algunos modos de realización, la tasa de respuesta objetiva de un paciente al que se le administró una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-L1 es de aproximadamente un 27 %.

En algunos modos de realización se ha determinado que la muestra tumoral obtenida del paciente tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 10 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 % o aproximadamente un 60 % o más) de la muestra tumoral. En otros modos de realización se ha determinado que la muestra tumoral obtenida del paciente es un tumor de subtipo luminal.

En algunos modos de realización se ha determinado que el nivel de expresión de al menos uno de CDKN2A, GATA3, FOXA1 y ERBB2 en la muestra tumoral obtenida del paciente se incrementa en relación con un nivel de referencia del al menos un gen, y/o se ha determinado que el nivel de expresión de al menos uno de FGFR3, KRT5, KRT14 y EGFR en la muestra tumoral obtenida del paciente disminuye en relación con un nivel de referencia del al menos un gen. En algunos modos de realización se ha determinado que los niveles de expresión de CDKN2A, GATA3, FOXA1 y ERBB2 en la muestra tumoral obtenida del paciente se incrementan en relación con niveles de referencia de los genes, y/o se ha determinado que los niveles de expresión de FGFR3, KRT5, KRT14 y EGFR en la muestra tumoral obtenida del paciente disminuyen en relación con niveles de referencia de los genes. En algunos modos de realización se ha determinado que los niveles de expresión de CDKN2A, GATA3, FOXA1 y ERBB2 en la muestra tumoral obtenida del paciente se incrementan en relación con niveles de referencia de los genes, y se ha determinado que los niveles de expresión de FGFR3, KRT5, KRT14 y EGFR en la muestra tumoral obtenida del paciente disminuyen en relación con niveles de referencia de los genes. En otros modos de realización se ha determinado que el nivel de expresión de miR-99a-5p o miR100-5p en la muestra tumoral obtenida del paciente se incrementa en relación con un nivel de referencia del microARN (miARN). En algunos modos de realización se ha determinado que los niveles de expresión de miR-99a-5p y miR100-5p en la muestra tumoral obtenida del paciente se incrementan en relación con niveles de referencia de los microARN. Aún en otros modos de realización se ha determinado que el nivel de expresión de al menos uno de CD8A, GZMA, GZMB, IFNG, CXCL9, CXCL10, PRF1 y TBX21 en la muestra tumoral obtenida del paciente se incrementa en relación con un nivel de referencia del al menos un gen. En algunos modos de realización se ha determinado que los niveles de expresión de al menos CXCL9 y CXCL10 en la muestra tumoral obtenida del

paciente se incrementan en relación con niveles de referencia de los genes. En otros modos de realización, el tumor de subtipo luminal es un tumor de subtipo de cluster luminal II.

En otro aspecto, la invención presenta un procedimiento para determinar si un paciente que padece un cáncer de vejiga es probable que responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1, comprendiendo el procedimiento determinar el nivel de expresión de PD-L1 en las células inmunitarias infiltrantes de tumor en una muestra tumoral obtenida del paciente, en el que un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 1 % o más, aproximadamente un 5 % o más, o aproximadamente un 10 % o más de la muestra tumoral indica que es probable que el paciente responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1, en el que se ha determinado que la muestra tumoral obtenida del paciente es un tumor de subtipo luminal.

En otro aspecto, la invención presenta un procedimiento para predecir la capacidad de respuesta de un paciente que padece un cáncer de vejiga al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1, comprendiendo el procedimiento determinar el nivel de expresión de PD-L1 en las células inmunitarias infiltrantes de tumor en una muestra tumoral obtenida del paciente, en el que un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 1 % o más, aproximadamente un 5 % o más, o aproximadamente un 10 % o más de la muestra tumoral indica que es probable que el paciente responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1, en el que se ha determinado que la muestra tumoral obtenida del paciente es un tumor de subtipo luminal.

En otro aspecto, la invención presenta un procedimiento para seleccionar un tratamiento para un paciente que padece un cáncer de vejiga, comprendiendo el procedimiento determinar el nivel de expresión de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor en una muestra tumoral obtenida del paciente, y seleccionar un tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1 para el paciente en base a un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 1 % o más, aproximadamente un 5 % o más, o aproximadamente un 10 % o más de la muestra tumoral, en el que se ha determinado que la muestra tumoral obtenida del paciente es un tumor de subtipo luminal.

En algunos modos de realización se ha determinado que la muestra tumoral obtenida del paciente tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 5 % o más de la muestra tumoral. En algunos modos de realización se ha determinado que la muestra tumoral obtenida del paciente tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 10 % o más de la muestra tumoral.

En algunos modos de realización, el antagonista de unión al eje de PD-L1 se selecciona del grupo que consiste en un antagonista de unión a PD-L1, un antagonista de unión a PD-1 o un antagonista de unión a PD-L2. En algunos modos de realización, el antagonista de unión al eje de PD-L1 es un antagonista de unión a PD-L1. En algunos modos de realización, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a uno o más de sus compañeros de unión a ligando. En algunos modos de realización, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1. En algunos modos de realización, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a B7-1. En otros modos de realización, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 tanto a PD-1 como a B7-1. Aún en otros modos de realización, el antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo. En algunos modos de realización, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en atezolizumab (MPDL3280A), YW243.55.S70, MDX-1105, MEDI4736 (durvalumab) y MSB0010718C (avelumab). 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:25 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4. En otros modos de realización, el antagonista de unión al eje de PD-1 es un antagonista de unión a PD-1. En algunos modos de realización, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a uno o más de sus compañeros de unión a ligando. En algunos modos de realización, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L1. En algunos modos de realización, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L2. En otros modos de realización, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 tanto a PD-L1 como a PD-L2. Aún en otros modos de realización, el antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo. En algunos modos de realización, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en MDX-1106 (nivolumab), MK-3475 (pembrolizumab), MEDI-0680 (AMP-514), PDR001, REGN2810 y BGB-108. En otros modos de realización, el antagonista de unión a PD-1 es una proteína de fusión Fc. En algunos modos de realización, la proteína de fusión Fc es AMP-224. Aún en otros modos de realización, el antagonista de unión al eje de PD-L1 se formula para la administración con un segundo agente terapéutico. En algunos modos de realización, el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un agente citotóxico, un agente inhibidor del crecimiento, un agente de radioterapia, un agente antiangiogénico y combinaciones de los mismos. En otros modos de realización, el cáncer de vejiga es un cáncer de vejiga urotelial (CVU). En algunos modos de realización, el CVU es un cáncer de vejiga urotelial metastásico. En otros modos de realización, el CVU es un cáncer de vejiga urotelial localmente avanzado. En algunos modos de realización, el paciente ha progresado después del tratamiento con un agente quimioterápico derivado de platino (es decir, la

enfermedad del paciente (por ejemplo, CVU) ha progresado después del tratamiento anterior con un agente quimioterápico derivado de platino). Aún en otros modos de realización, la muestra tumoral es una muestra tumoral fijada con formol e incluida en parafina (FFIP), una muestra tumoral de archivo, una muestra tumoral fresca o una muestra tumoral congelada. En otros modos de realización, el nivel de expresión de PD-L1 es un nivel de expresión de proteínas. En algunos modos de realización, el nivel de expresión de proteínas de PD-L1 se determina usando un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en inmunohistoquímica (IHQ), inmunofluorescencia, citometría de flujo e inmunoelectrotransferencia. En algunos modos de realización, el nivel de expresión de proteínas de PD-L1 se determina usando IHQ. En otros modos de realización, el nivel de expresión de proteínas de PD-L1 se detecta usando un anticuerpo anti-PD-L1. Aún en otros modos de realización, el nivel de expresión de PD-L1 es un nivel de expresión de ARNm. En algunos modos de realización, el nivel de expresión de ARNm de PD-L1 se determina usando un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), qPCR con transcripción inversa (RT-qPCR), secuenciación de ARN, análisis de micromatrices, hibridación *in situ* y análisis en serie de la expresión génica (SAGE).

En otro aspecto, la invención presenta una composición que comprende una cantidad eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-L1 para su uso en un procedimiento para tratar a un paciente que padece un cáncer de vejiga, en la que se ha determinado que una muestra tumoral obtenida del paciente tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 1 % o más, un 5 % o más o un 10 % o más de la muestra tumoral, en la que se ha determinado que la muestra tumoral obtenida del paciente es un tumor de subtipo luminal.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1A es una tabla que muestra la prevalencia de la expresión de PD-L1 en las puntuaciones de CI indicadas en CVU. Los resultados se basan en la tinción de tejido tumoral de archivo de pacientes cribados previamente en un ensayo clínico en fase Ia en curso (véase el Ejemplo 2).

La Figura 1B es una imagen que muestra la expresión de PD-L1 en células inmunitarias (CI) infiltrantes de tumor evaluada mediante inmunohistoquímica usando un anticuerpo monoclonal de conejo anti-PD-L1. La tinción de PD-L1 se muestra en marrón oscuro.

La Figura 2 es una tabla que muestra que la expresión de PD-L1 en las CI se asocia con la respuesta de pacientes con CVU al tratamiento con atezolizumab (MPDL3280A). La tasa de respuesta objetiva (TRO), las respuestas completas (RC) y las respuestas parciales (RP) se muestran para los pacientes con la puntuación de CI indicada. Pacientes evaluables para eficacia con enfermedad medible al inicio del estudio según RECIST v1.1. 4 pacientes con CI2/3 y 7 pacientes con CI0/1 no constaban o no eran evaluables.

La Figura 3 es un gráfico que muestra la respuesta de los pacientes con CVU al tratamiento con atezolizumab (MPDL3280A). Se indica la puntuación de CI de los pacientes. SDML, suma del diámetro más largo, de las lesiones diana. No se incluyeron siete pacientes sin evaluaciones tumorales posteriores al inicio del estudio. Los asteriscos indican 9 pacientes con RC que no habían sido confirmados en la fecha de cierre de los datos, 7 de los cuales tuvieron una reducción de <100 % debido a las lesiones diana de los ganglios linfáticos. Todos los ganglios linfáticos volvieron a su tamaño normal según RECIST v1.1. *Cambio en SDML >100 %.

La Figura 4 es un gráfico que muestra la duración del tratamiento y la respuesta en pacientes con CVU tratados con atezolizumab (MPDL3280A). Los marcadores para la interrupción y el estado de respuesta activa no tienen implicación en la cronología.

La Figura 5A es una tabla que muestra la asociación entre la expresión de PD-L1 en CI y la supervivencia en pacientes con CVU tratados con atezolizumab (MPDL3280A). El gráfico muestra la mediana y los valores a 1 año de la supervivencia sin progresión (SSP) y la supervivencia global (SG) para pacientes con CVU con CI2/3 y CI0/1 tratados con atezolizumab (MPDL3280A).

La Figura 5B es un gráfico que muestra la SG para pacientes con CVU con CI2/3 y CI0/1 tratados con atezolizumab (MPDL3280A).

La Figura 6 es una serie de gráficos que muestran una asociación entre el nivel de expresión de la firma del gen inmunobloqueante (CTLA4, BTLA, LAG3, HAVCR2, PD1) o CTLA4 en leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) y la respuesta durante el tratamiento con atezolizumab de pacientes con CVU. C, ciclo; D, día.

La Figura 7 es un diagrama esquemático del diseño general del ensayo de fase II. El tejido tumoral evaluable para las pruebas de PD-L1 se evaluó prospectivamente en un laboratorio central. Los pacientes e investigadores no conocían el estado IHQ de PD-L1.

La Figura 8 es una visión general de la cohorte incluida en el ensayo de fase II. El grupo excluido incluye pacientes que se han vuelto a cribar. El grupo de tratamiento está compuesto por 311 pacientes y el grupo evaluable para

eficacia está compuesto por 310 pacientes. Se retiró un paciente del grupo de tratamiento debido a que su muestra tumoral provenía de un sitio desconocido.

La Figura 9A es un gráfico que representa el cambio en la suma de los diámetros más grandes de tumores desde el valor de referencia a lo largo del tiempo en pacientes con CI2/3 que demostraron una respuesta parcial o completa a atezolizumab (MPDL3280A).

La Figura 9B es un gráfico que representa el cambio en la suma de los diámetros más grandes de tumores desde el valor de referencia a lo largo del tiempo en pacientes con CI2/3 con enfermedad estable tratados con atezolizumab (MPDL3280A).

La Figura 9C es un gráfico que representa el cambio en la suma de los diámetros más grandes de tumores desde el valor de referencia a lo largo del tiempo en pacientes con CI2/3 con enfermedad progresiva tratados con atezolizumab (MPDL3280A).

La Figura 9D es un gráfico que representa la supervivencia global de los pacientes con CI0, CI1 y CI2/3.

La Figura 10A es un gráfico que representa el cambio en la suma de los diámetros más largos de tumores desde el valor de referencia en pacientes con CI0 con respuesta al tratamiento con atezolizumab. Líneas discontinuas verdes = RP/RC (n = 8).

La Figura 10B es un gráfico que representa el cambio en la suma de los diámetros más largos de tumores desde el valor de referencia en pacientes con CI0 con enfermedad estable tratados con atezolizumab. Líneas discontinuas azules = EE (n = 25).

La Figura 10C es un gráfico que representa el cambio en la suma de los diámetros más largos de tumores desde el valor de referencia en pacientes con CI0 con enfermedad progresiva tratados con atezolizumab. Líneas rojas = EP (n = 52).

La Figura 10D es un gráfico que representa el cambio en la suma de los diámetros más largos de tumores desde el valor de referencia en pacientes con CI1 con respuesta al tratamiento con atezolizumab. Líneas discontinuas verdes = RP/RC (n = 11).

La Figura 10E es un gráfico que representa el cambio en la suma de los diámetros más largos de tumores desde el valor de referencia en pacientes con CI1 con enfermedad estable tratados con atezolizumab. Líneas discontinuas azules = EE (n = 18).

La Figura 10F es un gráfico que representa el cambio en la suma de los diámetros más largos de tumores desde el valor de referencia en pacientes con CI1 con enfermedad progresiva tratados con atezolizumab. Líneas rojas = EP (n = 61).

La Figura 11A es un gráfico que representa el cambio en la suma de los diámetros más largos de tumores a lo largo del tiempo para la mejor respuesta en pacientes con CI0 tratados más allá de la progresión con atezolizumab. Líneas grises medias = ≤ -30 (n = 2), líneas negras = > -30 y ≤ 20 (n = 8), líneas grises claras = > 20 (n = 17).

La Figura 11B es un gráfico que representa el cambio en la suma de los diámetros más largos de tumores a lo largo del tiempo para la mejor respuesta en pacientes con CI1 tratados más allá de la progresión con atezolizumab. Líneas grises medias = ≤ -30 (n = 8), líneas negras = > -30 y ≤ 20 (n = 10), líneas grises claras = > 20 (n = 14).

La Figura 11C es un gráfico que representa el cambio en la suma de los diámetros más largos de tumores a lo largo del tiempo para la mejor respuesta en pacientes con CI2/3 tratados más allá de la progresión con atezolizumab. Líneas grises medias = ≤ -30 (n = 10), líneas negras = > -30 y ≤ 20 (n = 15), líneas grises claras = > 20 (n = 11).

La Figura 12A es un gráfico que representa la asociación entre la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 (por ejemplo, puntuación de CI) y genes de un conjunto de linfocitos CD8 efectores (por ejemplo, CXCL9 y CXCL10).

La Figura 12B es un gráfico que representa la asociación entre la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 (por ejemplo, puntuación de CI) y genes de un conjunto de linfocitos CD8 efectores (por ejemplo, CXCL9 y CXCL10).

La Figura 12C es un gráfico que representa la asociación entre la infiltración de CD8 y la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 (por ejemplo, puntuación de CI).

La Figura 12D es un gráfico que representa la asociación entre la infiltración de CD8 y la respuesta.

La Figura 12E es un gráfico que representa la asociación entre la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en células inmunitarias (CI) infiltrantes de tumor y el subtipo tumoral.

La Figura 12F es un gráfico que representa la asociación entre la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en células tumorales (CT) y el subtipo de tumor.

5 La Figura 12G es un gráfico que representa la asociación entre el subtipo de tumor y la respuesta.

La Figura 13A es un gráfico que representa la asociación entre un conjunto completo de genes de linfocitos T CD8 efectores (por ejemplo, CD8A, GZMA, GZMB, IFNG, CXCL9, CXCL10, PRF1, TBX21) y el estado inmunohistoquímico de PD-L1 en CI.

10 La Figura 13B es un gráfico que representa la asociación entre un conjunto completo de genes de linfocitos T CD8 efectores (por ejemplo, CD8A, GZMA, GZMB, IFNG, CXCL9, CXCL10, PRF1, TBX21) y la respuesta del paciente.

15 La Figura 14 es una matriz cromática que representa la relación entre el subtipo molecular inferido, la respuesta, la puntuación de CI y CT y la expresión génica para dos conjuntos de genes: (i) genes usados para asignar el subtipo de TCGA (The Cancer Genome Atlas) y (ii) genes asociados comúnmente con la actividad de linfocitos T CD8 efectores.

20 La Figura 15 es un diagrama que representa la relación entre las regresiones logísticas que se ajustan a la respuesta (RC/RP frente a EE/EP) en uno o más biomarcadores: puntuación de CI por IHQ de PD-L1 (CI0/1 frente a CI2/3) y el subtipo de expresión génica del TCGA.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 I. Introducción

La divulgación proporciona procedimientos y composiciones terapéuticos y de diagnóstico para el cáncer, por ejemplo, cáncer de vejiga (por ejemplo, cáncer de vejiga urotelial, CVU). La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que la determinación de los niveles de expresión de biomarcadores, por ejemplo, PD-L1 y/o subtipo de tumor, en muestras obtenidas de un paciente es útil en el tratamiento de un paciente que padece cáncer, para diagnosticar a un paciente que padece cáncer, para determinar si es probable que un paciente que tiene cáncer responda al tratamiento con un tratamiento antineoplásico que incluye un antagonista de unión al eje de PD-L1 (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1, por ejemplo, atezolizumab (MPDL3280A)), para optimizar la eficacia terapéutica de un tratamiento antineoplásico que incluye un antagonista de unión al eje de PD-L1 (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1, por ejemplo, atezolizumab) y/o para seleccionar pacientes para un tratamiento antineoplásico que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1 (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1, por ejemplo, atezolizumab).

II. Definiciones

40 Se entiende que los aspectos y modos de realización descritos en el presente documento incluyen aspectos y modos de realización "que comprenden", "que consisten" y/o "que consisten esencialmente en". Como se usa en el presente documento, la forma singular "un", "un/a" y "el/la" incluye las referencias en plural a menos que se indique de otro modo.

45 El término "aproximadamente", como se usa en el presente documento, se refiere al intervalo de error habitual para el respectivo valor 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 se refieren a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, la descripción que hace referencia a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X".

50 Los términos "subtipo de tumor" o "subtipo de muestra tumoral" se refieren a las características moleculares intrínsecas (por ejemplo, ADN, ARN y/o niveles de expresión de proteínas (por ejemplo, perfil genómico)) de un tumor o cáncer. El subtipo particular de un tumor o cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga urotelial (tumor CVU)) se puede determinar mediante criterios histopatológicos o rasgos característicos moleculares asociados al subtipo (por ejemplo, expresión de uno o más biomarcadores (por ejemplo, genes particulares, ARN (por ejemplo, ARNm, microARN) o proteínas codificadas por dichos genes)) (véanse, por ejemplo, Cancer Genome Atlas Research Network Nature 507:315-22, 2014; Jiang *et al.*, Bioinformatics 23: 306-13, 2007; Dong *et al.*, Nat Med. 8:793-800, 2002).

60 La expresión "antagonista de unión al eje de PD-L1" se refiere a una molécula que inhibe la interacción de un compañero de unión al eje de PD-L1 con uno o más de sus compañeros de unión, para eliminar la disfunción de linfocitos T resultante de la señalización en el eje de señalización de PD-1, con la restauración o potenciación de la función de linfocitos T como resultado. Como se usa en el presente documento, un antagonista de unión al eje de PD-L1 incluye un antagonista de unión a PD-L1 y un antagonista de unión PD-1, así como moléculas que interfieren en la interacción entre PD-L1 y PD-1 (por ejemplo, fusión PD-L2-Fc).

65

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 falta 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 posterior 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 durante el 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 un ejemplo, el nivel de potenciación es al menos un 50 %, de forma alternativa, un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 120 %, 150 % o un 200 %. La manera de medir esta potenciación es conocida por un experto en la técnica.

La "inmunidad tumoral" se refiere al proceso en el que los tumores evaden el reconocimiento y la eliminación inmunitarios. Por tanto, como concepto terapéutico, se "trata" la inmunidad tumoral cuando se atenúa dicha evasión y el sistema inmunitario reconoce y ataca los tumores. Los ejemplos de reconocimiento tumoral incluyen unión a tumor, reducción del volumen tumoral y eliminación tumoral.

"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 por la respuesta inmunitaria. Los ejemplos de potenciación de la inmunogenicidad tumoral incluyen el tratamiento con un antagonista de unión al eje de PD-L1.

Como se usa en el presente documento, un "antagonista de unión a PD-L1" es una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L1 con bien uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-1 y/o B7-1. En algunos ejemplos, un antagonista de 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 unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1 y/o B7-1. En algunos ejemplos, los antagonistas de unión a PD-L1 incluyen anticuerpos anti-PD-L1 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos, antagonistas de moléculas pequeñas, antagonistas de polinucleótidos 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 un ejemplo, un antagonista de unión a PD-L1 reduce la señal negativa mediada por o a través de proteínas de la superficie celular expresadas en linfocitos T y otras células a través de PD-L1 o PD-1 para hacer que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional. En algunos ejemplos, un antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1. En un aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es YW243.55.S70, descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MDX-1105, descrito en el presente documento. En otro aspecto específico más, un anticuerpo anti-PD-L1 es atezolizumab (MPDL3280A), descrito en el presente documento. En otro aspecto específico más, un anticuerpo anti-PD-L1 es MEDI4736 (druvalumab), descrito en el presente documento. En otro aspecto específico más, un anticuerpo anti-PD-L1 es MSB0010718C (avelumab), descrito en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, un "antagonista de unión a PD-1" es una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-1 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-L1 y/o PD-L2. En algunos ejemplos, el antagonista de unión a PD-1 es una

molécula que inhibe la unión de PD-1 a sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L1 y/o PD-L2. Por ejemplo, los antagonistas de unión a PD-1 incluyen anticuerpos anti-PD-1 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, inmunoconjugados, proteínas de fusión, oligopéptidos, antagonistas de moléculas pequeñas, antagonistas de polinucleótidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-1 con PD-L1 y/o PD-L2. En un ejemplo, un antagonista de unión a PD-1 reduce la señal negativa mediada por o a través de proteínas de la superficie celular expresadas en linfocitos T y otras células a través de PD-1 o PD-L1 para hacer que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional. En algunos ejemplos, el antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1. En un aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es MDX-1106 (nivolumab), descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es MK-3475 (pembrolizumab), descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es CT-011 (pidilizumab), descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es MEDI-0680 (AMP-514), descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es PDR001, descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es REGN2810, descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es BGB-108, descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es AMP-224, descrito en el presente documento.

Los términos "ligando de muerte programada 1" y "PD-L1" se refieren en el presente documento a un polipéptido PD-L1 de secuencia natural, variantes del polipéptido y fragmentos de un polipéptido de secuencia natural y variantes del polipéptido (que se definen además en el presente documento). El polipéptido PD-L1 descrito en el presente documento puede ser el que se aísla de una variedad de fuentes, tales como de tipos de tejido humano o de otra fuente, o se prepara por procedimientos recombinantes o sintéticos.

Un "polipéptido PD-L1 de secuencia natural" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido PD-L1 correspondiente derivado de la naturaleza.

Una "variante del polipéptido PD-L1", o variaciones del mismo, quiere decir un polipéptido PD-L1, en general un polipéptido PD-L1 activo, como se define en el presente documento, que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con cualquiera de las secuencias del polipéptido PD-L1 de secuencia natural como se divulga en el presente documento. Dichas variantes del polipéptido PD-L1 incluyen, por ejemplo, polipéptidos PD-L1 en los que uno o más residuos de aminoácidos se añaden o se delecionan en el extremo N o C de una secuencia de aminoácidos natural. Habitualmente, una variante del polipéptido PD-L1 tendrá al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, de forma alternativa, al menos aproximadamente un 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos, con una secuencia del polipéptido PD-L1 de secuencia natural como se divulga en el presente documento. Habitualmente, las variantes del polipéptido PD-L1 tienen al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, de forma alternativa, al menos aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288 o 289 aminoácidos de longitud, o más. Opcionalmente, las variantes del polipéptido PD-L1 no tendrán más de una sustitución aminoacídica conservadora en comparación con una secuencia del polipéptido PD-L1 natural, de forma alternativa, no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones aminoacídicas conservadoras en comparación con la secuencia del polipéptido PD-L1 natural.

"Polinucleótido" o "ácido nucleico", como se usan de manera intercambiable en el presente documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, bases o nucleótidos modificados y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se pueda incorporar en un polímero mediante ADN o ARN polimerasa, o mediante una reacción sintética. Por tanto, por ejemplo, los polinucleótidos como se definen en el presente documento, incluyen, sin limitación, ADN mono y bicatenario, ADN que incluye regiones mono y bicatenarias, ARN mono y bicatenario y ARN que incluye regiones mono y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarios o, más típicamente, bicatenarios o que incluyen regiones mono y bicatenarias. Además, el término "polinucleótido", como se usa en el presente documento, se refiere a regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Las cadenas en dichas regiones pueden proceder de la misma molécula o de moléculas diferentes. Las regiones pueden incluir todas de una o más de las moléculas, pero más típicamente implican solo una región de algunas de las moléculas. Una de las moléculas de una región triple helicoidal a menudo es un oligonucleótido. El término "polinucleótido" incluye específicamente ADNc.

Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si están presentes, se puede conferir una modificación a la estructura de los nucleótidos antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos se puede interrumpir por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido se puede modificar además después de la síntesis, tal como mediante conjugación con un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "caperuzas", sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales por un análogo, modificaciones internucleotídicas, tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos y similares) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforditioatos y similares), aquellas que contienen restos laterales, tales como, por ejemplo, proteínas

(por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina y similares), aquellas con intercalantes (por ejemplo, acridina, psoraleno y similares), aquellas que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos y similares), aquellas que contienen alquilantes, aquellas con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anómicos), así como formas no modificadas del/de los polinucleótido(s). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo presentes habitualmente en los glúcidos se puede reemplazar, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, proteger con grupos protectores estándar o activar para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales, o se puede conjugar con soportes sólidos o semisólidos. El OH 5' y 3' terminal se puede fosforilar o sustituir con aminos o restos del grupo de caperuza orgánico de desde 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también se pueden derivatizar a grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de los glúcidos ribosa o desoxirribosa que en general son conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de glúcidos carbocíclicos, glúcidos α -anómicos, glúcidos epiméricos tales como arabinosa, xilasas o lixosas, glúcidos de piranosa, glúcidos de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos nucleosídicos abásicos, tales como metil-ribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster se pueden reemplazar por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero no se limitan a, ejemplos en los que el fosfato se reemplaza por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en los que cada R o R' es independientemente H o alquilo (1-20 C) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No es necesario que todos los enlaces en un polinucleótido sean idénticos. Un polinucleótido puede contener uno o más tipos diferentes de modificaciones como se describe en el presente documento y/o múltiples modificaciones del mismo tipo. La descripción precedente se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en el presente documento, incluyendo ARN y ADN.

"Oligonucleótido", como se usa en el presente documento, en general se refiere a polinucleótidos monocatenarios cortos que tienen, pero no necesariamente, menos de aproximadamente 250 nucleótidos de longitud. Los oligonucleótidos pueden ser sintéticos. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no son mutuamente excluyentes. La descripción anterior para polinucleótidos es igual y completamente aplicable a oligonucleótidos.

El término "cebador" se refiere a un polinucleótido monocatenario que se puede hibridar a un ácido nucleico y permitir la polimerización de un ácido nucleico complementario, en general proporcionando un grupo 3'-OH libre.

El término "molécula pequeña" se refiere a cualquier molécula con un peso molecular de aproximadamente 2000 daltons o menos, preferentemente, de aproximadamente 500 daltons o menos.

Los términos "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas" que incluyen la célula transformada primaria y la descendencia derivada de la misma independientemente del número de pases. La descendencia puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula original, pero puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento.

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al que se enlaza. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. Determinados vectores pueden dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que se enlazan funcionalmente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que contienen habitualmente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente de forma extracromosómica o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten la actividad de unión a antígeno 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 y/o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En algunos ejemplos, 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 algunos ejemplos, 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 vaso giratorio o (3) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando, por ejemplo, tinción con azul de Coomassie o con plata. El 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 separados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (VL) en un extremo 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 de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada.

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

La expresión "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 CH1, CH2 y CH3 (colectivamente, 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 "VH". El dominio variable de la cadena ligera se puede denominar "VL". 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 extensamente en las secuencias 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.

El término "región hipervariable", "HVR" o "HV", como 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).

Varias delineaciones 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 usadas más comúnmente (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 AcM 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 AcM 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	AcM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55

<i>Bucle</i>	<i>Kabat</i>	<i>AcM</i>	<i>Chothia</i>	<i>Contacto</i>
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.

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

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

20 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.

30 Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, 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.

35 Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una parte de un anticuerpo intacto, que comprende preferentemente la región de unión a antígeno del mismo. En algunos ejemplos, 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; dímeros; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

40 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.

45 "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión a antígeno completo. En un ejemplo, 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 monocaténario (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 interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, 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.

55 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 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 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 única cadena polipeptídica. En general, el polipéptido scFv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite 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), páginas 269-315.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Al usar un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear 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).

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: 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 anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

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 que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de distintos anticuerpos. En determinados ejemplos, 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 esta divulgación. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), 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 en tanto que no están contaminadas típicamente por otras inmunoglobulinas.

El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la divulgación 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, N.Y., 1981)), procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.816.567), tecnología de expresión 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 los humanos en animales que tienen partes o todo de los locus de inmunoglobulina o genes que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, los documentos WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); las patentes de EE. UU. n.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14:845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14:826 (1996) y Lonberg *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 (véase, por ejemplo, la 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 PRIMATIZED® 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.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde con la de un anticuerpo producido por un humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente a un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácidos de HVR no humanas y residuos de aminoácidos de regiones estructurales (FR) humanas. En determinados ejemplos, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, las CDR) se corresponden con las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las FR se corresponden con las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender al menos una parte de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización.

Las expresiones "anticuerpo anti-PD-L1" y "un anticuerpo que se une a PD-L1" se refieren a un anticuerpo que se puede unir a PD-L1 con una afinidad suficiente, de modo que el anticuerpo sea útil como agente diagnóstico y/o terapéutico al dirigirse a PD-L1. En un ejemplo, el grado de unión de un anticuerpo anti-PD-L1 a una proteína distinta de PD-L1 no relacionada es inferior a aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo a PD-L1 como se mide, por ejemplo, mediante un radioinmunoanálisis (RIA). En determinados ejemplos, un anticuerpo anti-PD-L1 se une a un epítipo de PD-L1 que se conserva entre PD-L1 de diferentes especies.

Las expresiones "anticuerpo anti-PD-1" y "un anticuerpo que se une a PD-1" se refieren a un anticuerpo que se puede unir a PD-1 con una afinidad suficiente, de modo que el anticuerpo sea útil como agente diagnóstico y/o terapéutico al dirigirse a PD-1. En un ejemplo, el grado de unión de un anticuerpo anti-PD-1 a una proteína distinta de PD-1 no relacionada es inferior a aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo a PD-1 como se mide, por ejemplo, mediante un radioinmunoanálisis (RIA). En determinados ejemplos, un anticuerpo anti-PD-1 se une a un epítipo de PD-1 que se conserva entre PD-1 de diferentes especies.

Un anticuerpo "bloqueante" o un anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Los anticuerpos bloqueantes o los anticuerpos antagonistas preferentes inhiben de forma sustancial o completa la actividad biológica del antígeno.

La "afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y se puede representar en general por la constante de disociación (K_d). Se puede medir la afinidad por procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. En lo que sigue, se describen ejemplos ilustrativos y ejemplares específicos para medir la afinidad de unión.

Como se usa en el presente documento, la expresión "se une", "se une específicamente a" o "es específico para" se refiere a interacciones medibles y reproducibles, tales como la unión entre una diana y un anticuerpo, lo 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 a 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 un ejemplo, 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 determinados ejemplos, un anticuerpo que se une específicamente a una diana tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ o $\leq 0,1 \text{ nM}$. En determinados ejemplos, un anticuerpo se une específicamente a un epítipo en una proteína que se conserva entre la proteína de diferentes especies. En otro ejemplo, la unión específica puede incluir, pero no requiere, una unión exclusiva.

Un anticuerpo "madurado en afinidad" se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVR), en comparación con un anticuerpo original que no posee dichas alteraciones, dando como resultado dichas alteraciones una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

Un "anticuerpo que se une al mismo epítipo" que un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competencia en un 50 % o más y, a la inversa, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competencia en un 50 % o más.

Un "inmunoconjugado" es un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterólogas, incluyendo, pero sin limitarse a, un agente citotóxico.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunoadhesina" designa moléculas similares a anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta del sitio de reconocimiento y unión a antígeno de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina es típicamente una secuencia de aminoácidos contiguos que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina se puede obtener a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG1, IgG2 (incluyendo IgG2A e IgG2B), IgG3 o IgG4, IgA (incluyendo IgA1 e IgA2), IgE, IgD o IgM. Las fusiones de Ig incluyen preferentemente la sustitución de un dominio de un polipéptido o anticuerpo descrito en el presente documento en lugar de al menos una región variable dentro de una molécula de Ig. En un ejemplo preferente en particular, la fusión de inmunoglobulina incluye las regiones bisagra, CH2 y CH3, o las regiones bisagra, CH1, CH2 y CH3, de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulina, véase también la patente de EE. UU. n.º 5.428.130. Por ejemplo, en el presente documento, las inmunoadhesinas útiles como medicamentos útiles para tratamiento incluyen polipéptidos que comprenden el dominio extracelular (ECD) o las partes de unión a PD-1 de PD-L1 o PD-L2 o las partes extracelulares o de unión a PD-L1 o PD-L2 de PD-1, fusionados a un dominio constante de una secuencia de inmunoglobulina, tal como un ECD-Fc de PD-L1, un ECD-Fc de PD-L2 y un ECD-Fc de PD-1, respectivamente. Las combinaciones de inmunoadhesinas de Fc y ECD de Ig de receptores de superficie celular a veces se denominan receptores solubles.

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

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias de polipéptidos identificadas en el presente documento se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos de una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos del polipéptido con el que se comparan, después de alinear las secuencias e introducir huecos, según sea necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Se puede lograr la alineación para los propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de diversos modos que están dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, usando un programa informático disponible públicamente, tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación de secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr una alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los propósitos del presente documento, se generan valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 se creó por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE. UU., Washington D.C., 20559, donde se ha registrado con el n.º de registro de derechos de autor de EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California. El programa ALIGN-2 se debería compilar para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Se establecen todos los parámetros de comparación de secuencias por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones donde se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada (que, de forma alternativa, se puede parafrasear como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula como sigue:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

donde X es el número de residuos de aminoácido puntuados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácido en B. Se apreciará que si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no igualará el %

de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se indique específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

5 El término "detección" incluye cualquier medio de detección, incluyendo detección directa e indirecta.

10 El término "biomarcador", como se usa en el presente documento, se refiere a un indicador, por ejemplo, predictivo, diagnóstico y/o pronóstico, que se puede detectar en una muestra, por ejemplo, PD-L1, FGFR3, miR-99a-5p, miR-100-5p, CDKN2A, KRT5, KRT6A, KRT14, EGFR, GATA3, FOXA1, UPK3A, miR-200a-3p, miR-200b-3p, E-cadherina, ERBB2 o ESR2. El biomarcador puede servir como indicador de un subtipo particular de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) caracterizado por determinados rasgos moleculares, patológicos, histológicos y/o clínicos. En algunos ejemplos, un biomarcador es un gen. Los biomarcadores incluyen, pero no se limitan a, polinucleótidos (por ejemplo, ADN y/o ARN), alteraciones del número de copias de polinucleótidos (por ejemplo, números de copias de ADN), polipéptidos, modificaciones de polipéptidos y polinucleótidos (por ejemplo, modificaciones postraduccionales), marcadores moleculares a base de glucolípidos y/o carbohidratos.

15 La "cantidad" o "nivel" de un biomarcador asociado con un incremento en el beneficio clínico para un individuo es un nivel detectable en una muestra biológica. Estos se pueden medir por procedimientos conocidos por un experto en la técnica y también se divulgan en el presente documento. La cantidad o nivel de expresión de un biomarcador evaluado se puede usar para determinar la respuesta al tratamiento.

20 En general, el término "nivel de expresión" se usa de manera intercambiable y se refiere en general a la cantidad de un biomarcador en una muestra biológica. "Expresión" en general se refiere al procedimiento por el que la información (por ejemplo, información codificada por genes y/o epigenética) se convierte en las estructuras presentes y en funcionamiento en la célula. Por lo tanto, como se usa en el presente documento, "expresión" se puede referir a transcripción en un polinucleótido, traducción en un polipéptido, o incluso modificaciones de polinucleótidos y/o polipéptidos (por ejemplo, modificación postraduccional de un polipéptido). Los fragmentos del polinucleótido transcrito, el polipéptido traducido, o las modificaciones de polinucleótidos y/o polipéptidos (por ejemplo, la modificación postraduccional de un polipéptido) también se considerarán expresados si se originan a partir de un transcrito generado por empalme alternativo o un transcrito degradado, o de un procesamiento postraduccional del polipéptido, por ejemplo, por proteólisis. Los "genes expresados" incluyen los que se transcriben en un polinucleótido como ARNm y a continuación se traducen en un polipéptido, y también los que se transcriben en ARN pero no se traducen en un polipéptido (por ejemplo, ARN de transferencia y ribosómicos).

30 "Expresión incrementada", "nivel de expresión incrementado", "niveles incrementados", "expresión elevada", "niveles de expresión elevados" o "niveles elevados" se refieren a una expresión incrementada o niveles incrementados de un biomarcador en un individuo en relación con un control, tal como un individuo o individuos que no padecen la enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) o un control interno (por ejemplo, un biomarcador constitutivo).

40 "Expresión disminuida", "nivel de expresión disminuido", "niveles disminuidos", "expresión reducida", "niveles de expresión reducidos" o "niveles reducidos" se refieren a una expresión disminuida o niveles disminuidos de un biomarcador en un individuo en relación con un control, tal como un individuo o individuos que no padecen la enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) o un control interno (por ejemplo, biomarcador constitutivo). En algunos ejemplos, la expresión reducida es poca o ninguna expresión.

45 El término "biomarcador constitutivo" se refiere a un biomarcador o grupo de biomarcadores (por ejemplo, polinucleótidos y/o polipéptidos) que típicamente están presentes de forma similar en todos los tipos de células. En algunos ejemplos, el biomarcador constitutivo es un "gen constitutivo". Un "gen constitutivo" se refiere en el presente documento a un gen o grupo de genes que codifican proteínas con actividades que son esenciales para el mantenimiento de la función celular y que típicamente están presentes de forma similar en todos los tipos de células.

50 "Amplificación", como se usa en el presente documento, en general se refiere al procedimiento de producir múltiples copias de una secuencia deseada. "Múltiples copias" quiere decir al menos dos copias. Una "copia" no quiere decir necesariamente una complementariedad o identidad de secuencia perfecta respecto a la secuencia molde. Por ejemplo, las copias pueden incluir análogos nucleotídicos tales como desoxiinosina, alteraciones de secuencia intencionadas (tales como alteraciones de secuencia introducidas a través de un cebador que comprende una secuencia que es hibridable, pero no complementaria, al molde) y/o errores de secuencia que se producen durante la amplificación.

60 La expresión "PCR múltiple" se refiere a una única reacción de PCR llevada a cabo en un ácido nucleico obtenido de una única fuente (por ejemplo, un individuo) usando más de un conjunto de cebadores con el propósito de amplificar dos o más secuencias de ADN en una única reacción.

65 La técnica de "reacción en cadena de la polimerasa" o "PCR", como se usa en el presente documento, en general se refiere a un procedimiento en el que se amplifican pequeñas cantidades de una porción específica de ácido nucleico, ARN y/o ADN, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 4.683.195. En general, es necesario que

la información de secuencia de los extremos de la región de interés o más allá esté disponible, de modo que se puedan diseñar cebadores oligonucleotídicos; estos cebadores serán idénticos o similares en secuencia a hebras opuestas del molde que se va a amplificar. Los nucleótidos 5' terminales de los dos cebadores pueden coincidir con los extremos del material amplificado. La PCR se puede usar para amplificar secuencias de ARN específicas, secuencias de ADN específicas de ADN genómico total y ADNc transcritas a partir de secuencias de ARN, bacteriófagos o plásmidos celulares totales, etc. Véase en general Mullis *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263 (1987) y Erlich, ed., *PCR Technology*, (Stockton Press, NY, 1989). Como se usa en el presente documento, se considera que la PCR es uno, pero no el único, ejemplo de un procedimiento de reacción de la ácido nucleico polimerasa para amplificar una muestra de prueba de ácido nucleico, que comprende el uso de un ácido nucleico conocido (ADN o ARN) como cebador y utiliza una ácido nucleico polimerasa para amplificar o generar una porción específica de ácido nucleico o para amplificar o generar una porción específica de ácido nucleico que es complementaria a un ácido nucleico particular.

"Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa" o "qRT-PCR" se refiere a una forma de PCR en la que la cantidad de producto de PCR se mide en cada etapa en una reacción de PCR. Esta técnica se ha descrito en varias publicaciones, incluyendo, por ejemplo, Cronin *et al.*, *Am. J. Pathol.* 164(1):35-42 (2004) y Ma *et al.*, *Cancer Cell* 5:607-616 (2004).

El término "micromatriz" se refiere a una disposición ordenada de elementos de matriz hibridables, preferentemente sondas de polinucleótidos, en un sustrato.

El término "diagnóstico" se usa en el presente documento para referirse a la identificación o clasificación de un estado, enfermedad o afección molecular o patológico (por ejemplo, cáncer). Por ejemplo, "diagnóstico" se puede referir a la identificación de un tipo particular de cáncer. "Diagnóstico" también se puede referir a la clasificación de un subtipo particular de cáncer, por ejemplo, por criterios histopatológicos o por rasgos moleculares (por ejemplo, un subtipo caracterizado por la expresión de un biomarcador o de una combinación de biomarcadores (por ejemplo, genes o proteínas particulares codificadas por dichos genes)).

La expresión "ayuda al diagnóstico" se usa en el presente documento para referirse a procedimientos que ayudan a realizar una determinación clínica con respecto a la presencia, o naturaleza, de un tipo particular de síntoma o afección de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer). Por ejemplo, un procedimiento de ayuda al diagnóstico de una enfermedad o afección (por ejemplo, cáncer) puede comprender medir determinados biomarcadores (por ejemplo, PD-L1) en una muestra biológica de un individuo.

El término "muestra", como se usa en el presente documento, se refiere a una composición que se obtiene o deriva de un sujeto y/o individuo de interés que contiene una entidad celular y/u otra entidad molecular que se debe caracterizar y/o identificar, por ejemplo, en base a características físicas, bioquímicas, químicas y/o fisiológicas. Por ejemplo, la expresión "muestra de enfermedad" y variaciones de la misma se refiere a cualquier muestra obtenida de un sujeto de interés que se esperaría o se sabe que contiene la entidad celular y/o molecular que se va a caracterizar. Las muestras incluyen, pero no se limitan a, muestras tisulares, líneas celulares o células primarias o cultivadas, sobrenadantes celulares, lisados celulares, plaquetas, suero, plasma, humor vítreo, líquido linfático, líquido sinovial, líquido folicular, semen, líquido amniótico, leche, sangre completa, células derivadas de sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, saliva, esputo, lágrimas, sudor, moco, lisados tumorales y medio de cultivo tisular, extractos tisulares tales como tejido homogeneizado, tejido tumoral, extractos celulares y combinaciones de los mismos.

Por "muestra tisular" o "muestra celular" se quiere decir una obtención de células similares obtenidas de un tejido de un sujeto o individuo. La fuente de la muestra tisular o celular puede ser tejido sólido como el de un órgano fresco, congelado y/o conservado, muestra tisular, biopsia y/o aspirado; sangre o cualquier componente sanguíneo tal como plasma; líquidos corporales tales como líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, líquido peritoneal o líquido intersticial; células en cualquier fase de gestación o desarrollo del sujeto. La muestra tisular también puede ser líneas celulares o células primarias o cultivadas. Opcionalmente, la muestra tisular o celular se obtiene de un tejido/órgano de enfermedad. Por ejemplo, una "muestra tumoral" es una muestra tisular obtenida de un tumor u otro tejido canceroso. La muestra tisular puede contener una población mixta de tipos celulares (por ejemplo, células tumorales y células no tumorales, células cancerosas y células no cancerosas). La muestra tisular puede contener compuestos que no se mezclen de forma natural con el tejido en la naturaleza, tales como conservantes, anticoagulantes, tampones, fijadores, nutrientes, antibióticos o similares.

Una "célula inmunitaria infiltrante de tumor", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier célula inmunitaria presente en un tumor o una muestra del mismo. Las células inmunitarias infiltrantes de tumor incluyen, pero no se limitan a, células inmunitarias intratumorales, células inmunitarias peritumorales u otras células estromales tumorales (por ejemplo, fibroblastos) o cualquier combinación de las mismas. Dichas células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden ser, por ejemplo, linfocitos T (tales como linfocitos T CD8+ y/o linfocitos T CD4+), linfocitos B u otras células de linaje de médula ósea, incluyendo granulocitos (por ejemplo, neutrófilos, eosinófilos y basófilos), monocitos, macrófagos, células dendríticas (por ejemplo, células dendríticas interdigitantes), histiocitos y linfocitos citolíticos naturales.

Una "célula tumoral", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier célula tumoral presente en un tumor o una muestra del mismo. Las células tumorales se pueden distinguir de otras células que pueden estar presentes en una muestra tumoral, por ejemplo, células estromales y células inmunitarias infiltrantes de tumor, usando procedimientos conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento.

Una "muestra de referencia", "célula de referencia", "tejido de referencia", "muestra de control", "célula de control" o "tejido de control", como se usa en el presente documento, se refiere a una muestra, célula, tejido, estándar o nivel que se usa con propósitos de comparación. En un ejemplo, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control se obtiene de una parte sana y/o no enferma del cuerpo (por ejemplo, tejido o células) del mismo sujeto o individuo. Por ejemplo, la muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control puede ser células sanas y/o no enfermas o tejido contiguo a las células o tejido enfermo (por ejemplo, células o tejido contiguo a un tumor). En otro ejemplo, una muestra de referencia se obtiene de un tejido y/o célula no tratados del cuerpo del mismo sujeto o individuo. Aún en otro ejemplo, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control se obtiene de una parte sana y/o no enferma del cuerpo (por ejemplo, tejidos o células) de un individuo que no es el sujeto o individuo. Incluso en otro ejemplo, una muestra de referencia, una célula de referencia, un tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control se obtiene de un tejido y/o célula no tratados del cuerpo de un individuo que no es el sujeto o individuo.

Para los propósitos del presente documento, una "sección" de una muestra tisular se refiere a una parte o porción única de una muestra tisular, por ejemplo, un corte delgado de tejido o células cortadas de una muestra tisular (por ejemplo, una muestra tumoral). Se entenderá que se pueden tomar múltiples secciones de muestras tisulares y someterlas a análisis, siempre que se entienda que la misma sección de muestra tisular se puede analizar a nivel tanto morfológico como molecular, o analizar con respecto a polipéptidos (por ejemplo, por inmunohistoquímica) y/o polinucleótidos (por ejemplo, por hibridación *in situ*).

Por "correlacionar" o "correlación" se quiere decir comparar, de cualquier forma, el rendimiento y/o los resultados de un primer análisis o protocolo con el rendimiento y/o los resultados de un segundo análisis o protocolo. Por ejemplo, se pueden usar los resultados de un primer análisis o protocolo para llevar a cabo un segundo protocolo y/o se pueden usar los resultados de un primer análisis o protocolo para determinar si se debe realizar un segundo análisis o protocolo. Con respecto al ejemplo del protocolo o análisis polipeptídico, se pueden usar los resultados del protocolo o análisis de expresión polipeptídica para determinar si se debe realizar una pauta terapéutica específica. Con respecto al ejemplo del protocolo o análisis polinucleotídico, se pueden usar los resultados del protocolo o análisis de expresión polinucleotídica para determinar si se debe realizar una pauta terapéutica específica.

La "respuesta individual" o "respuesta" se puede evaluar usando cualquier criterio de valoración que indique un beneficio para el individuo, incluyendo, sin limitación, (1) inhibición, en cierto grado, de la progresión de la enfermedad (por ejemplo, progresión del cáncer), incluyendo ralentización o interrupción completa; (2) una reducción en el tamaño tumoral; (3) inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención completa) de la infiltración de células cancerosas en órganos y/o tejidos periféricos contiguos; (4) inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención completa) de metástasis; (5) alivio, en cierto grado, de uno o más síntomas asociados con la enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer); (6) incremento o prolongación en la duración de la supervivencia, incluyendo supervivencia global y supervivencia sin progresión; y/o (7) disminución en la mortalidad en un momento dado después del tratamiento.

Una "respuesta eficaz" de un paciente o la "reactividad" de un paciente al tratamiento con un medicamento y redacción similar se refiere al beneficio clínico o terapéutico impartido a un paciente en riesgo de padecer, o que padece, una enfermedad o trastorno, tal como cáncer. En un ejemplo, dicho beneficio incluye uno cualquiera o más de: prolongar la supervivencia (incluyendo supervivencia global y/o supervivencia sin progresión); lo que da como resultado una respuesta objetiva (incluyendo una respuesta completa o una respuesta parcial) o mejorar los signos o síntomas de cáncer. En un ejemplo, el biomarcador (por ejemplo, expresión de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor, por ejemplo, como se determina usando IHQ) se usa para identificar al paciente que se predice que tiene un incremento en la probabilidad de ser sensible al tratamiento con un medicamento (por ejemplo, un tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1), en relación con un paciente que no expresa el biomarcador. En un ejemplo, el biomarcador (por ejemplo, expresión de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor, por ejemplo, como se determina usando IHQ) se usa para identificar al paciente que se predice que tiene un incremento en la probabilidad de ser sensible al tratamiento con un medicamento (por ejemplo, anticuerpo anti-PD-L1), en relación con un paciente que no expresa el biomarcador al mismo nivel. En un ejemplo, la presencia del biomarcador se usa para identificar a un paciente que es más probable que responda al tratamiento con un medicamento, en relación con un paciente en el que el biomarcador no está presente. En otro ejemplo, la presencia del biomarcador se usa para determinar que un paciente tendrá un incremento en la probabilidad de beneficiarse del tratamiento con un medicamento, en relación con un paciente en el que el biomarcador no está presente.

Una "respuesta objetiva" se refiere a una respuesta medible, incluyendo la respuesta completa (RC) o la respuesta parcial (RP). En algunos ejemplos, la "tasa de respuesta objetiva" (TRO) se refiere a la suma de la tasa de respuesta completa (RC) y la tasa de respuesta parcial (RP).

Por "respuesta completa" o "RC" se entiende la desaparición de todos los signos de cáncer (por ejemplo, desaparición de todas las lesiones diana) en respuesta al tratamiento. Esto no siempre quiere decir que el cáncer se haya curado.

- 5 "Respuesta mantenida" se refiere al efecto mantenido en la reducción del crecimiento tumoral después de la interrupción de un tratamiento. Por ejemplo, el tamaño tumoral puede tener el mismo tamaño o más pequeño en comparación con el tamaño al comienzo de la fase de administración del medicamento. En algunos ejemplos, 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 o mayor.
- 10 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, la metástasis del cáncer.
- 15 Como se usa en el presente documento, "respuesta parcial" o "RP" se refiere a una disminución del tamaño de uno o más tumores o lesiones, o de la extensión del cáncer en el cuerpo, en respuesta al tratamiento. Por ejemplo, en algunos ejemplos RP se refiere a al menos una disminución de un 30 % en la suma de los diámetros más largos (SDML) de las lesiones diana, tomando como referencia la SDML al inicio del estudio.
- 20 Como se usa en el presente documento, "enfermedad estable" o "EE" se refiere tanto a una reducción insuficiente de las lesiones diana para considerar que hay RP como a un incremento insuficiente para considerar que hay EP, tomando como referencia la SDML más pequeña desde que comenzó el tratamiento.
- 25 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.
- El término "supervivencia" se refiere a que el paciente permanezca con vida e incluye la supervivencia global, así como la supervivencia sin progresión.
- 30 Como se usa en el presente documento, "supervivencia sin progresión" (SSP) se refiere a la cantidad de tiempo durante y después del tratamiento durante la que la enfermedad que se está tratando (por ejemplo, cáncer) no empeora. La supervivencia sin progresión puede incluir la cantidad de tiempo en la que los pacientes han experimentado una respuesta completa o una respuesta parcial, así como la cantidad de tiempo en la que los pacientes han experimentado una enfermedad estable.
- 35 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 periodo de tiempo particular.
- 40 Por "prolongación de la supervivencia" se quiere decir el incremento de la supervivencia global o sin progresión en un paciente tratado en relación con un paciente no tratado (es decir, en relación con un paciente no tratado con el medicamento), o en relación con un paciente que no expresa un biomarcador en el nivel designado y/o en relación con un paciente tratado con un agente antitumoral.
- 45 El término "sustancialmente el mismo", como se usa en el presente documento, indica un grado suficientemente alto de similitud entre dos valores numéricos, de modo que un experto en la técnica consideraría que la diferencia entre los dos valores es de poca o ninguna significación estadística y/o biológica dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de Kd o niveles de expresión). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, menor que aproximadamente un 50 %, menor que aproximadamente un 40 %, menor que aproximadamente un 30 %, menor que aproximadamente un 20 % y/o menor que aproximadamente un 10 % como función del valor del anticuerpo de referencia/comparador.
- 50 La expresión "sustancialmente diferente", como se usa en el presente documento, indica un grado suficientemente alto de diferencia entre dos valores numéricos, de modo que un experto en la técnica consideraría que la diferencia entre los dos valores es de significación estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de Kd o niveles de expresión). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, mayor que aproximadamente un 10 %, mayor que aproximadamente un 20 %, mayor que aproximadamente un 30 %, mayor que aproximadamente un 40 % y/o mayor que aproximadamente un 50 % como función del valor para la molécula de referencia/comparadora.
- 55 La palabra "marcador", cuando se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o composición que se conjuga o fusiona directa o indirectamente con un reactivo tal como una sonda de polinucleótidos o un anticuerpo y facilita la detección del reactivo con el que se conjuga o fusiona. El marcador en sí mismo puede ser detectable (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable. El término pretende englobar el marcado directo de una sonda o anticuerpo mediante el acoplamiento (es decir, la unión física) de una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como el marcado indirecto de la sonda o anticuerpo por reactividad
- 60
- 65

con otro reactivo que se marca directamente. Los ejemplos de marcado indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia y el marcado de extremos de una sonda de ADN con biotina de modo que se pueda detectar con estreptavidina marcada con fluorescencia.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un agente terapéutico para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso de cánceres, la cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor primario; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y preferentemente 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. En la medida en que el fármaco pueda prevenir el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para el tratamiento del cáncer, la eficacia *in vivo* se puede medir, por ejemplo, evaluando la duración de la supervivencia, tiempo transcurrido hasta la progresión de la enfermedad (TTP), tasas de respuesta (por ejemplo, RC o RP), duración de la respuesta y/o calidad de vida.

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 "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección fisiológica en los mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. En esta definición se incluyen cánceres benignos y malignos. Por "cáncer en estadio precoz" o "tumor en estadio precoz" se quiere decir un cáncer que no es invasivo ni metastásico o se clasifica como un cáncer en estadio 0, 1 o 2. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma (incluyendo meduloblastoma y retinoblastoma), sarcoma (incluyendo liposarcoma y sarcoma de células sinoviales), tumores neuroendocrinos (incluyendo tumores carcinoides, gastrinoma e insulinooma), mesotelioma, schwannoma (incluyendo neurinoma del estadoacústico), meningioma, adenocarcinoma, melanoma y leucemia o neoplasias linfoides. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de vejiga (por ejemplo, cáncer de vejiga urotelial (por ejemplo, carcinoma de células de transición o urotelial, cáncer de vejiga invasivo no muscular, cáncer de vejiga invasivo muscular y cáncer de vejiga metastásico) y cáncer de vejiga no urotelial), carcinoma de células escamosas (por ejemplo, carcinoma de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón, incluyendo carcinoma de pulmón microcítico (CPM), carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM), adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, hepatoma, cáncer de mama (incluyendo cáncer de mama metastásico), cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o útero, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer renal o de riñón, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, cáncer de células de Merkel, micosis fungoide, cáncer testicular, cáncer esofágico, tumores de las vías biliares, así como cáncer de cabeza y cuello y neoplasias hemáticas. En algunos ejemplos, el cáncer es cáncer de mama metastásico triple negativo, incluyendo cualquier adenocarcinoma triple negativo (ER-, PR-, HER2-) histológicamente confirmado de la mama con enfermedad localmente recidivante o metastásica (donde la enfermedad localmente recidivante no es susceptible a resección con intención curativa). En algunos ejemplos, el cáncer es cáncer de vejiga. En ejemplos particulares, el cáncer de vejiga es cáncer de vejiga urotelial.

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" y "tumor" no son mutuamente excluyentes como se hace referencia en el presente documento.

La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma para que sea eficaz, y que no contiene ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al que se administrará la formulación.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo, tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural del individuo al que se está tratando, y que se puede realizar para la profilaxis o bien durante la evolución de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de la metástasis, disminución de la velocidad de progresión de la enfermedad, mejora o atenuación del estado de la enfermedad y remisión o mejora del pronóstico. En algunos ejemplos, los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti-PD-L1 y/o anticuerpos anti-PD-1) se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

El término "tratamiento antineoplásico" se refiere a un tratamiento útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes terapéuticos antineoplásicos incluyen, pero se limitan a, por ejemplo, agentes citotóxicos, agentes quimioterápicos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes usados en radioterapia, agentes antiangiogénicos, agentes apoptóticos, agentes antitubulínicos y otros agentes para tratar el cáncer, por ejemplo, anticuerpos anti-CD20, inhibidores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (por ejemplo, GLEEVEC™ (mesilato de imatinib)), un inhibidor de la COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferones, citocinas, antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que se unen a una o más de las siguientes dianas: PDGFR- β , BlyS, APRIL, receptor(es) BCMA, TRAIL/Apo2 y otros agentes químicos bioactivos y orgánicos y similares. Las combinaciones de los mismos también se incluyen en la divulgación.

El término "agente citotóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de las células y/o provoca la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} y los isótopos radiactivos de Lu); agentes quimioterápicos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de las mismas tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas, y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos divulgados a continuación. Otros agentes citotóxicos se describen a continuación. Un agente tumoricida causa la destrucción de células tumorales.

Un "agente quimioterápico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclosfosfamida CYTOXAN®; sulfonatos de alquilo, tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas, tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahydrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colquicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán) (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (en particular, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas nitrogenadas, tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, uramustina; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos enediínicos (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina γ 11 y calicheamicina omega ω 11 (véase, por ejemplo, Nicolaou *et al.*, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos antibióticos de cromoproteína enediina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicina, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolinodoxorubicina, cianomorfolinodoxorubicina, 2-pirrolinodoxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, 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 dromoestanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antisuiprarrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; refuerzo de ácido fólico tal como ácido frofínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxidurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidracida; procarbazona; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2''-trichlorotrietilamina; tricotecenos (en especial, toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, taxanos incluyendo paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), formulación de paclitaxel en nanopartículas genomanipladas con albúmina libres de Cremophor ABRAXANE™ (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y doxetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; agentes quimioterápicos con platino o derivados del platino y análogos de platino tales como cisplatino, carboplatino, oxaliplatino (ELOXATIN™), satraplatino, picoplatino, nedaplatino, triplatino y lipoplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatraxato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina (XELODA®); sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores, así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, abreviatura de una politerapia de ciclofosfamida,

doxorubicina, vincristina y prednisolona, y FOLFOX, abreviatura de un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina. Los agentes quimioterápicos adicionales incluyen los agentes citotóxicos útiles como conjugados de fármacos de anticuerpos, tales como maytansinoides (DM1, por ejemplo) y las auristatinas MMAE y MMAF, por ejemplo.

Los "agentes quimioterápicos" también incluyen "agentes antihormonales" o "agentes terapéuticos endocrinos" que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer, y que a menudo están en forma de tratamientos sistémicos o de todo el organismo. Pueden ser las propias hormonas. Los ejemplos incluyen antiestrógenos y moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno EVISTA®, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON®; antiprogesteronas; reguladores por disminución del receptor de estrógenos (ERD); agentes que funcionan suprimiendo o paralizando los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) tales como acetato de leuprolida LUPRON® y ELIGARD®, acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterelina; otros antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIL®, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDEX®. Además, dicha definición de agentes quimioterápicos incluye 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®; así como troxacitabina (un análogo de 1,3-dioxolano nucleosídico de citosina); oligonucleótidos antisentido, en particular los que inhiben la expresión de genes en las vías de señalización implicadas en la proliferación celular anómala, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como vacuna THERATOPE® y vacunas de tratamiento génico, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; ditosilato de lapatinib (un inhibidor dual de molécula pequeña de las tirosina cinasas ErbB-2 y EGFR, también conocido como GW572016); y sales, ácidos o 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 anticuerpo-fármaco, gemtuzumab ozogamicina (MYLOTARG®, Wyeth). Los anticuerpos monoclonales humanizados adicionales con potencial terapéutico como agentes en combinación con los compuestos de la divulgación incluyen: apolizumab, aselizumab, atlizumab, bapineuzumab, bivatuzumab mertansina, cantuzumab mertansina, cedelizumab, certolizumab pegol, cidfusituzumab, cidtuzumab, daclizumab, eculizumab, efalizumab, epratuzumab, erlizumab, felvizumab, fontolizumab, gemtuzumab ozogamicina, inotuzumab ozogamicina, ipilimumab, labetuzumab, lintuzumab, matuzumab, mepolizumab, motavizumab, motovizumab, natalizumab, nimotuzumab, nolovizumab, numavizumab, ocrelizumab, omalizumab, palivizumab, pascolizumab, pecfusituzumab, pectuzumab, pexelizumab, ralivizumab, ranibizumab, reslivizumab, reslizumab, resyvizumab, rovelizumab, ruplizumab, sibrotuzumab, siplizumab, sontuzumab, tacatuzumab tetraxetano, tadocizumab, talizumab, tefibazumab, tocilizumab, toralizumab, tucotuzumab celmoleucina, tucusituzumab, umavizumab, urtoxazumab, ustekinumab, visilizumab, y el anti-interleucina 12 (ABT-874/J695, Wyeth Research and Abbott Laboratories), que es un anticuerpo IgG1 λ de longitud completa de secuencia exclusivamente humana recombinante genéticamente modificado para reconocer la proteína p40 de interleucina 12.

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 a EGFR. Los ejemplos de anticuerpos que se unen a EGFR incluyen AcM 579 (ATCC CRL HB 8506), AcM 455 (ATCC CRL HB8507), AcM 225 (ATCC CRL 8508), AcM 528 (ATCC CRL 8509) (véase la patente de EE. UU. n.º 4.943.533, Mendelsohn *et al.*) y variantes de los mismos, tales como 225 quimerizado (C225 o Cetuximab; ERBITUX®) y 225 humano (H225) remodelado (véase el documento WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, un anticuerpo dirigido a EGFR completamente humano (Imclone); anticuerpos que se unen a EGFR mutante de tipo II (patente de EE. UU. n.º 5.212.290); anticuerpos humanizados y quiméricos 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 WO98/50433, Abgenix/Amgen); EMD 55900 (Stragliotto *et al.*, *Eur. J. Cancer* 32A:636-640 (1996)); EMD7200 (matuzumab), un anticuerpo frente a EGFR humanizado dirigido frente a EGFR que compite tanto con EGF como con TGF- α por la unión a EGFR (EMD/Merck); anticuerpo frente a EGFR humano, HuMax-EGFR (GenMab); anticuerpos completamente 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 AcM 806 o AcM 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 659.439A2, Merck Patent GmbH). Los antagonistas del EGFR incluyen moléculas pequeñas tales como los compuestos descritos en las patentes de EE. UU. n.º 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-feniletíl)amino]-1H-pirrol[2,3-d]pirimidin-6-il]-fenol); (R)-6-(4-hidroxifenil)-4-[(1-feniletíl)amino]-7H-pirrol[2,3-d]pirimidina); CL-387785 (N-[4-[(3-bromofenil)amino]-6-quinazolinil]-2-butenamida); EKB-569 (N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolinil]-4-(dimetilamino)-2-butenamida) (Wyeth); AG1478 (Pfizer); AG1571 (SU 5271; Pfizer); e inhibidores dobles de tirosina cinasas EGFR/HER2 tales como lapatinib (TYKERB®, GSK572016 o N-[3-cloro-4-[(3-fluorofenil)metoxi]fenil]-6[[[(2-metilsulfonil)etil]amino]metil]-2-furanil]-4-quinazolinamina).

Los agentes quimioterápicos también incluyen "inhibidores de tirosina cinasa", incluyendo los fármacos dirigidos a EGFR indicados en el párrafo precedente; inhibidor de tirosina cinasa para HER2 de moléculas pequeñas, tal como TAK165, disponible de Takeda; CP-724.714, un inhibidor selectivo oral del receptor tirosina cinasa ErbB2 (Pfizer y OSI); inhibidores de HER dobles, tales como EKB-569 (disponible de Wyeth), que se une preferentemente a EGFR, pero inhibe las células que sobreexpresan tanto HER2 como EGFR; lapatinib (GSK572016; disponible de Glaxo-SmithKline), un inhibidor de tirosina cinasa oral para HER2 y EGFR; PKI-166 (disponible de Novartis); inhibidores de pan-HER, tales como canertinib (CI-1033; Pharmacia); inhibidores de Raf-1, tales como el agente antisentido ISIS-5132, disponible de ISIS Pharmaceuticals, que inhiben la señalización de Raf-1; inhibidores de TK no dirigidos a HER, tales como mesilato de imatinib (GLEEVEC®, disponible de Glaxo SmithKline); inhibidores de tirosina cinasa con múltiples dianas, tales como sunitinib (SUTENT®, disponible de Pfizer); inhibidores de tirosina cinasa para los receptores de VEGF, tales como vatalanib (PTK787/ZK222584, disponible de Novartis/Schering AG); inhibidor de cinasas I reguladas extracelularmente para MAPK CI-1040 (disponible de 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-pirrol[2,3-d]pirimidinas; curcumina (diferuloiimetano, 4,5-bis(4-fluoroanilino)ftalimida); tirfostinas que contienen restos nitrotiofeno; PD-0183805 (Warner-Lambert); moléculas antisentido (por ejemplo, las que se unen a ácido nucleico que codifica HER); quinoxalinas (patente de EE. UU. n.º 5.804.396); trifostinas (patente de EE. UU. n.º 5.804.396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); inhibidores de pan-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-1C11 (Imclone), rapamicina (sirólímus, RAPAMUNE®); o como se describe en cualquiera de las siguientes publicaciones de patente: la patente de EE. UU. n.º 5.804.396; los documentos WO 1999/09016 (American Cyanamid); WO 1998/43960 (American Cyanamid); WO 1997/38983 (Warner Lambert); WO 1999/06378 (Warner Lambert); WO 1999/06396 (Warner Lambert); WO 1996/30347 (Pfizer, Inc.); WO 1996/33978 (Zeneca); WO 1996/3397 (Zeneca) y 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 viva, bevacuzimab, bexaroteno, cladribina, clofarabina, darbeopetina alfa, denileucina, dexrazoxano, epoetina alfa, elotininb, filgrastim, acetato de histrelin, ibritumomab, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, lenalidomida, levamisol, mesna, metoxaleno, nandrolona, nelarabina, nofetumomab, oprelvecina, palifermina, pamidronato, pegademasa, pegaspargasa, pegfilgrastim, pemetrexed disódico, plicamicina, porfímero sódico, mepacrina, rasburicasa, sargramostim, temozolomida, VM-26, 6-TG, toremifeno, tretinoína, ATRA, valrubicina, zoledronato y ácido zoledrónico y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Los agentes quimioterápicos también incluyen hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, acetato de cortisona, pivalato de tixocortol, acetónido de triamcinolona, alcohol de triamcinolona, mometasona, amcinónida, budesónida, desónida, fluocinónida, 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, prednicarbo, 17-butilato de clobetasona, 17-propionato de clobetasol, caproato de fluocortolona, pivalato de fluocortolona y acetato de flupredniden; péptidos antiinflamatorios selectivos inmunitarios (AIS), tales como fenilalanina-glutamina-glicina (FEG) y su forma D-isómera (feG) (IMULAN BioTherapeutics, LLC); fármacos antirreumáticos, tales como azatioprina, ciclosporina (ciclosporina A), D-penicilamina, sales de oro, hidroxicloroquina, leflunomideminciclina, 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 interleucina 6 (IL-6), tales como tocilizumab (ACTEMERA®); bloqueantes de interleucina 13 (IL-13), tales como lebrikizumab; bloqueantes de interferón (IFN) alfa, tales como rontalizumab; bloqueantes de integrinas beta-7, tales como rhuMab Beta7; bloqueantes de la vía de IgE, tales como anti-M1 prima; bloqueantes de LTA3 homotrímera y heterotrímero LTA1/2 unido a membrana segregados, tales como anti-linfotoxina alfa (LTA); diversos agentes en investigación, tales como tioplatino, PS-341, fenilbutirato, ET-18-OCH₃, e inhibidores de farnesiltransferasa (L-

739749, L-744832); polifenoles, tales como quercetina, resveratrol, piceatannol, galato de epigallocatequina, teaflavinas, flavanoles, procianidinas, ácido betulínico y derivados de los mismos; inhibidores de la autofagia, tales como cloroquina; delta-9-tetrahidrocannabinol (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 COX-2 (por ejemplo, celecoxib o etoricoxib), inhibidor de proteosoma (por ejemplo, PS341); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inhibidor de Bcl-2, tal como oblimersen sódico (GENASENSE®); pixantrona; inhibidores de 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.

El término "profármaco", como se usa en el presente documento, se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para células tumorales en comparación con el fármaco original y se puede activar o convertir enzimáticamente en la forma original más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) y Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," *Directed Drug Delivery*, Borchardt *et al.*, (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados con aminoácidos D, profármacos glucosilados, profármacos que contienen β-lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que se pueden convertir en el fármaco libre citotóxico más activo. Los ejemplos de fármacos citotóxicos que se pueden derivatizar en una forma de profármaco para su uso en la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, los agentes quimioterápicos descritos anteriormente.

Un "agente inhibidor del crecimiento", cuando se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento y/o proliferación de una célula (por ejemplo, una célula cuyo crecimiento depende de la expresión de PD-L1) tanto *in vitro* como *in vivo*. Por lo tanto, 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 el antibiótico de antraciclina doxorubicina ((8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi-α-L-lixo-hexapiranosil)oxil]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenodiona), epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que interrumpen la G1 también actúan sobre la interrupción de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbacina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluoruracilo y Ara-C. Se puede encontrar información adicional en "The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami *et al.* (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos antineoplásicos derivados ambos del árbol del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos previniendo la despolimerización, lo que da como resultado la inhibición de mitosis en células.

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 apreciará que existen muchas formas conocidas en la técnica para determinar la dosificación y duración del tratamiento. Los tratamientos típicos se dan como una administración en una sola dosis y las dosificaciones típicas varían de 10 a 200 unidades (Gy) por día.

Como se usa en el presente documento, los términos "paciente" o "sujeto" se usan de manera intercambiable y se refieren a cualquier animal individual, más preferentemente un mamífero (incluyendo animales no humanos como, por ejemplo, perros, gatos, caballos, conejos, animales de zoológico, vacas, cerdos, ovejas y primates no humanos) para los que se desea el tratamiento. En ejemplos particulares, el paciente en el presente documento es un ser humano.

Como se usa en el presente documento, "administración" significa un procedimiento para proporcionar una dosis de un compuesto (por ejemplo, un antagonista) o una composición farmacéutica (por ejemplo, una composición farmacéutica que incluye un antagonista) a un sujeto (por ejemplo, un paciente). La administración puede ser mediante cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea, para el tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen, por ejemplo, administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo, en parte, de si la administración es breve o crónica. En el presente documento se contemplan diversas pautas de dosificación que

incluyen, pero sin limitarse a, administraciones únicas o múltiples durante diversos puntos temporales, administración con inyección intravenosa rápida e infusión intermitente.

La expresión "de forma concurrente" se usa en el presente documento para referirse a la administración de dos o más agentes terapéuticos, donde al menos parte de la administración se solapa en el tiempo. En consecuencia, la administración concurrente incluye una pauta posológica cuando la administración de uno o más agentes continúa después de suspender la administración de uno o más de otros agentes.

Por "reducir o inhibir" se quiere decir la capacidad de provocar una disminución global de un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o mayor. Reducir o inhibir se puede referir, por ejemplo, a los síntomas del trastorno que se está tratando, la presencia o tamaño de las metástasis o el tamaño del tumor primario.

La expresión "prospecto del envase" se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, politerapia, contraindicaciones y/o advertencias en relación con el uso de dichos productos terapéuticos.

Una formulación "estéril" es aséptica o exenta de cualquier microorganismo vivo y de sus esporas.

Un "artículo de fabricación" es cualquier elemento de fabricación (por ejemplo, un envase o recipiente) o kit que comprende al menos un reactivo, por ejemplo, un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer), o una sonda para detectar específicamente un biomarcador (por ejemplo, PD-L1) descrito en el presente documento. En determinados ejemplos, el elemento de fabricación o kit se promociona, distribuye o vende como una unidad para realizar los procedimientos descritos en el presente documento.

La expresión "en base a" o "basado/a en", cuando se usa en el presente documento, quiere decir que la información sobre uno o más biomarcadores se usa para informar una decisión de tratamiento, información proporcionada en un prospecto del envase u orientación de comercialización/promoción, etc.

III. Procedimientos

A. Procedimientos de diagnóstico basados en el nivel de expresión de PD-L1

En el presente documento se proporcionan procedimientos para determinar si es probable que un paciente que padece un cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga, por ejemplo, un cáncer de vejiga urotelial (CVU)) responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1. En el presente documento también se proporcionan procedimientos para predecir la reactividad de un paciente que padece un cáncer (por ejemplo, CVU) al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1. En el presente documento se proporcionan además procedimientos para seleccionar un tratamiento para un paciente que padece un cáncer (por ejemplo, CVU). Cualquiera de los procedimientos precedentes se puede basar en el nivel de expresión de un biomarcador proporcionado en el presente documento, por ejemplo, expresión de PD-L1 en una muestra tumoral, por ejemplo, en células inmunitarias infiltrantes de tumor. Cualquiera de los procedimientos se puede basar además en la determinación de un subtipo de muestra tumoral. La divulgación proporciona un procedimiento para determinar si es probable que un paciente que padece un cáncer de vejiga responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1, comprendiendo el procedimiento determinar el nivel de expresión de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor en una muestra tumoral obtenida del paciente, en el que un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 1 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 2 % o más, aproximadamente un 3 % o más, aproximadamente un 4 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 6 % o más, aproximadamente un 7 % o más, aproximadamente un 8 % o más, aproximadamente un 9 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 11 % o más, aproximadamente un 12 % o más, aproximadamente un 13 % o más, aproximadamente un 14 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 45 % o más o aproximadamente un 50 % o más) de la muestra tumoral indica que es probable el paciente responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1. Por ejemplo, en algunos casos, un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 1 % o más de la muestra tumoral indica que es probable que el paciente responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1. En algunos casos, un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 5 % o más de la muestra tumoral indica que es probable que el paciente responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1. En otros casos, un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 10 % o más de la muestra tumoral indica que es probable que el paciente responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1.

La divulgación proporciona además un procedimiento para predecir la reactividad de un paciente que padece un cáncer de vejiga al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1, comprendiendo el

procedimiento determinar el nivel de expresión de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor en una muestra tumoral obtenida del paciente, en el que un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 1 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 2 % o más, aproximadamente un 3 % o más, aproximadamente un 4 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 6 % o más, aproximadamente un 7 % o más, aproximadamente un 8 % o más, aproximadamente un 9 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 11 % o más, aproximadamente un 12 % o más, aproximadamente un 13 % o más, aproximadamente un 14 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 45 % o más o aproximadamente un 50 % o más) de la muestra tumoral indica que es probable el paciente responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1. Por ejemplo, en algunos casos, un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 1 % o más de la muestra tumoral indica que es probable que el paciente responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1. En algunos casos, un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 5 % o más de la muestra tumoral indica que es probable que el paciente responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1. En otros casos, un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 10 % o más de la muestra tumoral indica que es probable que el paciente responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1.

La divulgación aún proporciona también un procedimiento para seleccionar un tratamiento para un paciente que padece un cáncer de vejiga, comprendiendo el procedimiento determinar el nivel de expresión de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor en una muestra tumoral obtenida del paciente, y seleccionar un tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1 para el paciente basado en el nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 1 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 2 % o más, aproximadamente un 3 % o más, aproximadamente un 4 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 6 % o más, aproximadamente un 7 % o más, aproximadamente un 8 % o más, aproximadamente un 9 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 11 % o más, aproximadamente un 12 % o más, aproximadamente un 13 % o más, aproximadamente un 14 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 45 % o más o aproximadamente un 50 % o más) de la muestra tumoral.

Por ejemplo, en algunos casos, el procedimiento incluye seleccionar un tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1 basado en un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 1 % o más de la muestra tumoral. En algunos casos, un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 5 % o más de la muestra tumoral indica que es probable que el paciente responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1. En otros casos, el procedimiento incluye seleccionar un tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1 basado en un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 10 % o más de la muestra tumoral.

En cualquiera de los procedimientos precedentes, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden abarcar aproximadamente un 1 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 2 % o más, aproximadamente un 3 % o más, aproximadamente un 4 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 6 % o más, aproximadamente un 7 % o más, aproximadamente un 8 % o más, aproximadamente un 9 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 11 % o más, aproximadamente un 12 % o más, aproximadamente un 13 % o más, aproximadamente un 14 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 45 % o más, aproximadamente un 50 % o más, aproximadamente un 60 % o más, aproximadamente un 65 % o más, aproximadamente un 70 % o más, aproximadamente un 75 % o más, aproximadamente un 80 % o más, aproximadamente un 85 % o más o aproximadamente un 90 % o más) del área del tumor en una sección de la muestra tumoral obtenida del paciente. Por ejemplo, en algunos casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden abarcar aproximadamente un 1 % o más del área del tumor en una sección de la muestra tumoral. En algunos casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden abarcar aproximadamente un 5 % o más del área del tumor en una sección de la muestra tumoral. En otros casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden abarcar aproximadamente un 10 % o más del área del tumor en una sección de la muestra tumoral. En algunos casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden abarcar aproximadamente un 15 % o más del área del tumor en una sección de la muestra tumoral. Aún en otros casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden abarcar aproximadamente un 20 % o más del área del tumor en una sección de la muestra tumoral. En otros casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden abarcar aproximadamente un 25 % o más del área del tumor en una sección de la muestra tumoral. En algunos casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden abarcar aproximadamente un 30 % o más del área del tumor en una sección de la muestra tumoral. En algunos casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden abarcar aproximadamente un 35 % o más del área del tumor en una sección de la muestra tumoral. En algunos casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden abarcar aproximadamente un 40 % o más del área del tumor en una

sección de la muestra tumoral. En algunos casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden abarcar aproximadamente un 50 % o más del área del tumor en una sección de la muestra tumoral.

En cualquiera de los procedimientos precedentes, aproximadamente un 1 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 2 % o más, aproximadamente un 3 % o más, aproximadamente un 4 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 6 % o más, aproximadamente un 7 % o más, aproximadamente un 8 % o más, aproximadamente un 9 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 11 % o más, aproximadamente un 12 % o más, aproximadamente un 13 % o más, aproximadamente un 14 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 45 % o más, aproximadamente un 50 % o más, aproximadamente un 55 % o más, aproximadamente un 60 % o más, aproximadamente un 65 % o más, aproximadamente un 70 % o más, aproximadamente un 75 % o más, aproximadamente un 80 % o más, aproximadamente un 85 % o más, aproximadamente un 90 % o más, aproximadamente un 95 % o más o aproximadamente un 99 % o más) de las células inmunitarias infiltrantes de tumor en la muestra tumoral puede expresar un nivel de expresión detectable de PD-L1.

En cualquiera de los procedimientos precedentes, el procedimiento puede incluir además administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-L1 basada en el nivel de expresión de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor en la muestra tumoral. El antagonista de unión al eje de PD-L1 puede ser cualquier antagonista de unión al eje de PD-L1 conocido en la técnica o descrito en el presente documento, por ejemplo, en la sección D, a continuación.

Por ejemplo, en algunos casos, el antagonista de unión al eje de PD-L1 se selecciona del grupo que consiste en un antagonista de unión a PD-L1, un antagonista de unión a PD-1 o un antagonista de unión a PD-L2. En algunos casos, el antagonista de unión al eje de PD-L1 es un antagonista de unión a PD-L1. En algunos casos, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a uno o más de sus compañeros de unión a ligando. En otros casos, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1. Aún en otros casos, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a B7-1. En algunos casos, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 tanto a PD-1 como a B7-1. En algunos casos, el antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo. En algunos casos, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: YW243.55.S70, MPDL3280A (atezolizumab), MDX-1105, MEDI4736 (durvalumab) y MSB0010718C (avelumab). En algunos casos, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de HVR-H1 de SEQ ID NO:19, la secuencia de HVR-H2 de SEQ ID NO:20 y la secuencia de HVR-H3 de SEQ ID NO:21; y una cadena ligera que comprende la secuencia de HVR-L1 de SEQ ID NO:22, la secuencia de HVR-L2 de SEQ ID NO:23 y la 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:25 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4.

En algunos casos, el antagonista de unión al eje de PD-L1 es un antagonista de unión a PD-1. Por ejemplo, en algunos casos, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a uno o más de sus compañeros de unión a ligando. En algunos casos, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L1. En otros casos, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L2. Aún en otros casos, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 tanto a PD-L1 como a PD-L2. En algunos casos, el antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo. En algunos casos, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: MDX 1106 (nivolumab), MK-3475 (pembrolizumab), MEDI-0680 (AMP-514), PDR001, REGN2810 y BGB-108. En algunos casos, el antagonista de unión a PD-1 es una proteína de fusión Fc. Por ejemplo, en algunos casos, la proteína de fusión Fc es AMP-224.

En cualquiera de los casos precedentes, el cáncer de vejiga puede ser un cáncer de vejiga urotelial, incluyendo, pero sin limitarse a, un cáncer de vejiga urotelial invasivo no muscular, un cáncer de vejiga urotelial invasivo muscular o un cáncer de vejiga urotelial metastásico. En algunos casos, el cáncer de vejiga urotelial es un cáncer de vejiga urotelial metastásico.

La presencia y/o cantidad/niveles de expresión de un biomarcador (por ejemplo, PD-L1) se pueden determinar cualitativa y/o cuantitativamente en base a cualquier criterio adecuado conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, ADN, ARNm, ADNc, proteínas, fragmentos de proteínas y/o número de copias génicas.

En cualquiera de los procedimientos precedentes, la muestra obtenida del paciente se selecciona del grupo que consiste en tejido, sangre completa, plasma, suero y combinaciones de los mismos. En algunos casos, la muestra es una muestra tisular. En algunos casos, la muestra tisular es una muestra tumoral. En algunos casos, la muestra tumoral comprende células inmunitarias infiltrantes de tumor, células tumorales, células estromales o cualquier combinación de las mismas. En cualquiera de los casos precedentes, la muestra tumoral puede ser una muestra tumoral fijada en formol e incluida en parafina (FFIP), una muestra tumoral de archivo, una muestra tumoral fresca o una muestra tumoral congelada.

En cualquiera de los procedimientos precedentes, el procedimiento puede incluir determinar la presencia y/o el nivel de expresión de un biomarcador adicional. En algunos casos, el biomarcador adicional es un biomarcador descrito en

el documento WO 2014/151006. En algunos casos, el biomarcador adicional se selecciona de linfocitos T Ki-67+CD8+ circulantes, interferón gamma, MCP-1 o un gen relacionado con células mieloides. En algunos casos, el gen relacionado con células mieloides se selecciona de *IL18*, *CCL2* e *IL1B*.

La presencia y/o la cantidad/nivel de expresión de diversos biomarcadores descritos en el presente documento en una muestra se pueden analizar por una serie de metodologías, de las que muchas son conocidas en la técnica y se entienden por el experto en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, inmunohistoquímica ("IHQ"), análisis de inmunoelectrotransferencia, inmunoprecipitación, ensayos de unión molecular, ELISA, ELIFA, separación celular activada por fluorescencia ("FACS"), MassARRAY, proteómica, ensayos cuantitativos a base de sangre (como, por ejemplo, ELISA en suero), ensayos bioquímicos de actividad enzimática, hibridación *in situ*, hibridación *in situ* con fluorescencia (HISF), análisis de Southern, análisis Northern, secuenciación del genoma completo, reacción en cadena de la polimerasa ("PCR") incluyendo PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) y otros procedimientos de detección de tipo amplificación, tales como, por ejemplo, ADN ramificado, SISBA, TMA y similares, RNA-Seq, análisis de micromatrices, identificación del perfil de expresión génica y/o análisis en serie de expresión génica ("SAGE"), así como uno cualquiera de la amplia variedad de ensayos que se puede realizar por análisis de matrices de proteínas, genes y/o tejidos. Los protocolos típicos para evaluar el estado de genes y productos génicos se encuentran, por ejemplo, en Ausubel *et al.*, eds., 1995, *Current Protocols In Molecular Biology*, unidades 2 (transferencia Northern), 4 (transferencia de Southern), 15 (inmunotransferencia) y 18 (análisis de PCR). También se pueden usar inmunoensayos multiplexados tales como los disponibles de Rules Based Medicine o Meso Scale Discovery ("MSD").

En cualquiera de los procedimientos precedentes, la presencia y/o cantidad/nivel de expresión de un biomarcador (por ejemplo, PD-L1) se mide determinando los niveles de expresión de proteínas del biomarcador. En determinados casos, el procedimiento comprende poner en contacto la muestra biológica con anticuerpos que se unen específicamente a un biomarcador (por ejemplo, anticuerpos anti-PD-L1) descrito en el presente documento en condiciones propicias para la unión del biomarcador, y detectar si se forma un complejo entre los anticuerpos y el biomarcador. Dicho procedimiento puede ser un procedimiento *in vitro* o *in vivo*. En algunos casos se usa un anticuerpo para seleccionar sujetos elegibles para tratamiento con un antagonista de unión al eje de PD-L1, por ejemplo, un biomarcador para la selección de individuos. Se puede usar cualquier procedimiento para medir los niveles de expresión de proteínas conocidos en la técnica o proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, en algunos casos se determina un nivel de expresión de proteínas de un biomarcador (por ejemplo, PD-L1) usando un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en citometría de flujo (por ejemplo, separación celular activada por fluorescencia (FACSTM)), inmunoelectrotransferencia, ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA), inmunoprecipitación, inmunohistoquímica (IHQ), inmunofluorescencia, radioinmunoanálisis, inmunotransferencia por puntos, procedimientos de inmunodetección, HPLC, resonancia de plasmones superficiales, espectroscopía óptica, espectrometría de masas y HPLC. En algunos casos, el nivel de expresión de proteínas del biomarcador (por ejemplo, PD-L1) se determina en células inmunitarias infiltrantes de tumor. En algunos casos, el nivel de expresión de proteínas del biomarcador (por ejemplo, PD-L1) se determina en células tumorales. En algunos casos, el nivel de expresión de proteínas del biomarcador (por ejemplo, PD-L1) se determina en células inmunitarias infiltrantes de tumor y/o células tumorales.

En determinados casos, la presencia y/o la cantidad/nivel de expresión de proteínas de un biomarcador (por ejemplo, PD-L1) en una muestra se examina usando IHQ y protocolos de tinción. Se ha demostrado que la tinción IHQ de secciones tisulares es un procedimiento fiable de determinación o detección de la presencia de proteínas en una muestra. En algunos casos de cualquiera de los procedimientos, ensayos y/o kits, el biomarcador es PD-L1. En un caso, el nivel de expresión del biomarcador se determina usando un procedimiento que comprende: (a) realizar un análisis IHQ de una muestra (tal como una muestra tumoral obtenida de un paciente) con un anticuerpo; y (b) determinar el nivel de expresión de un biomarcador en la muestra. En algunos casos, la intensidad de tinción IHQ se determina en relación con una referencia. En algunos casos, la referencia es un valor de referencia. En algunos casos, la referencia es una muestra de referencia (por ejemplo, muestra de tinción de línea celular de control, una muestra tisular de un paciente no canceroso o una muestra tumoral sin PD-L1).

La IHQ se puede realizar en combinación con técnicas adicionales tales como tinción morfológica y/o hibridación *in situ* (por ejemplo, HISF). Están disponibles dos procedimientos generales de IHQ; ensayos directos e indirectos. De acuerdo con el primer ensayo, la unión del anticuerpo al antígeno diana se determina directamente. Este ensayo directo usa un reactivo marcado, tal como una marca fluorescente o un anticuerpo primario marcado con enzima, que se puede visualizar sin interacción de anticuerpo adicional. En un ensayo indirecto típico, el anticuerpo primario no conjugado se une al antígeno y, a continuación, un anticuerpo secundario marcado se une al anticuerpo primario. Cuando el anticuerpo secundario se conjuga con un marcador enzimático, se añade un sustrato cromogénico o fluorogénico para proporcionar la visualización del antígeno. La amplificación de la señal se produce porque varios anticuerpos secundarios pueden reaccionar con diferentes epítopos en el anticuerpo primario.

El anticuerpo primario y/o secundario usado para IHQ típicamente se marcará con un resto detectable. Están disponibles numerosos marcadores que se pueden agrupar en general en las siguientes categorías: (a) radioisótopos, tales como ³⁵S, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H e ¹³¹I; (b) partículas de oro coloidales; (c) marcadores fluorescentes incluyendo, pero sin limitarse a, quelatos de tierras raras (quelatos de europio), Texas Red, rodamina, fluoresceína, dansilo, lisamina, umbeliferona, ficoeritrina, ficocianina o fluoróforos disponibles comercialmente tales como SPECTRUM ORANGE7 y

SPECTRUM GREEN7 y/o derivados de uno cualquiera o más de los anteriores; (d) están disponibles diversos marcadores enzima-sustrato y la patente de EE. UU. n.º 4.275.149 proporciona una revisión de algunos de ellos. Los ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalacindionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasas, galactosa oxidasas y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasas), lactoperoxidasas, microperoxidasa y similares.

Los ejemplos de combinaciones enzima-sustrato incluyen, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (HRPO) con peroxidasa de hidrógeno como sustrato; fosfatasa alcalina (AP) con para-nitrofenilfosfato como sustrato cromogénico; y β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o sustrato fluorogénico (por ejemplo, 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidasa). Para una revisión general de estos, véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 4.275.149 y 4.318.980.

Las muestras se pueden preparar, por ejemplo, manualmente, o usando un instrumento de tinción automatizado (por ejemplo, un instrumento Ventana BenchMark XT o Benchmark ULTRA; véase, por ejemplo, el Ejemplo 1 a continuación). Las muestras así preparadas se pueden montar y cubrir. A continuación, se determina la evaluación del portaobjetos, por ejemplo, usando un microscopio, y se pueden emplear criterios de intensidad de tinción, usados de forma rutinaria en la técnica. En un caso, se entenderá que, cuando se examinan células y/o tejidos de un tumor usando IHQ, la tinción en general se determina o evalúa en células y/o tejidos tumorales (a diferencia del tejido estromal o circundante que puede estar presente en la muestra). En algunos casos, se entiende que, cuando se examinan células y/o tejido de un tumor usando IHQ, la tinción incluye la determinación o evaluación en células inmunitarias infiltrantes de tumor, incluyendo células inmunitarias intratumorales o peritumorales. En algunos casos, la IHQ detecta la presencia de un biomarcador (por ejemplo, PD-L1) en >0 % de la muestra, en al menos un 1 % de la muestra, en al menos un 5 % de la muestra, en al menos un 10 % de la muestra, en al menos un 15 % de la muestra, en al menos un 20 % de la muestra, en al menos un 25 % de la muestra, en al menos un 30 % de la muestra, en al menos un 35 % de la muestra, en al menos un 40 % de la muestra, en al menos un 45 % de la muestra, en al menos un 50 % de la muestra, en al menos un 55 % de la muestra, en al menos un 60 % de la muestra, en al menos un 65 % de la muestra, en al menos un 70 % de la muestra, en al menos un 75 % de la muestra, en al menos un 80 % de la muestra, en al menos un 85 % de la muestra, en al menos un 90 % de la muestra, en al menos un 95 % de la muestra o más. Las muestras se pueden clasificar usando cualquiera de los criterios descritos en el presente documento (véase, por ejemplo, la Tabla 2), por ejemplo, mediante análisis por imágenes automatizado o realizado por un anatomopatólogo.

En algunos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, PD-L1 se detecta por inmunohistoquímica usando un anticuerpo diagnóstico anti-PD-L1 (es decir, anticuerpo primario). En algunos casos, el anticuerpo diagnóstico de PD-L1 se une específicamente a PD-L1 humano. En algunos casos, el anticuerpo diagnóstico de PD-L1 es un anticuerpo no humano. En algunos casos, el anticuerpo diagnóstico de PD-L1 es un anticuerpo de rata, ratón o conejo. En algunos casos, el anticuerpo diagnóstico de PD-L1 es un anticuerpo de conejo. En algunos casos, el anticuerpo diagnóstico de PD-L1 es un anticuerpo monoclonal. En algunos casos, el anticuerpo diagnóstico de PD-L1 se marca directamente. En otros casos, el anticuerpo diagnóstico de PD-L1 se marca indirectamente.

En algunos casos de cualquiera de los procedimientos precedentes, el nivel de expresión de PD-L1 se detecta en células inmunitarias infiltrantes de tumor, células tumorales o combinaciones de las mismas usando IHQ. Las células inmunitarias infiltrantes de tumor incluyen, pero no se limitan a, células inmunitarias intratumorales, células inmunitarias peritumorales o cualquier combinación de las mismas y otras células estromales tumorales (por ejemplo, fibroblastos). Dichas células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden ser linfocitos T (tales como linfocitos T CD8+ y/o linfocitos T CD4+), linfocitos B u otras células de linaje de médula ósea, incluyendo granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos), monocitos, macrófagos, células dendríticas (por ejemplo, células dendríticas interdigitantes), histiocitos y linfocitos citolíticos naturales. En algunos casos, la tinción para PD-L1 se detecta como tinción de membrana, tinción citoplásmica y combinaciones de las mismas. En otros casos, la ausencia de PD-L1 se detecta como ausente o sin tinción en la muestra.

En cualquiera de los procedimientos precedentes, el nivel de expresión de un biomarcador (por ejemplo, PD-L1) puede ser un nivel de expresión de ácidos nucleicos. En algunos casos, el nivel de expresión de ácidos nucleicos se determina usando qPCR, rtPCR, RNA-seq, RT-qPCR o qPCR múltiple, análisis de micromatrices, SAGE, técnica MassARRAY o hibridación *in situ* (por ejemplo, HSF). En algunos casos, el nivel de expresión de un biomarcador (por ejemplo, PD-L1) se determina en células tumorales, células inmunitarias infiltrantes de tumor, células estromales o combinaciones de las mismas. En algunos casos, el nivel de expresión de un biomarcador (por ejemplo, PD-L1) se determina en células inmunitarias infiltrantes de tumor. En algunos casos, el nivel de expresión de un biomarcador (por ejemplo, PD-L1) se determina en células tumorales.

Los procedimientos para la evaluación de ARNm en células son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, ensayos de hibridación usando sondas de ADN complementario (tales como hibridación *in situ* usando ribosondas marcadas

específicas para el uno o más genes, transferencia Northern y técnicas relacionadas) y diversos ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (tales como RT-PCR usando cebadores complementarios específicos para uno o más de los genes y otros procedimientos de detección de tipo amplificación, tales como, por ejemplo, ADN ramificado, SISBA, TMA y similares). Además, dichos procedimientos pueden incluir una o más etapas que permiten determinar los niveles de ARNm diana en una muestra biológica (por ejemplo, examinando simultáneamente los niveles de una secuencia de ARNm de control comparativo de un gen "constitutivo" tal como un miembro de la familia de la actina). Opcionalmente, se puede determinar la secuencia del ADNc diana amplificado. Los procedimientos opcionales incluyen protocolos que examinan o detectan ARNm, tales como ARNm diana, en una muestra tisular o celular por tecnologías de micromatrices. Usando micromatrices de ácido nucleico, las muestras de ARNm de prueba y control de las muestras tisulares de prueba y control se transcriben inversamente y se marcan para generar sondas de ADNc. A continuación, las sondas se hibridan a una matriz de ácidos nucleicos inmovilizados en un soporte sólido. La matriz se configura de modo que la secuencia y la posición de cada miembro de la matriz son conocidas. Por ejemplo, una selección de genes cuya expresión se correlaciona con un incremento o reducción en el beneficio clínico del tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1 se puede disponer en una matriz en un soporte sólido. La hibridación de una sonda marcada con un miembro de matriz particular indica que la muestra de la que se derivó la sonda expresa ese gen.

En determinados casos, la presencia y/o la cantidad/niveles de expresión de un biomarcador en una primera muestra se incrementan o se elevan en comparación con la presencia/ausencia y/o cantidad/niveles de expresión en una segunda muestra. En determinados casos, la presencia/ausencia y/o la cantidad/niveles de expresión de un biomarcador en una primera muestra disminuyen o se reducen en comparación con la presencia y/o cantidad/niveles de expresión en una segunda muestra. En determinados casos, la segunda muestra es una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control. Las divulgaciones adicionales para determinar la presencia/ausencia y/o la cantidad/niveles de expresión de un gen se describen en el presente documento.

En determinados casos, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control es una única muestra o una combinación de múltiples muestras del mismo sujeto o individuo que se obtienen en uno o más puntos temporales diferentes a cuando se obtiene una muestra de prueba. Por ejemplo, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control se obtiene en un punto temporal anterior del mismo sujeto o individuo a cuando se obtiene la muestra de prueba. Dicha muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control puede ser útil si la muestra de referencia se obtiene durante el diagnóstico inicial del cáncer y la muestra de prueba se obtiene más tarde cuando el cáncer se vuelve metastásico.

En determinados ejemplos, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control es una combinación de múltiples muestras de uno o más individuos sanos que no son el paciente. En determinados ejemplos, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control es una combinación de múltiples muestras de uno o más individuos con una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) que no son el sujeto o individuo. En determinados ejemplos, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control son muestras de ARN agrupadas de tejidos normales o muestras de plasma o suero agrupadas de uno o más individuos que no son el paciente. En determinados ejemplos, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control son muestras de ARN agrupadas de tejidos tumorales o muestras de plasma o suero agrupadas de uno o más individuos con una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) que no son el paciente.

En algunos ejemplos de cualquiera de los procedimientos, la expresión incrementada o elevada se refiere a un incremento global de aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor del nivel de biomarcador (por ejemplo, proteína o ácido nucleico (por ejemplo, gen o ARNm)), detectado por procedimientos conocidos de la técnica estándar como los descritos en el presente documento, en comparación con una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control. En determinados ejemplos, la expresión elevada se refiere al incremento en la cantidad/nivel de expresión de un biomarcador en la muestra en el que el incremento es al menos aproximadamente cualquiera de 1,5, 1,75, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 25, 50, 75 o 100 veces la cantidad/nivel de expresión del respectivo biomarcador en una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control. En algunos ejemplos, la expresión elevada se refiere a un incremento global mayor de aproximadamente 1,5 veces, aproximadamente 1,75 veces, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 2,25 veces, aproximadamente 2,5 veces, aproximadamente 2,75 veces, aproximadamente 3,0 veces o aproximadamente 3,25 veces en comparación con una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control, tejido de control o control interno (por ejemplo, gen constitutivo).

En algunos ejemplos de cualquiera de los procedimientos, la expresión reducida se refiere a una reducción global de aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor del nivel de biomarcador (por ejemplo, proteína o ácido nucleico (por ejemplo, gen o ARNm)), detectada por procedimientos conocidos de la técnica estándar como los descritos en el presente documento, en comparación

con una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control. En determinados ejemplos, la expresión reducida se refiere a la disminución en la cantidad/nivel de expresión de un biomarcador en la muestra en el que la disminución es al menos aproximadamente cualquiera de 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,05 o 0,01 veces la cantidad/nivel de expresión del respectivo biomarcador en una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control.

B. Procedimientos de diagnóstico basados en la evaluación del subtipo de tumor

En el presente documento se proporcionan procedimientos que se pueden usar individualmente o en combinación con cualquiera de los procedimientos precedentes presentados en la Sección A, anteriormente, para determinar si es probable que un paciente que padece un cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga (por ejemplo, un CVU)) responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1 basado en una evaluación del subtipo de tumor. Por ejemplo, la divulgación proporciona un procedimiento para determinar si es probable que un paciente que padece un cáncer de vejiga responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1, comprendiendo el procedimiento determinar el subtipo de un tumor a partir de una muestra del tumor obtenida del paciente, en el que un tumor de subtipo luminal indica que es probable que el paciente responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1. En algunos casos, la determinación de que una muestra tumoral es un tumor de subtipo luminal II indica que es probable el paciente responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1. En algunos casos, el nivel de uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16) de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 en relación con los niveles de referencia de los biomarcadores se puede usar en la determinación del subtipo de tumor. En algunos casos, el nivel de uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16) de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 en relación con los niveles de referencia de los biomarcadores se puede usar en la determinación de un tumor de subtipo luminal. En algunos casos, el nivel de uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16) de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 en relación con los niveles de referencia de los biomarcadores se puede usar en la determinación de un tumor de subtipo luminal II. En algunos casos, el nivel de uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16) de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 en relación con los niveles de referencia de los biomarcadores se puede usar para determinar si es probable que un paciente que padece un cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga (por ejemplo, un CVU)) responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1. En otros casos, por ejemplo, un incremento y/o una disminución en el nivel de uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o 16) de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 en relación con los niveles de referencia de los biomarcadores en combinación con un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 1 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 2 % o más, aproximadamente un 3 % o más, aproximadamente un 4 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 6 % o más, aproximadamente un 7 % o más, aproximadamente un 8 % o más, aproximadamente un 9 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 11 % o más, aproximadamente un 12 % o más, aproximadamente un 13 % o más, aproximadamente un 14 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 45 % o más o aproximadamente un 50 % o más) de la muestra tumoral se puede usar para determinar si es probable que un paciente que padece un cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga (por ejemplo, un CVU)) responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1.

Tabla 1. Biomarcadores asociados a subtipos

Grupo	Biomarcador
A	FGFR3 miR-99a-5p miR-100-5p CDKN2A
B	KRT5 KRT6A KRT14 EGFR
C	GATA3 FOXA1 UPK3A miR-200a-3p miR-200b-3p E-cadherina
D	ERBB2 ESR2

Los procedimientos para predecir la reactividad de un paciente que padece un cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga (por ejemplo, un CVU)) al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1 basada en la

evaluación del subtipo de tumor se pueden usar individualmente o en combinación con cualquiera de los procedimientos precedentes presentados en la Sección A, anteriormente. Por ejemplo, la divulgación proporciona un procedimiento para predecir si es probable que un paciente que padece un cáncer de vejiga responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1, comprendiendo el procedimiento determinar el subtipo de un tumor a partir de una muestra del tumor obtenida del paciente, en el que un tumor de subtipo luminal indica que es probable que el paciente responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1. En algunos casos, la determinación de que una muestra tumoral es un tumor de subtipo luminal II indica que es probable el paciente responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1. En algunos casos, el nivel de uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16) de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 en relación con los niveles de referencia de los biomarcadores se puede usar en la determinación del subtipo de tumor. En algunos casos, el nivel de uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16) de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 en relación con los niveles de referencia de los biomarcadores se puede usar en la determinación de un tumor de subtipo luminal. En algunos casos, el nivel de uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16) de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 en relación con los niveles de referencia de los biomarcadores se puede usar para determinar si es probable que un paciente que padece un cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga (por ejemplo, un CVU)) responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1. En otros casos, por ejemplo, un incremento y/o una disminución en el nivel de uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o 16) de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 en relación con los niveles de referencia de los biomarcadores en combinación con un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 1 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 2 % o más, aproximadamente un 3 % o más, aproximadamente un 4 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 6 % o más, aproximadamente un 7 % o más, aproximadamente un 8 % o más, aproximadamente un 9 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 11 % o más, aproximadamente un 12 % o más, aproximadamente un 13 % o más, aproximadamente un 14 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 45 % o más o aproximadamente un 50 % o más) de la muestra tumoral puede predecir si es probable que un paciente que padece un cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga (por ejemplo, un CVU)) responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1.

Los procedimientos para seleccionar el tratamiento para un paciente que padece un cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga (por ejemplo, un CVU)) que comprenden seleccionar un antagonista de unión al eje de PD-L1 basado en la evaluación del subtipo de tumor se pueden usar individualmente o en combinación con cualquiera de los procedimientos precedentes presentados en la Sección A, anteriormente. En algunos casos, el procedimiento comprende determinar el subtipo de un tumor a partir de una muestra del tumor obtenido del paciente, en el que se selecciona un antagonista de unión al eje de PD-L1 basado en la determinación de que el tumor es un tumor de subtipo luminal. En algunos casos, se selecciona un antagonista de unión al eje de PD-L1 basado en la determinación de que el tumor es un tumor del subtipo luminal II. En algunos casos, el nivel de uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16) de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 en relación con los niveles de referencia de los biomarcadores se puede usar en la determinación del subtipo de tumor. En algunos casos, el nivel de uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16) de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 en relación con los niveles de referencia de los biomarcadores se puede usar en la determinación de un tumor de subtipo luminal. En algunos casos, el nivel de uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16) de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 en relación con los niveles de referencia de los biomarcadores se puede usar para seleccionar un antagonista de unión al eje de PD-L1 como el tratamiento apropiado para un paciente que padece un cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga (por ejemplo, un CVU)). En otros casos, por ejemplo, un incremento y/o una disminución en el nivel de uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o 16) de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 en relación con los niveles de referencia de los biomarcadores en combinación con un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 1 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 2 % o más, aproximadamente un 3 % o más, aproximadamente un 4 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 6 % o más, aproximadamente un 7 % o más, aproximadamente un 8 % o más, aproximadamente un 9 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 11 % o más, aproximadamente un 12 % o más, aproximadamente un 13 % o más, aproximadamente un 14 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 45 % o más o aproximadamente un 50 % o más) de la muestra tumoral puede informar de la selección de un antagonista de unión al eje de PD-L1 para un paciente que padece un cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga (por ejemplo, un CVU)).

En cualquiera de los procedimientos precedentes se ha determinado que los biomarcadores establecidos en la Tabla 1 han incrementado y/o disminuido en aproximadamente un 1 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 2 % o más,

aproximadamente un 3 % o más, aproximadamente un 4 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 6 % o más, aproximadamente un 7 % o más, aproximadamente un 8 % o más, aproximadamente un 9 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 11 % o más, aproximadamente un 12 % o más, aproximadamente un 13 % o más, aproximadamente un 14 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 45 % o más, aproximadamente un 50 % o más, aproximadamente un 60 % o más, aproximadamente un 65 % o más, aproximadamente un 70 % o más, aproximadamente un 75 % o más, aproximadamente un 80 % o más, aproximadamente un 85 % o más o aproximadamente un 90 % o más) en relación con los niveles de referencia de los biomarcadores establecidos en la Tabla 1. Por ejemplo, en algunos casos se determinó que el nivel de uno o más biomarcadores se incrementó y/o disminuyó en aproximadamente un 1 % o más. En algunos casos se determinó que el nivel de uno o más biomarcadores se incrementó y/o disminuyó en aproximadamente un 5 % o más. En otros casos se determinó que el nivel de uno o más biomarcadores se incrementó y/o disminuyó en aproximadamente un 10 % o más. En algunos casos se determinó que el nivel de uno o más biomarcadores se incrementó y/o disminuyó en aproximadamente un 15 % o más. Aún en otros casos se determinó que el nivel de uno o más biomarcadores se incrementó y/o disminuyó en aproximadamente un 20 % o más. En otros casos se determinó que el nivel de uno o más biomarcadores se incrementó y/o disminuyó en aproximadamente un 25 % o más. En algunos casos se determinó que el nivel de uno o más biomarcadores se incrementó y/o disminuyó en aproximadamente un 30 % o más. En algunos casos se determinó que el nivel de uno o más biomarcadores se incrementó y/o disminuyó en aproximadamente un 35 % o más. En algunos casos se determinó que el nivel de uno o más biomarcadores se incrementó y/o disminuyó en aproximadamente un 40 % o más. En algunos casos se determinó que el nivel de uno o más biomarcadores se incrementó y/o disminuyó en aproximadamente un 50 % o más.

En cualquiera de los casos precedentes se ha determinado que una muestra tumoral obtenida del paciente es un tumor de subtipo luminal (por ejemplo, un tumor de subtipo luminal de CVU). En algunos casos se ha determinado que el tumor es un tumor del subtipo luminal II. En algunos casos, el nivel de expresión de al menos uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, Grupo A (por ejemplo, FGFR3, miR-99a-5p, miR-100-5p, CDKN2A) y al menos uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, Grupo B (por ejemplo, KRT5, KRT6A, KRT14, EGFR) se pueden usar para determinar la clasificación del subtipo luminal II. En algunos casos, el nivel de expresión de al menos uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, Grupo A (por ejemplo, FGFR3, miR-99a-5p, miR-100-5p, CDKN2A) y al menos uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6) biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, Grupo C (por ejemplo, GATA3, FOXA1, UPK3A, miR-200a-3p, miR-200b-3p, E-cadherina) se pueden usar para determinar la clasificación del subtipo luminal II. En algunos casos, el nivel de expresión de al menos uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, Grupo A (por ejemplo, FGFR3, miR-99a-5p, miR-100-5p, CDKN2A) y al menos uno o más (por ejemplo, 1 o 2) biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, Grupo D (por ejemplo, ERBB2, ESR2) se pueden usar para determinar la clasificación del subtipo luminal II. En algunos casos, el nivel de expresión de al menos uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, Grupo A (por ejemplo, FGFR3, miR-99a-5p, miR-100-5p, CDKN2A); al menos uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6) biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, Grupo C (por ejemplo, GATA3, FOXA1, UPK3A, miR-200a-3p, miR-200b-3p, E-cadherina) y al menos uno o más (por ejemplo, 1 o 2) biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, Grupo D (por ejemplo, ERBB2, ESR2) se pueden usar para determinar la clasificación del subtipo luminal II. En algunos casos, el nivel de expresión de al menos uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, Grupo A (por ejemplo, FGFR3, miR-99a-5p, miR-100-5p, CDKN2A); al menos uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, Grupo B (por ejemplo, KRT5, KRT6A, KRT14, EGFR); al menos uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6) biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, Grupo C (por ejemplo, GATA3, FOXA1, UPK3A, miR-200a-3p, miR-200b-3p, E-cadherina) y al menos uno o más (por ejemplo, 1 o 2) biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, Grupo D (por ejemplo, ERBB2, ESR2) se pueden usar para determinar la clasificación del subtipo luminal II. En cualquiera de los casos precedentes, el nivel de un biomarcador es un nivel de ARNm, un nivel de proteína y/o un nivel de microARN (por ejemplo, miARN).

En algunos casos, un nivel incrementado de expresión de al menos uno de miR-99a-5p, miR-100-5p y CDKN2A y/o un nivel disminuido de expresión de FGFR3 en combinación con un nivel disminuido de expresión de al menos uno de KRT5, KRT6A, KRT14 y EGFR en comparación con los niveles de referencia de los biomarcadores se pueden usar para determinar la clasificación del subtipo luminal II. En algunos casos, un nivel incrementado de expresión de al menos uno de miR-99a-5p, miR-100-5p y CDKN2A y/o un nivel disminuido de expresión de FGFR3 en combinación con un nivel incrementado de expresión de al menos uno de GATA3, FOXA1, UPK3A, miR-200a-3p, miR-200b-3p y E-cadherina en comparación con los niveles de referencia de los biomarcadores se pueden usar para determinar la clasificación del subtipo luminal II. En algunos casos, un nivel incrementado de expresión de al menos uno de miR-99a-5p, miR-100-5p y CDKN2A y/o un nivel disminuido de expresión de FGFR3 en combinación con un nivel incrementado de ERBB2 y/o ESR2 en comparación con los niveles de referencia de los biomarcadores se pueden usar para determinar la clasificación del subtipo luminal II. En algunos casos, un nivel incrementado de expresión de al menos uno de miR-99a-5p, miR-100-5p y CDKN2A y/o un nivel disminuido de expresión de FGFR3; un nivel incrementado de expresión de al menos uno de GATA3, FOXA1, UPK3A, miR-200a-3p, miR-200b-3p y E-cadherina y un nivel incrementado de ERBB2 y/o ESR2 en comparación con los niveles de referencia de los biomarcadores se pueden usar para determinar la clasificación del subtipo luminal II.

En algunos casos, un nivel incrementado de expresión de al menos uno de miR-99a-5p, miR-100-5p y CDKN2A y/o un nivel disminuido de expresión de FGFR3; un nivel disminuido de expresión de al menos uno de KRT5, KRT6A, KRT14 y EGFR y un nivel incrementado de ERBB2 y/o ESR2 en comparación con los niveles de referencia de los biomarcadores se pueden usar para determinar la clasificación del subtipo luminal II. En algunos casos, un nivel incrementado de expresión de al menos uno de miR-99a-5p, miR-100-5p y CDKN2A y/o un nivel disminuido de expresión de FGFR3; un nivel disminuido de expresión de al menos uno de KRT5, KRT6A, KRT14 y EGFR; un nivel incrementado de expresión de al menos uno de GATA3, FOXA1, UPK3A, miR-200a-3p, miR-200b-3p y E-cadherina y un nivel incrementado de ERBB2 y/o ESR2 en comparación con los niveles de referencia de los biomarcadores se pueden usar para determinar la clasificación del subtipo luminal II. En cualquiera de los casos precedentes, el nivel de un biomarcador es un nivel de ARNm, un nivel de proteína y/o un nivel de microARN (por ejemplo, miARN).

En algunos casos se ha determinado que el nivel de expresión de al menos uno de CDKN2A, GATA3, FOXA1, ERBB2, FGFR3, KRT5, KRT14, EGFR, CD8A, GZMA, GZMB, IFNG, CXCL9, CXCL10, PRF1 y TBX21 en la muestra tumoral obtenida del paciente ha cambiado en aproximadamente un 1 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 2 % o más, aproximadamente un 3 % o más, aproximadamente un 4 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 6 % o más, aproximadamente un 7 % o más, aproximadamente un 8 % o más, aproximadamente un 9 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 11 % o más, aproximadamente un 12 % o más, aproximadamente un 13 % o más, aproximadamente un 14 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 45 % o más o aproximadamente un 50 % o más) en relación con un nivel de referencia del al menos un gen.

En algunos casos se ha determinado que el nivel de expresión de al menos uno de CDKN2A, GATA3, FOXA1 y ERBB2 en la muestra tumoral obtenida del paciente se incrementa aproximadamente un 1 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 2 % o más, aproximadamente un 3 % o más, aproximadamente un 4 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 6 % o más, aproximadamente un 7 % o más, aproximadamente un 8 % o más, aproximadamente un 9 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 11 % o más, aproximadamente un 12 % o más, aproximadamente un 13 % o más, aproximadamente un 14 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 45 % o más o aproximadamente un 50 % o más) en relación con un nivel de referencia del al menos un gen, y/o se ha determinado que el nivel de expresión de al menos uno de FGFR3, KRT5, KRT14 y EGFR en la muestra tumoral obtenida del paciente disminuye aproximadamente un 1 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 2 % o más, aproximadamente un 3 % o más, aproximadamente un 4 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 6 % o más, aproximadamente un 7 % o más, aproximadamente un 8 % o más, aproximadamente un 9 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 11 % o más, aproximadamente un 12 % o más, aproximadamente un 13 % o más, aproximadamente un 14 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 45 % o más o aproximadamente un 50 % o más) en relación con un nivel de referencia del al menos un gen.

En algunos casos se ha determinado que los niveles de expresión de CDKN2A, GATA3, FOXA1 y ERBB2 en la muestra tumoral obtenida del paciente se incrementan aproximadamente un 1 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 2 % o más, aproximadamente un 3 % o más, aproximadamente un 4 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 6 % o más, aproximadamente un 7 % o más, aproximadamente un 8 % o más, aproximadamente un 9 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 11 % o más, aproximadamente un 12 % o más, aproximadamente un 13 % o más, aproximadamente un 14 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 45 % o más o aproximadamente un 50 % o más) en relación con niveles de referencia de los genes, y/o se ha determinado que los niveles de expresión de FGFR3, KRT5, KRT14 y EGFR en la muestra tumoral obtenida del paciente disminuyen aproximadamente un 1 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 2 % o más, aproximadamente un 3 % o más, aproximadamente un 4 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 6 % o más, aproximadamente un 7 % o más, aproximadamente un 8 % o más, aproximadamente un 9 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 11 % o más, aproximadamente un 12 % o más, aproximadamente un 13 % o más, aproximadamente un 14 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 45 % o más o aproximadamente un 50 % o más) en relación con niveles de referencia de los genes.

En algunos casos se ha determinado que los niveles de expresión de CDKN2A, GATA3, FOXA1 y ERBB2 en la muestra tumoral obtenida del paciente se incrementan aproximadamente un 1 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 2 % o más, aproximadamente un 3 % o más, aproximadamente un 4 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 6 % o más, aproximadamente un 7 % o más, aproximadamente un 8 % o más,

aproximadamente un 9 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 11 % o más, aproximadamente un 12 % o más, aproximadamente un 13 % o más, aproximadamente un 14 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 45 % o más o aproximadamente un 50 % o más) en relación con niveles de referencia de los genes, y se ha determinado que los niveles de expresión de FGFR3, KRT5, KRT14 y EGFR en la muestra tumoral obtenida del paciente disminuyen aproximadamente un 1 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 2 % o más, aproximadamente un 3 % o más, aproximadamente un 4 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 6 % o más, aproximadamente un 7 % o más, aproximadamente un 8 % o más, aproximadamente un 9 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 11 % o más, aproximadamente un 12 % o más, aproximadamente un 13 % o más, aproximadamente un 14 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 45 % o más o aproximadamente un 50 % o más) en relación con niveles de referencia de los genes.

En otros casos se ha determinado que el nivel de expresión de miR-99a-5p o miR100-5p en la muestra tumoral obtenida del paciente ha cambiado en aproximadamente un 1 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 2 % o más, aproximadamente un 3 % o más, aproximadamente un 4 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 6 % o más, aproximadamente un 7 % o más, aproximadamente un 8 % o más, aproximadamente un 9 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 11 % o más, aproximadamente un 12 % o más, aproximadamente un 13 % o más, aproximadamente un 14 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 45 % o más o aproximadamente un 50 % o más) en relación con niveles de referencia de los miARN. En otros casos se ha determinado que el nivel de expresión de miR-99a-5p o miR100-5p en la muestra tumoral obtenida del paciente se incrementa en relación con un nivel de referencia del miARN. En otros casos se ha determinado que el nivel de expresión de miR-99a-5p o miR100-5p en la muestra tumoral obtenida del paciente se incrementa en relación con un nivel de referencia del miARN. En algunos casos se ha determinado que los niveles de expresión de miR-99a-5p o miR100-5p en la muestra tumoral obtenida del paciente se incrementan aproximadamente un 1 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 2 % o más, aproximadamente un 3 % o más, aproximadamente un 4 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 6 % o más, aproximadamente un 7 % o más, aproximadamente un 8 % o más, aproximadamente un 9 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 11 % o más, aproximadamente un 12 % o más, aproximadamente un 13 % o más, aproximadamente un 14 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 45 % o más o aproximadamente un 50 % o más) en relación con niveles de referencia de los miARN.

Aún en otros casos se ha determinado que el nivel de expresión de al menos uno de CD8A, GZMA, GZMB, IFNG, CXCL9, CXCL10, PRF1 y TBX21 en la muestra tumoral obtenida del paciente se incrementa aproximadamente un 1 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 2 % o más, aproximadamente un 3 % o más, aproximadamente un 4 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 6 % o más, aproximadamente un 7 % o más, aproximadamente un 8 % o más, aproximadamente un 9 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 11 % o más, aproximadamente un 12 % o más, aproximadamente un 13 % o más, aproximadamente un 14 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 45 % o más o aproximadamente un 50 % o más) en relación con un nivel de referencia del al menos un gen. En algunos casos se ha determinado que los niveles de expresión de al menos CXCL9 y CXCL10 en la muestra tumoral obtenida del paciente se incrementan aproximadamente un 1 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 2 % o más, aproximadamente un 3 % o más, aproximadamente un 4 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 6 % o más, aproximadamente un 7 % o más, aproximadamente un 8 % o más, aproximadamente un 9 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 11 % o más, aproximadamente un 12 % o más, aproximadamente un 13 % o más, aproximadamente un 14 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 45 % o más o aproximadamente un 50 % o más) en relación con niveles de referencia de los genes. En otros casos, el tumor de subtipo luminal es un tumor de subtipo de cluster luminal II.

Por ejemplo, en algunos casos, el antagonista de unión al eje de PD-L1 se selecciona del grupo que consiste en un antagonista de unión a PD-L1, un antagonista de unión a PD-1 o un antagonista de unión a PD-L2. En algunos casos, el antagonista de unión al eje de PD-L1 es un antagonista de unión a PD-L1. En algunos casos, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a uno o más de sus compañeros de unión a ligando. En otros casos, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1. Aún en otros casos, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a B7-1. En algunos casos, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 tanto a PD-1 como a B7-1. En algunos casos, el antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo. En algunos casos, el

- anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: YW243.55.S70, MPDL3280A (atezolizumab), MDX-1105, MEDI4736 (durvalumab) y MSB0010718C (avelumab). En algunos casos, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de HVR-H1 de SEQ ID NO:19, la secuencia de HVR-H2 de SEQ ID NO:20 y la secuencia de HVR-H3 de SEQ ID NO:21; y una cadena ligera que comprende la secuencia de HVR-L1 de SEQ ID NO:22, la secuencia de HVR-L2 de SEQ ID NO:23 y la 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:25 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4.
- En algunos casos, el antagonista de unión al eje de PD-L1 es un antagonista de unión a PD-1. Por ejemplo, en algunos casos, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a uno o más de sus compañeros de unión a ligando. En algunos casos, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L1. En otros casos, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L2. Aún en otros casos, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 tanto a PD-L1 como a PD-L2. En algunos casos, el antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo.
- En algunos casos, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: MDX 1106 (nivolumab), MK-3475 (pembrolizumab), MEDI-0680 (AMP-514), PDR001, REGN2810 y BGB-108. En algunos casos, el antagonista de unión a PD-1 es una proteína de fusión Fc. Por ejemplo, en algunos casos, la proteína de fusión Fc es AMP-224.
- En cualquiera de los casos precedentes, el cáncer de vejiga puede ser un cáncer de vejiga urotelial (CVU), incluyendo, pero sin limitarse a, un cáncer de vejiga urotelial invasivo no muscular, un cáncer de vejiga urotelial invasivo muscular o un cáncer de vejiga urotelial metastásico. En algunos casos, el cáncer de vejiga urotelial es un cáncer de vejiga urotelial metastásico.
- La presencia y/o cantidad/niveles de expresión de un biomarcador (por ejemplo, PD-L1) se pueden determinar cualitativa y/o cuantitativamente en base a cualquier criterio adecuado conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, ADN, ARNm, ADNc, proteínas, fragmentos de proteínas y/o número de copias génicas.
- En cualquiera de los procedimientos precedentes, la muestra obtenida del paciente se selecciona del grupo que consiste en tejido, sangre completa, plasma, suero y combinaciones de los mismos. En algunos casos, la muestra es una muestra tisular. En algunos casos, la muestra tisular es una muestra tumoral. En algunos casos, la muestra tumoral comprende células inmunitarias infiltrantes de tumor, células tumorales, células estromales o cualquier combinación de las mismas. En cualquiera de los casos precedentes, la muestra tumoral puede ser una muestra tumoral fijada en formol e incluida en parafina (FFIP), una muestra tumoral de archivo, una muestra tumoral fresca o una muestra tumoral congelada.
- En cualquiera de los procedimientos precedentes, el procedimiento puede incluir determinar la presencia y/o el nivel de expresión de un biomarcador adicional. En algunos casos, el biomarcador adicional es un biomarcador descrito en el documento WO 2014/151006. En algunos casos, el biomarcador adicional se selecciona de linfocitos T Ki-67+CD8+ circulantes, interferón gamma, MCP-1 o un gen relacionado con células mieloides. En algunos casos, el gen relacionado con células mieloides se selecciona de *IL18*, *CCL2* e *IL1B*.
- La presencia y/o la cantidad/nivel de expresión de diversos biomarcadores descritos en el presente documento en una muestra se pueden analizar por una serie de metodologías, de las que muchas son conocidas en la técnica y se entienden por el experto en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, inmunohistoquímica ("IHQ"), análisis de inmunoelectrotransferencia, inmunoprecipitación, ensayos de unión molecular, ELISA, ELIFA, separación celular activada por fluorescencia ("FACS"), MassARRAY, proteómica, ensayos cuantitativos a base de sangre (como, por ejemplo, ELISA en suero), ensayos bioquímicos de actividad enzimática, hibridación in situ, hibridación in situ con fluorescencia (HISF), análisis de Southern, análisis Northern, secuenciación del genoma completo, reacción en cadena de la polimerasa ("PCR") incluyendo PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) y otros procedimientos de detección de tipo amplificación, tales como, por ejemplo, ADN ramificado, SISBA, TMA y similares, RNA-Seq, análisis de micromatrices, identificación del perfil de expresión génica y/o análisis en serie de expresión génica ("SAGE"), así como uno cualquiera de la amplia variedad de ensayos que se puede realizar por análisis de matrices de proteínas, genes y/o tejidos. Los protocolos típicos para evaluar el estado de genes y productos génicos se encuentran, por ejemplo, en Ausubel *et al.*, eds., 1995, *Current Protocols In Molecular Biology*, unidades 2 (transferencia Northern), 4 (transferencia de Southern), 15 (inmunotransferencia) y 18 (análisis de PCR). También se pueden usar inmunoensayos multiplexados tales como los disponibles de Rules Based Medicine o Meso Scale Discovery ("MSD").
- En cualquiera de los procedimientos precedentes, la presencia y/o cantidad/nivel de expresión de un biomarcador (por ejemplo, PD-L1) se mide determinando los niveles de expresión de proteínas del biomarcador. En determinados casos, el procedimiento comprende poner en contacto la muestra biológica con anticuerpos que se unen específicamente a un biomarcador (por ejemplo, anticuerpos anti-PD-L1) descrito en el presente documento en condiciones propicias para la unión del biomarcador, y detectar si se forma un complejo entre los anticuerpos y el biomarcador. Dicho procedimiento puede ser un procedimiento *in vitro* o *in vivo*. En algunos casos, se usa un anticuerpo para seleccionar sujetos elegibles para tratamiento con antagonista de unión al eje de PD-L1 (por ejemplo, un biomarcador para la selección de individuos). Se puede usar cualquier procedimiento para medir los niveles de expresión de proteínas conocidos en la técnica o proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, en algunos

casos se determina un nivel de expresión de proteínas de un biomarcador (por ejemplo, PD-L1) usando un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en citometría de flujo (por ejemplo, separación celular activada por fluorescencia (FACS™)), inmunoelectrotransferencia, ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA), inmunoprecipitación, inmunohistoquímica (IHQ), inmunofluorescencia, radioinmunoanálisis, inmunotransferencia por puntos, procedimientos de inmunodetección, HPLC, resonancia de plasmones superficiales, espectroscopía óptica, espectrometría de masas y HPLC. En algunos casos, el nivel de expresión de proteínas del biomarcador (por ejemplo, PD-L1) se determina en células inmunitarias infiltrantes de tumor. En algunos casos, el nivel de expresión de proteínas del biomarcador (por ejemplo, PD-L1) se determina en células tumorales. En algunos casos, el nivel de expresión de proteínas del biomarcador (por ejemplo, PD-L1) se determina en células inmunitarias infiltrantes de tumor y/o células tumorales.

En determinados casos, la presencia y/o la cantidad/nivel de expresión de proteínas de un biomarcador (por ejemplo, PD-L1) en una muestra se examina usando IHQ y protocolos de tinción. Se ha demostrado que la tinción IHQ de secciones tisulares es un procedimiento fiable de determinación o detección de la presencia de proteínas en una muestra. En algunos casos de cualquiera de los procedimientos, ensayos y/o kits, el biomarcador es PD-L1. En un caso, el nivel de expresión del biomarcador se determina usando un procedimiento que comprende: (a) realizar un análisis IHQ de una muestra (tal como una muestra tumoral obtenida de un paciente) con un anticuerpo; y (b) determinar el nivel de expresión de un biomarcador en la muestra. En algunos casos, la intensidad de tinción IHQ se determina en relación con una referencia. En algunos casos, la referencia es un valor de referencia. En algunos casos, la referencia es una muestra de referencia (por ejemplo, muestra de tinción de línea celular de control, una muestra tisular de un paciente no canceroso o una muestra tumoral sin PD-L1).

La IHQ se puede realizar en combinación con técnicas adicionales tales como tinción morfológica y/o hibridación *in situ* (por ejemplo, HSF). Están disponibles dos procedimientos generales de IHQ; ensayos directos e indirectos. De acuerdo con el primer ensayo, la unión del anticuerpo al antígeno diana se determina directamente. Este ensayo directo usa un reactivo marcado, tal como una marca fluorescente o un anticuerpo primario marcado con enzima, que se puede visualizar sin interacción de anticuerpo adicional. En un ensayo indirecto típico, el anticuerpo primario no conjugado se une al antígeno y, a continuación, un anticuerpo secundario marcado se une al anticuerpo primario. Cuando el anticuerpo secundario se conjuga con un marcador enzimático, se añade un sustrato cromogénico o fluorogénico para proporcionar la visualización del antígeno. La amplificación de la señal se produce porque varios anticuerpos secundarios pueden reaccionar con diferentes epítopos en el anticuerpo primario.

El anticuerpo primario y/o secundario usado para IHQ típicamente se marcará con un resto detectable. Están disponibles numerosos marcadores que se pueden agrupar en general en las siguientes categorías: (a) radioisótopos, tales como ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H e ^{131}I ; (b) partículas de oro coloidales; (c) marcadores fluorescentes incluyendo, pero sin limitarse a, quelatos de tierras raras (quelatos de europio), Texas Red, rodamina, fluoresceína, dansilo, lisamina, umbeliferona, ficoeritrina, ficocianina o fluoróforos disponibles comercialmente tales como SPECTRUM ORANGE7 y SPECTRUM GREEN7 y/o derivados de uno cualquiera o más de los anteriores; (d) están disponibles diversos marcadores enzima-sustrato y la patente de EE. UU. n.º 4.275.149 proporciona una revisión de algunos de ellos. Los ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalacindionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasa (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares.

Los ejemplos de combinaciones enzima-sustrato incluyen, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (HRPO) con peroxidasa de hidrógeno como sustrato; fosfatasa alcalina (AP) con para-nitrofenilfosfato como sustrato cromogénico; y β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o sustrato fluorogénico (por ejemplo, 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidasa). Para una revisión general de estos, véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 4.275.149 y 4.318.980.

Las muestras se pueden preparar, por ejemplo, manualmente, o usando un instrumento de tinción automatizado (por ejemplo, un instrumento Ventana BenchMark XT o Benchmark ULTRA; véase, por ejemplo, el Ejemplo 1 a continuación). Las muestras así preparadas se pueden montar y cubrir. A continuación, se determina la evaluación del portaobjetos, por ejemplo, usando un microscopio, y se pueden emplear criterios de intensidad de tinción, usados de forma rutinaria en la técnica. En un caso, se entenderá que, cuando se examinan células y/o tejidos de un tumor usando IHQ, la tinción en general se determina o evalúa en células y/o tejidos tumorales (a diferencia del tejido estromal o circundante que puede estar presente en la muestra). En algunos casos, se entiende que, cuando se examinan células y/o tejido de un tumor usando IHQ, la tinción incluye la determinación o evaluación en células inmunitarias infiltrantes de tumor, incluyendo células inmunitarias intratumorales o peritumorales. En algunos casos, la IHQ detecta la presencia de un biomarcador (por ejemplo, PD-L1) en >0 % de la muestra, en al menos un 1 % de la muestra, en al menos un 5 % de la muestra, en al menos un 10 % de la muestra, en al menos un 15 % de la muestra, en al menos un 20 % de la muestra, en al menos un 25 % de la muestra, en al menos un 30 % de la muestra, en al menos un 35 % de la muestra, en al menos un 40 % de la muestra, en al menos un 45 % de la muestra, en al menos un 50 % de la muestra, en al menos un 55 % de la muestra, en al menos un 60 % de la muestra, en al menos un 65 %

de la muestra, en al menos un 70 % de la muestra, en al menos un 75 % de la muestra, en al menos un 80 % de la muestra, en al menos un 85 % de la muestra, en al menos un 90 % de la muestra, en al menos un 95 % de la muestra o más. Las muestras se pueden clasificar usando cualquiera de los criterios descritos en el presente documento (véase, por ejemplo, la Tabla 2), por ejemplo, mediante análisis por imágenes automatizado o realizado por un anatomopatólogo.

En algunos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, PD-L1 se detecta por inmunohistoquímica usando un anticuerpo de diagnóstico anti-PD-L1. En algunos casos, el anticuerpo diagnóstico de PD-L1 se une específicamente a PD-L1 humano. En algunos casos, el anticuerpo diagnóstico de PD-L1 es un anticuerpo no humano. En algunos casos, el anticuerpo diagnóstico de PD-L1 es un anticuerpo de rata, ratón o conejo. En algunos casos, el anticuerpo diagnóstico de PD-L1 es un anticuerpo de conejo. En algunos casos, el anticuerpo diagnóstico de PD-L1 es un anticuerpo monoclonal. En algunos casos, el anticuerpo diagnóstico de PD-L1 se marca directamente. En otros casos, el anticuerpo diagnóstico de PD-L1 se marca indirectamente.

En algunos casos de cualquiera de los procedimientos precedentes, el nivel de expresión de PD-L1 se detecta en células inmunitarias infiltrantes de tumor, células tumorales o combinaciones de las mismas usando IHQ. Las células inmunitarias infiltrantes de tumor incluyen, pero no se limitan a, células inmunitarias intratumorales, células inmunitarias peritumorales o cualquier combinación de las mismas y otras células estromales tumorales (por ejemplo, fibroblastos). Dichas células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden ser linfocitos T (tales como linfocitos T CD8+ y/o linfocitos T CD4+), linfocitos B u otras células de linaje de médula ósea, incluyendo granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos), monocitos, macrófagos, células dendríticas (por ejemplo, células dendríticas interdigitantes), histiocitos y linfocitos citotóxicos naturales. En algunos casos, la tinción para PD-L1 se detecta como tinción de membrana, tinción citoplásmica y combinaciones de las mismas. En otros casos, la ausencia de PD-L1 se detecta como ausente o sin tinción en la muestra.

En cualquiera de los procedimientos precedentes, el nivel de expresión de un biomarcador (por ejemplo, PD-L1) puede ser un nivel de expresión de ácidos nucleicos. En algunos casos, el nivel de expresión de ácidos nucleicos se determina usando qPCR, rtPCR, RNA-seq, RT-qPCR o qPCR múltiple, análisis de micromatrices, SAGE, técnica MassARRAY o hibridación *in situ* (por ejemplo, HISH). En algunos casos, el nivel de expresión de un biomarcador (por ejemplo, PD-L1) se determina en células tumorales, células inmunitarias infiltrantes de tumor, células estromales o combinaciones de las mismas. En algunos casos, el nivel de expresión de un biomarcador (por ejemplo, PD-L1) se determina en células inmunitarias infiltrantes de tumor. En algunos casos, el nivel de expresión de un biomarcador (por ejemplo, PD-L1) se determina en células tumorales.

Los procedimientos para la evaluación de ARNm en células son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, ensayos de hibridación usando sondas de ADN complementario (tales como hibridación *in situ* usando ribosondas marcadas específicas para el uno o más genes, transferencia Northern y técnicas relacionadas) y diversos ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (tales como RT-PCR usando cebadores complementarios específicos para uno o más de los genes y otros procedimientos de detección de tipo amplificación, tales como, por ejemplo, ADN ramificado, SISBA, TMA y similares). Además, dichos procedimientos pueden incluir una o más etapas que permiten determinar los niveles de ARNm diana en una muestra biológica (por ejemplo, examinando simultáneamente los niveles de una secuencia de ARNm de control comparativo de un gen "constitutivo" tal como un miembro de la familia de la actina). Opcionalmente, se puede determinar la secuencia del ADNc diana amplificado. Los procedimientos opcionales incluyen protocolos que examinan o detectan ARNm, tales como ARNm diana, en una muestra tisular o celular por tecnologías de micromatrices. Usando micromatrices de ácido nucleico, las muestras de ARNm de prueba y control de las muestras tisulares de prueba y control se transcriben inversamente y se marcan para generar sondas de ADNc. A continuación, las sondas se hibridan a una matriz de ácidos nucleicos inmovilizados en un soporte sólido. La matriz se configura de modo que la secuencia y la posición de cada miembro de la matriz son conocidas. Por ejemplo, una selección de genes cuya expresión se correlaciona con un incremento o reducción en el beneficio clínico del tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1 se puede disponer en una matriz en un soporte sólido. La hibridación de una sonda marcada con un miembro de matriz particular indica que la muestra de la que se derivó la sonda expresa ese gen.

En determinados casos, la presencia y/o la cantidad/niveles de expresión de un biomarcador en una primera muestra se incrementan o se elevan en comparación con la presencia/ausencia y/o cantidad/niveles de expresión en una segunda muestra. En determinados casos, la presencia/ausencia y/o la cantidad/niveles de expresión de un biomarcador en una primera muestra disminuyen o se reducen en comparación con la presencia y/o cantidad/niveles de expresión en una segunda muestra. En determinados casos, la segunda muestra es una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control. Las divulgaciones adicionales para determinar la presencia/ausencia y/o la cantidad/niveles de expresión de un gen se describen en el presente documento.

En determinados casos, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control es una única muestra o una combinación de múltiples muestras del mismo sujeto o individuo que se obtienen en uno o más puntos temporales diferentes a cuando se obtiene una muestra de prueba. Por ejemplo, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control

o tejido de control se obtiene en un punto temporal anterior del mismo sujeto o individuo a cuando se obtiene la muestra de prueba. Dicha muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control puede ser útil si la muestra de referencia se obtiene durante el diagnóstico inicial del cáncer y la muestra de prueba se obtiene más tarde cuando el cáncer se vuelve metastásico.

En determinados ejemplos, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control es una combinación de múltiples muestras de uno o más individuos sanos que no son el paciente. En determinados ejemplos, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control es una combinación de múltiples muestras de uno o más individuos con una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) que no son el sujeto o individuo. En determinados ejemplos, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control son muestras de ARN agrupadas de tejidos normales o muestras de plasma o suero agrupadas de uno o más individuos que no son el paciente. En determinados ejemplos, una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control son muestras de ARN agrupadas de tejidos tumorales o muestras de plasma o suero agrupadas de uno o más individuos con una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) que no son el paciente.

En algunos ejemplos de cualquiera de los procedimientos, la expresión incrementada o elevada se refiere a un incremento global de aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor del nivel de biomarcador (por ejemplo, proteína o ácido nucleico (por ejemplo, gen o ARNm)), detectado por procedimientos conocidos de la técnica estándar como los descritos en el presente documento, en comparación con una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control. En determinados ejemplos, la expresión elevada se refiere al incremento en la cantidad/nivel de expresión de un biomarcador en la muestra en el que el incremento es al menos aproximadamente cualquiera de 1,5, 1,75, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 25, 50, 75 o 100 veces la cantidad/nivel de expresión del respectivo biomarcador en una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control. En algunos ejemplos, la expresión elevada se refiere a un incremento global mayor de aproximadamente 1,5 veces, aproximadamente 1,75 veces, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 2,25 veces, aproximadamente 2,5 veces, aproximadamente 2,75 veces, aproximadamente 3,0 veces o aproximadamente 3,25 veces en comparación con una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control, tejido de control o control interno (por ejemplo, gen constitutivo).

En algunos ejemplos de cualquiera de los procedimientos, la expresión reducida se refiere a una reducción global de aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor del nivel de biomarcador (por ejemplo, proteína o ácido nucleico (por ejemplo, gen o ARNm)), detectada por procedimientos conocidos de la técnica estándar como los descritos en el presente documento, en comparación con una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control. En determinados ejemplos, la expresión reducida se refiere a la disminución en la cantidad/nivel de expresión de un biomarcador en la muestra en el que la disminución es al menos aproximadamente cualquiera de 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,05 o 0,01 veces la cantidad/nivel de expresión del respectivo biomarcador en una muestra de referencia, célula de referencia, tejido de referencia, muestra de control, célula de control o tejido de control.

C. Usos terapéuticos

La divulgación proporciona antagonistas de unión al eje de PD-L1 para su uso en el tratamiento de un paciente que padece un cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga (por ejemplo, un cáncer de vejiga urotelial)). Se puede usar cualquiera de los antagonistas de unión al eje de PD-L1 descritos en el presente documento (véase, por ejemplo, la Sección D a continuación) o conocidos en la técnica. En algunos casos se determina la presencia y/o nivel de expresión de PD-L1 en una muestra (por ejemplo, en células inmunitarias infiltrantes de tumor en una muestra tumoral) obtenida de un paciente y se administra un tratamiento antineoplásico al paciente basado en la presencia y/o nivel de expresión de PD-L1 en la muestra, por ejemplo, usando cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento (por ejemplo, los descritos en la Sección A, Sección B o en los Ejemplos a continuación) o conocidos en la técnica.

La divulgación proporciona un antagonista de unión al eje de PD-L1 para su uso en el tratamiento de un paciente que padece un cáncer de vejiga, en el que se ha determinado que una muestra tumoral obtenida del paciente tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende un 1 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 2 % o más, aproximadamente un 3 % o más, aproximadamente un 4 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 6 % o más, aproximadamente un 7 % o más, aproximadamente un 8 % o más, aproximadamente un 9 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 11 % o más, aproximadamente un 12 % o más, aproximadamente un 13 % o más, aproximadamente un 14 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 45 % o más o aproximadamente un 50 % o más) de la muestra tumoral.

La divulgación proporciona además un antagonista de unión al eje de PD-L1 para su uso en el tratamiento de un paciente que padece un cáncer de vejiga, en el que se ha determinado que una muestra tumoral obtenida del paciente es un tumor de subtipo luminal. En algunos casos se ha determinado que el tumor es un tumor del subtipo luminal II.

- 5 En cualquiera de los enfoques precedentes, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden abarcar aproximadamente un 1 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 2 % o más, aproximadamente un 3 % o más, aproximadamente un 4 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 6 % o más, aproximadamente un 7 % o más, aproximadamente un 8 % o más, aproximadamente un 9 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 11 % o más, aproximadamente un 12 % o más, aproximadamente un 13 % o más, aproximadamente un 14 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 45 % o más o aproximadamente un 50 % o más) del área del tumor en una sección de la muestra tumoral obtenida del paciente. Por ejemplo, en algunos casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden abarcar aproximadamente un 1 % o más del área del tumor en una sección de la muestra tumoral. En algunos casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden abarcar aproximadamente un 5 % o más del área del tumor en una sección de la muestra tumoral. En otros casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden abarcar aproximadamente un 10 % o más del área del tumor en una sección de la muestra tumoral. En algunos casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden abarcar aproximadamente un 15 % o más del área del tumor en una sección de la muestra tumoral. Aún en otros casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden abarcar aproximadamente un 20 % o más del área del tumor en una sección de la muestra tumoral. En otros casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden abarcar aproximadamente un 25 % o más del área del tumor en una sección de la muestra tumoral. En algunos casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden abarcar aproximadamente un 30 % o más del área del tumor en una sección de la muestra tumoral. En algunos casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden abarcar aproximadamente un 35 % o más del área del tumor en una sección de la muestra tumoral. En algunos casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden abarcar aproximadamente un 40 % o más del área del tumor en una sección de la muestra tumoral. En algunos casos, las células inmunitarias infiltrantes de tumor pueden abarcar aproximadamente un 50 % o más del área del tumor en una sección de la muestra tumoral.
- 30 En cualquiera de los enfoques precedentes, aproximadamente un 1 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 2 % o más, aproximadamente un 3 % o más, aproximadamente un 4 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 6 % o más, aproximadamente un 7 % o más, aproximadamente un 8 % o más, aproximadamente un 9 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 11 % o más, aproximadamente un 12 % o más, aproximadamente un 13 % o más, aproximadamente un 14 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 45 % o más, aproximadamente un 50 % o más, aproximadamente un 55 % o más, aproximadamente un 60 % o más, aproximadamente un 65 % o más, aproximadamente un 70 % o más, aproximadamente un 75 % o más, aproximadamente un 80 % o más, aproximadamente un 85 % o más, aproximadamente un 90 % o más, aproximadamente un 95 % o más o aproximadamente un 99 % o más) de las células inmunitarias infiltrantes de tumor en la muestra tumoral puede expresar un nivel de expresión detectable de PD-L1.

- La divulgación proporciona un antagonista de unión al eje de PD-L1 para su uso en el tratamiento de un paciente que padece un cáncer de vejiga, en el que se ha determinado que una muestra tumoral obtenida del paciente tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 1 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 2 % o más, aproximadamente un 3 % o más, aproximadamente un 4 % o más, aproximadamente un 5 % o más, aproximadamente un 6 % o más, aproximadamente un 7 % o más, aproximadamente un 8 % o más, aproximadamente un 9 % o más, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 11 % o más, aproximadamente un 12 % o más, aproximadamente un 13 % o más, aproximadamente un 14 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 45 % o más o aproximadamente un 50 % o más) de la muestra tumoral indica que es probable el paciente responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1. Por ejemplo, en algunos casos, un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 1 % o más de la muestra tumoral indica que es probable que el paciente responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1. En algunos casos, un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 5 % o más de la muestra tumoral indica que es probable que el paciente responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1. En otros casos, un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 10 % o más de la muestra tumoral indica que es probable que el paciente responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1. En algunos casos, un cambio en el nivel de uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16) de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 se puede usar para ayudar a determinar el subtipo de tumor. En algunos casos, la muestra tumoral (por ejemplo, una muestra tumoral de CVU) es un tumor de subtipo luminal (por ejemplo, un tumor de subtipo luminal II). La divulgación proporciona un antagonista de unión al eje de PD-L1 para su uso en el tratamiento de un paciente que padece un cáncer de vejiga, en el que se ha determinado que una muestra

tumoral obtenida del paciente es un tumor de subtipo luminal (por ejemplo, un tumor de subtipo luminal de CVU). En algunos casos se ha determinado que el tumor es un tumor del subtipo luminal II. En algunos casos, el nivel de expresión de al menos uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, Grupo A (por ejemplo, FGFR3, miR-99a-5p, miR-100-5p, CDKN2A) y al menos uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, Grupo B (por ejemplo, KRT5, KRT6A, KRT14, EGFR) se pueden usar para determinar la clasificación del subtipo luminal II. En algunos casos, el nivel de expresión de al menos uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, Grupo A (por ejemplo, FGFR3, miR-99a-5p, miR-100-5p, CDKN2A) y al menos uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6) biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, Grupo C (por ejemplo, GATA3, FOXA1, UPK3A, miR-200a-3p, miR-200b-3p, E-cadherina) se pueden usar para determinar la clasificación del subtipo luminal II. En algunos casos, el nivel de expresión de al menos uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, Grupo A (por ejemplo, FGFR3, miR-99a-5p, miR-100-5p, CDKN2A) y al menos uno o más (por ejemplo, 1 o 2) biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, Grupo D (por ejemplo, ERBB2, ESR2) se pueden usar para determinar la clasificación del subtipo luminal II. En algunos casos, el nivel de expresión de al menos uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, Grupo A (por ejemplo, FGFR3, miR-99a-5p, miR-100-5p, CDKN2A); al menos uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6) biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, Grupo C (por ejemplo, GATA3, FOXA1, UPK3A, miR-200a-3p, miR-200b-3p, E-cadherina) y al menos uno o más (por ejemplo, 1 o 2) biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, Grupo D (por ejemplo, ERBB2, ESR2) se pueden usar para determinar la clasificación del subtipo luminal II. En algunos casos, el nivel de expresión de al menos uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, Grupo A (por ejemplo, FGFR3, miR-99a-5p, miR-100-5p, CDKN2A); al menos uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, Grupo B (por ejemplo, KRT5, KRT6A, KRT14, EGFR); al menos uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6) biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, Grupo C (por ejemplo, GATA3, FOXA1, UPK3A, miR-200a-3p, miR-200b-3p, E-cadherina) y al menos uno o más (por ejemplo, 1 o 2) biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, Grupo D (por ejemplo, ERBB2, ESR2) se pueden usar para determinar la clasificación del subtipo luminal II. En cualquiera de los casos precedentes, el nivel de un biomarcador es un nivel de ARNm, un nivel de proteína y/o un nivel de microARN (por ejemplo, miARN).

En algunos casos, un nivel incrementado de expresión de al menos uno de miR-99a-5p, miR-100-5p y CDKN2A y/o un nivel disminuido de expresión de FGFR3 en combinación con un nivel disminuido de expresión de al menos uno de KRT5, KRT6A, KRT14 y EGFR en comparación con los niveles de referencia de los biomarcadores se pueden usar para determinar la clasificación del subtipo luminal II. En algunos casos, un nivel incrementado de expresión de al menos uno de miR-99a-5p, miR-100-5p y CDKN2A y/o un nivel disminuido de expresión de FGFR3 en combinación con un nivel incrementado de expresión de al menos uno de GATA3, FOXA1, UPK3A, miR-200a-3p, miR-200b-3p y E-cadherina en comparación con los niveles de referencia de los biomarcadores se pueden usar para determinar la clasificación del subtipo luminal II. En algunos casos, un nivel incrementado de expresión de al menos uno de miR-99a-5p, miR-100-5p y CDKN2A y/o un nivel disminuido de expresión de FGFR3 en combinación con un nivel incrementado de ERBB2 y/o ESR2 en comparación con los niveles de referencia de los biomarcadores se pueden usar para determinar la clasificación del subtipo luminal II. En algunos casos, un nivel incrementado de expresión de al menos uno de miR-99a-5p, miR-100-5p y CDKN2A y/o un nivel disminuido de expresión de FGFR3; un nivel incrementado de expresión de al menos uno de GATA3, FOXA1, UPK3A, miR-200a-3p, miR-200b-3p y E-cadherina y un nivel incrementado de ERBB2 y/o ESR2 en comparación con los niveles de referencia de los biomarcadores se pueden usar para determinar la clasificación del subtipo luminal II.

En algunos casos, un nivel incrementado de expresión de al menos uno de miR-99a-5p, miR-100-5p y CDKN2A y/o un nivel disminuido de expresión de FGFR3; un nivel disminuido de expresión de al menos uno de KRT5, KRT6A, KRT14 y EGFR y un nivel incrementado de ERBB2 y/o ESR2 en comparación con los niveles de referencia de los biomarcadores se pueden usar para determinar la clasificación del subtipo luminal II. En algunos casos, un nivel incrementado de expresión de al menos uno de miR-99a-5p, miR-100-5p y CDKN2A y/o un nivel disminuido de expresión de FGFR3; un nivel disminuido de expresión de al menos uno de KRT5, KRT6A, KRT14 y EGFR; un nivel incrementado de expresión de al menos uno de GATA3, FOXA1, UPK3A, miR-200a-3p, miR-200b-3p y E-cadherina y un nivel incrementado de ERBB2 y/o ESR2 en comparación con los niveles de referencia de los biomarcadores se pueden usar para determinar la clasificación del subtipo luminal II. En cualquiera de los casos precedentes, el nivel de un biomarcador es un nivel de ARNm, un nivel de proteína y/o un nivel de miARN.

En cualquiera de los enfoques precedentes, el antagonista de unión al eje de PD-L1 puede ser cualquier antagonista de unión al eje de PD-L1 conocido en la técnica o descrito en el presente documento, por ejemplo, en la sección D, a continuación.

Por ejemplo, en algunos casos, el antagonista de unión al eje de PD-L1 se selecciona del grupo que consiste en un antagonista de unión a PD-L1, un antagonista de unión a PD-1 o un antagonista de unión a PD-L2. En algunos casos, el antagonista de unión al eje de PD-L1 es un antagonista de unión a PD-L1. En algunos casos, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a uno o más de sus compañeros de unión a ligando. En otros casos, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1. Aún en otros casos, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a B7-1. En algunos casos, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 tanto a PD-1 como a B7-1. En algunos casos, el antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo. En algunos casos, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: YW243.55.S70, MPDL3280A (atezolizumab), MDX-1105,

MEDI4736 (durvalumab) y MSB0010718C (avelumab). En algunos casos, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de HVR-H1 de SEQ ID NO:19, la secuencia de HVR-H2 de SEQ ID NO:20 y la secuencia de HVR-H3 de SEQ ID NO:21; y una cadena ligera que comprende la secuencia de HVR-L1 de SEQ ID NO:22, la secuencia de HVR-L2 de SEQ ID NO:23 y la 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:25 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4.

En algunos casos, el antagonista de unión al eje de PD-L1 es un antagonista de unión a PD-1. Por ejemplo, en algunos casos, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a uno o más de sus compañeros de unión a ligando. En algunos casos, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L1. En otros casos, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L2. Aún en otros casos, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 tanto a PD-L1 como a PD-L2. En algunos casos, el antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo. En algunos casos, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: MDX 1106 (nivolumab), MK-3475 (pembrolizumab), MEDI-0680 (AMP-514), PDR001, REGN2810 y BGB-108. En algunos casos, el antagonista de unión a PD-1 es una proteína de fusión Fc. Por ejemplo, en algunos casos, la proteína de fusión Fc es AMP-224.

En algunos casos, el tratamiento incluye además administrar al paciente una cantidad eficaz de un segundo agente terapéutico. En algunos casos, el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un agente citotóxico, un agente inhibidor del crecimiento, un agente de radioterapia, un agente antiangiogénico y combinaciones de los mismos. En algunos casos, el segundo agente terapéutico es un agonista dirigido contra una molécula coestimuladora activadora. En algunos casos, el segundo agente terapéutico es un antagonista dirigido contra una molécula coestimuladora inhibidora.

En cualquiera de los casos precedentes, el cáncer de vejiga urotelial, puede ser, por ejemplo, un cáncer de vejiga urotelial invasivo no muscular, un cáncer de vejiga urotelial invasivo muscular o un cáncer de vejiga urotelial metastásico.

Las composiciones descritas en el presente documento (por ejemplo, antagonistas de unión al eje de PD-L1) se pueden administrar por cualquier procedimiento adecuado, que incluye, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, percutánea, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intratecal, intranasal, intravaginal, intrarrectal, tópica, intratumoral, peritoneal, subconjuntival, intravascular, mucosa, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, intraorbital, oral, tópica, transdérmica, intravítrea (por ejemplo, por inyección intravítrea), mediante colirio, inhalación, inyección, implantación, infusión, infusión continua, perfusión localizada que baña directamente las células diana, catéter, lavado, en cremas o en composiciones lipídicas. Las composiciones descritas en el presente documento también se pueden administrar sistémica o localmente. El procedimiento de administración puede variar dependiendo de diversos factores (por ejemplo, el compuesto o composición que se administra y la gravedad de la afección, enfermedad o trastorno que se trata). En algunos casos, el antagonista de unión al eje de PD-L1 se administra por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, tópica, oral, transdérmica, intraperitoneal, intraorbital, por implantación, inhalación, por vía intratecal, intraventricular o intranasal. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo, en parte, de si la administración es breve o crónica. En el presente documento se contemplan diversas pautas de dosificación que incluyen, pero sin limitarse a, administraciones únicas o múltiples durante diversos puntos temporales, administración con inyección intravenosa rápida e infusión intermitente.

Los antagonistas de unión al eje de PD-L1 (por ejemplo, un anticuerpo, polipéptido de unión y/o molécula pequeña) descritos en el presente documento (cualquier agente terapéutico adicional) se pueden formular, dosificar y administrar de forma consecuente con la buena práctica médica. Los factores que se deben tener en consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos. El antagonista de unión al eje de PD-L1 no lo necesita, pero opcionalmente se formula con y/o se administra simultáneamente con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad del antagonista de unión al eje de PD-L1 presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores analizados anteriormente. Estos se usan, en general, en las mismas dosificaciones y por las vías de administración como se describe en el presente documento, o aproximadamente de un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que sea apropiada.

Para la prevención o tratamiento de un cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga (por ejemplo, un cáncer de vejiga urotelial)), la dosificación apropiada de un antagonista de unión al eje de PD-L1 descrito en el presente documento (cuando se usa solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, la gravedad y el transcurso de la enfermedad, si el antagonista de unión al eje de PD-L1 se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, tratamiento previo, la anamnesis del paciente y la respuesta al antagonista de unión al eje de PD-L1, y el criterio del médico especialista. El antagonista de unión al eje

de PD-L1 se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, en general, se prolongaría el tratamiento hasta que se produjera una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Dichas dosis se pueden administrar intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente reciba, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente veinte o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del antagonista de unión al eje de PD-L1). Se puede administrar una dosis de carga mayor inicial, seguido de una o más dosis menores. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. La progresión de este tratamiento se supervisa fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

Por ejemplo, como propuesta general, la cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista de unión al eje de PD-L1 administrada al 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 algunos casos, el anticuerpo usado se administra de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 45 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 35 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg o aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg diariamente, semanalmente, cada dos semanas, cada tres semanas o mensualmente, por ejemplo. En algunos casos, el anticuerpo se administra a 15 mg/kg. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. En un caso, 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, aproximadamente 1500 mg, aproximadamente 1600 mg, aproximadamente 1700 mg o aproximadamente 1800 mg el día 1 de ciclos de 21 días (cada tres semanas, c3s). En algunos casos, el anticuerpo anti-PD-L1 MPDL3280A se administra a 1200 mg por vía intravenosa 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 una politerapia se puede reducir en comparación con la de un tratamiento único. La evolución de este tratamiento se supervisa fácilmente por técnicas convencionales.

En algunos casos, los procedimientos implican además administrar al paciente una cantidad eficaz de un segundo agente terapéutico. En algunos casos, el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un agente citotóxico, un agente quimioterápico, un agente inhibidor del crecimiento, un agente de radioterapia, un agente antiangiogénico y combinaciones de los mismos. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con quimioterapia o un agente quimioterápico. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un agente de radioterapia. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un tratamiento dirigido o un agente terapéutico dirigido. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con inmunoterapia o un agente inmunoterápico, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal. En algunos casos, el segundo agente terapéutico es un agonista dirigido contra una molécula coestimuladora activadora. En algunos casos, el segundo agente terapéutico es un antagonista dirigido contra una molécula coestimuladora inhibidora.

Dichas politerapias indicadas anteriormente engloban la administración combinada (donde se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o en formulaciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso, la administración de un antagonista de unión al eje de PD-L1 se puede producir antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente o agentes terapéuticos adicionales. En un caso, la administración de un antagonista de unión al eje de PD-L1 y la administración de un agente terapéutico adicional se produce en aproximadamente un mes, o en aproximadamente una, dos o tres semanas, o en aproximadamente uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis días, entre sí.

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 algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un agonista dirigido contra una molécula coestimuladora activadora. En algunos casos, una molécula coestimuladora activadora puede incluir CD40, CD226, CD28, OX40, GITR, CD137, CD27, HVEM o CD127. En algunos casos, 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 algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un antagonista dirigido contra una molécula coestimuladora inhibidora. En algunos casos, una molécula coestimuladora inhibidora puede incluir CTLA-4 (también conocido como CD152), TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3, B7-H3, B7-H4, IDO, TIGIT, MICA/B o arginasa. En algunos casos, el antagonista dirigido contra una molécula coestimuladora inhibidora es un anticuerpo antagonista que se une a CTLA-4, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3, B7-H3, B7-H4, IDO, TIGIT, MICA/B o arginasa.

En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un antagonista dirigido contra CTLA-4 (también conocido como CD152), por ejemplo, un anticuerpo bloqueante. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con ipilimumab (también conocido como MDX-010, MDX-101 o YERVOY®). En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con tremelimumab (también conocido como ticilimumab o CP-675.206). En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un antagonista dirigido contra B7-H3 (también conocido como CD276), por ejemplo, un anticuerpo bloqueante. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con MGA271. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 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 algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 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 algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 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 algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un tratamiento que comprende un protocolo HERCREEM (véase, por ejemplo, ClinicalTrials.gov, identificador NCT00889954).

En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un agonista dirigido contra CD137 (también conocido como TNFRSF9, 4-1BB o ILA), por ejemplo, un anticuerpo activador. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con urelumab (también conocido como BMS-663513). En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un agonista dirigido contra CD40, por ejemplo, un anticuerpo activador. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con CP-870893. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un agonista dirigido contra OX40 (también conocido como CD134), por ejemplo, un anticuerpo activador. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un anticuerpo anti-OX40 (por ejemplo, AgonOX). En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un agonista dirigido contra CD27, por ejemplo, un anticuerpo activador. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con CDX-1127. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un antagonista dirigido contra indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO). En algunos casos, el antagonista de IDO es 1-metil-D-triptófano (también conocido como 1-D-MT).

En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un conjugado anticuerpo-fármaco. En algunos casos, el conjugado anticuerpo-fármaco comprende mertansina o monometil auristatina E (MMAE). En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un conjugado de anticuerpo anti-NaPi2b y MMAE (también conocido como DNIB0600A o RG7599). En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con trastuzumab emtansina (también conocido como T-DM1, ado-trastuzumab emtansina o KADCYLA®, Genentech). En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con DMUC5754A. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un conjugado anticuerpo-fármaco dirigido al receptor de endotelina B (EDNBR), por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra EDNBR conjugado con MMAE.

En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un agente antiangiogénesis. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un anticuerpo dirigido contra un VEGF, por ejemplo, VEGF-A. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con bevacizumab (también conocido como AVASTIN®, Genentech). En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un anticuerpo dirigido contra la angiopoyetina 2 (también conocida como Ang2). En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con MEDI3617. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un agente antineoplásico. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un agente dirigido a CSF-1R (también conocido como M-CSFR o CD115). En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con anti-CSF-1R (también conocido como IMC-CS4). En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un interferón, por ejemplo, interferón alfa o interferón gamma. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con Roferon-A (también conocido como interferón alfa-2a recombinante). En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con GM-CSF (también conocido como factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos humano recombinante, rhu GM-CSF, sargramostim o LEUKINE®). En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con IL-2 (también conocido como aldesleukina o PROLEUKIN®). En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con IL-12. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un anticuerpo dirigido a CD20. En algunos casos, el anticuerpo dirigido a CD20 es obinutuzumab (también conocido como GA101 o GAZYVA®) o rituximab. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un anticuerpo dirigido a GITR. En algunos casos, el anticuerpo dirigido a GITR es TRX518.

En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con una vacuna contra el cáncer. En algunos casos, la vacuna contra el cáncer es una vacuna peptídica contra el cáncer, que, en algunos casos, es una vacuna peptídica personalizada. En algunos casos, la vacuna peptídica contra el cáncer es un péptido largo multivalente, un péptido múltiple, una mezcla de péptidos, un péptido híbrido o una vacuna de células dendríticas pulsadas con péptidos (véase, por ejemplo, Yamada *et al.*, *Cancer Sci.* 104:14-21, 2013). En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un adyuvante. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un tratamiento que comprende un agonista de TLR, por ejemplo, Poly-ICLC (también conocido como HILTONOL®), LPS, MPL o CpG ODN. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con factor de necrosis tumoral (TNF) alfa. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con IL-1. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con HMGB1. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un antagonista de IL-10. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un antagonista de IL-4. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un antagonista de IL-13. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un antagonista de HVEM. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un agonista de ICOS, por ejemplo, mediante la administración de ICOS-L, o un anticuerpo agonista dirigido contra ICOS. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un tratamiento dirigido a CX3CL1. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un tratamiento dirigido a CXCL9. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un tratamiento dirigido a CXCL10. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un tratamiento dirigido a CCL5. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un antagonista de LFA-1 o ICAM1. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un agonista de selectina.

En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un tratamiento dirigido. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 y junto con un inhibidor de B-Raf. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con vemurafenib (también conocido como ZELBORAF®). En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con dabrafenib (también conocido como TAFINLAR®). En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con erlotinib (también conocido como TARCEVA®). En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un inhibidor de MEK, tal como MEK1 (también conocido como MAP2K1) o MEK2 (también conocido como MAP2K2). En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con cobimetinib (también conocido como GDC-0973 o XL-518). En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con trametinib (también conocido como MEKINIST®). En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un inhibidor de K-Ras. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un inhibidor de c-Met. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con onartuzumab (también conocido como MetMAB). En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un inhibidor de Alk. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con AF802 (también conocido como CH5424802 o alectinib). En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un inhibidor de una fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K). En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con BKM120. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con idelalisib (también conocido como GS-1101 o CAL-101). En algunos ejemplos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con perifosina (también conocido como KRX-0401). En algunos ejemplos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un inhibidor de un Akt. En algunos ejemplos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con MK2206. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con GSK690693. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un inhibidor de mTOR. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con sirolimus (también conocido como rapamicina). En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con temsirolimus (también conocido como CCI-779 o TORISEL®). En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con everolimus (también conocido como RAD001). En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con ridaforolimus (también conocido como AP-23573, MK-8669 o deforolimus). En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con OSI-027. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con AZD8055. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con INK128. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con un inhibidor dual de PI3K/mTOR. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con XL765. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con GDC-0980. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con BEZ235 (también conocido como NVP-BEZ235). En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con BGT226. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con GSK2126458. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con PF-04691502. En algunos casos se puede administrar un antagonista de unión al eje de PD-L1 junto con PF-05212384 (también conocido como PKI-587).

D. Antagonistas de unión al eje de PD-L1

En el presente documento se proporcionan antagonistas de unión al eje de PD-L1 para su uso para tratar o retrasar la progresión de un cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga (por ejemplo, un cáncer de vejiga urotelial)) en un paciente que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-L1. En el presente documento se proporcionan procedimientos para determinar si es probable que un paciente que padece un cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga (por ejemplo, un cáncer de vejiga urotelial)) responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1. En el presente documento se proporcionan procedimientos para predecir la reactividad de un paciente que padece un cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga (por ejemplo, un cáncer de vejiga urotelial)) al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1. En el presente documento se proporcionan procedimientos para seleccionar un tratamiento para un paciente que padece un cáncer (por ejemplo, un cáncer de vejiga (por ejemplo, un cáncer de vejiga urotelial)). Cualquiera de los procedimientos precedentes se puede basar en el nivel de expresión de un biomarcador proporcionado en el presente documento, por ejemplo, expresión de PD-L1 en una muestra tumoral, por ejemplo, en células inmunitarias infiltrantes de tumor.

Por ejemplo, un antagonista de unión al eje de PD-L1 incluye un antagonista de unión a PD-1, un antagonista de unión a PD-L1 y un antagonista de 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 denomina en la técnica "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 denomina en la técnica "ligando 2 de muerte celular programada 1", "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 algunos casos, PD-1, PD-L1 y PD-L2 son PD-1, PD-L1 y PD-L2 humanos.

En algunos casos, el antagonista de 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 otro caso, un antagonista de unión a PD-L1 es una molécula que inhibe la unión de PD-L1 a sus ligandos de unión. En un aspecto específico, los compañeros de unión de PD-L1 son PD-1 y/o B7-1. En otro caso, el antagonista de unión a PD-L2 es una molécula que inhibe la unión de PD-L2 a sus compañeros de unión ligandos. En un aspecto específico, el compañero de unión ligando 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 algunos casos, el antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 (por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico), por ejemplo, como se describe a continuación. En algunos casos, el anticuerpo anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste en MDX-1106 (nivolumab), MK-3475 (pembrolizumab), MEDI-0680 (AMP-514), PDR001, REGN2810 y BGB-108. 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 WO2006/121168. MK-3475, también conocido como lambrolizumab, es un anticuerpo anti-PD-1 descrito en el documento WO 2009/114335. En algunos casos, el antagonista de 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 algunos casos, el antagonista de unión a PD-1 es AMP-224. AMP-224, también conocido como B7-DCIg, es un receptor soluble de fusión PD-L2-Fc descrito en los documentos WO 2010/027827 y WO 2011/066342.

En algunos casos, el anticuerpo anti-PD-1 es MDX-1106. Los nombres alternativos para "MDX-1106" incluyen MDX-1106-04, ONO-4538, BMS-936558 y nivolumab. En algunos casos, el anticuerpo anti-PD-1 es nivolumab (número de registro de CAS: 946414-94-4). Todavía en otro caso 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 otro caso 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:

QVQLVESGGGVVQPGSRSLRDLCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKRYYADSVKGR
 FTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA
 LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVK
 DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE
 VHNATKTPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
 VFSCSVMHREALHNYHTQKSLSLSLGK (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:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAIGIPARFSGSGSGTD
 FTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYF
 REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFN
 RGEC (SEQ ID NO:2).

- En algunos casos, el antagonista de unión al eje de PD-L1 es un antagonista de unión a PD-L2. En algunos casos, el antagonista de unión a PD-L2 es un anticuerpo anti-PD-L2 (por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico). En algunos casos, el antagonista de unión a PD-L2 es una inmunoadhesina.

- En algunos casos, el antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1, por ejemplo, como se describe a continuación. En algunos casos, el anticuerpo anti-PD-L1 puede inhibir la unión entre PD-L1 y PD-1 y/o entre PD-L1 y B7-1. En algunos casos, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal. En algunos casos, 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 algunos casos, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo humanizado. En algunos casos, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo humano. En algunos casos, el anticuerpo anti-PD-L1 se selecciona del grupo que consiste en YW243.55.S70, MPDL3280A (atezolizumab), MDX-1105 y MEDI4736 (durvalumab) y MSB0010718C (avelumab). 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 WO2007/005874. MEDI4736 (durvalumab) es un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 descrito en el documento WO2011/066389 y el documento US2013/034559. Los ejemplos de anticuerpos anti-PD-L1 útiles para los procedimientos de la presente invención y los procedimientos para preparar los mismos se describen en las solicitudes de patente PCT WO 2010/077634, WO 2007/005874, WO 2011/066389, en la patente de EE. UU. n.º 8.217.149 y en el documento US 2013/034559.

- Los anticuerpos anti-PD-L1 descritos en el documento WO 2010/077634 A1 y en el documento US 8.217.149 se pueden usar en los procedimientos descritos en el presente documento. En algunos casos, 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 otro caso 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:

- (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:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAVISPYGGSTYYADSVKGRF
 TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVSA (SEQ ID NO:3), 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:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFVSGVPSRFSGSGSGTD
 FTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKEIKR (SEQ ID NO:4).

En un caso, 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);

- 5 en la que además: X₁ es D o G; X₂ es S o L; X₃ es T o S. En un aspecto específico, X₁ es D; X₂ es S y X₃ es T. En otro aspecto, el polipéptido comprende además secuencias estructurales de cadena pesada de región variable yuxtapuestas entre las HVR de acuerdo con la fórmula: (FR-H1)-(HVR-H1)-(FR-H2)-(HVR-H2)-(FR-H3)-(HVR-H3)-(FR-H4). 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.
- 10 Todavía en otro aspecto, al menos una de las secuencias estructurales es la siguiente:

FR-H1 es EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:8)
 FR-H2 es WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:9)
 FR-H3 es RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:10)
 FR-H4 es WGQGTLVTVSA (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:

- 15
- (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 es H; X₁₅ es A.

- 20 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: (FR-L1)-(HVR-L1)-(FR-L2)-(HVR-L2)-(FR-L3)-(HVR-L3)-(FR-L4). 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.
- 25 Todavía en otro aspecto, al menos una de las secuencias estructurales es la siguiente:

FR-L1 es DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:15)
 FR-L2 es WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:16)
 FR-L3 es GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:17)
 FR-L4 es FGQGTVKVEIKR (SEQ ID NO:18).

En otro caso 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:

- 30
- (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)
- 35

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.

En otro aspecto, la región variable de cadena pesada comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (FR-H1)-(HVR-H1)-(FR-H2)-(HVR-H2)-(FR-H3)-(HVR-H3)-(FR-H4), y las regiones variables de cadena ligera comprenden una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (FR-L1)-(HVR-L1)-(FR-L2)-(HVR-L2)-(FR-L3)-(HVR-L3)-(FR-L4). 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.

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 e 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 e 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 otro caso, la mutación de Fc sin efector es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

Aún en otro caso 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:

(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

(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.

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: (FR-H1)-(HVR-H1)-(FR-H2)-(HVR-H2)-(FR-H3)-(HVR-H3)-(FR-H4), y las regiones variables de cadena ligera comprenden una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (FR-L1)-(HVR-L1)-(FR-L2)-(HVR-L2)-(FR-L3)-(HVR-L3)-(FR-L4). 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.

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 e 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 e 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 otro caso, la mutación de Fc sin efector es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

En otro caso 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:

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

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

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

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:4).

- 15 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: (FR-H1)-(HVR-H1)-(FR-H2)-(HVR-H2)-(FR-H3)-(HVR-H3)-(FR-H4), y las regiones variables de cadena ligera comprenden una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (FR-L1)-(HVR-L1)-(FR-L2)-(HVR-L2)-(FR-L3)-(HVR-L3)-(FR-L4). 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 WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:27).

- 25 Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo kappa I, II, II 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.

- 30 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 e 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 e 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 otro caso, la mutación de Fc sin efector es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

- 40 En otro aspecto, la región variable de cadena pesada comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (FR-H1)-(HVR-H1)-(FR-H2)-(HVR-H2)-(FR-H3)-(HVR-H3)-(FR-H4), y las regiones variables de cadena ligera comprenden una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (FR-L1)-(HVR-L1)-(FR-L2)-(HVR-L2)-(FR-L3)-(HVR-L3)-(FR-L4). 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.

- 45 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:

FR-H1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	(SEQ ID NO:29)
FR-H2	WVRQAPGKGLEWVA	(SEQ ID NO:30)
FR-H3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO:10)
FR-H4	WGQGTLLTVSS	(SEQ ID NO:27).

- 55 Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo kappa I, II, II 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:

FR-L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC	(SEQ ID NO:15)
FR-L2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO:16)
FR-L3	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO:17)
FR-L4	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, IgG2, IgG3 e 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 e 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 otro caso, la mutación de Fc sin efector es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

Aún en otro caso 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: (FR-H1)-(HVR-H1)-(FR-H2)-(HVR-H2)-(FR-H3)-(HVR-H3)-(FR-H4), y las regiones variables de cadena ligera comprenden una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (FR-L1)-(HVR-L1)-(FR-L2)-(HVR-L2)-(FR-L3)-(HVR-L3)-(FR-L4). 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 WGQGTSLTVSSASTK (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, IgG2, IgG3 e 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 e 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 otro caso, la mutación de Fc sin efector es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

Todavía en otro caso 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
TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTSLTVSSASTK (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:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:4).

En algunos casos 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 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 algunos casos 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 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 algunos casos 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 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 algunos casos, uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos de aminoácido en el extremo N de la cadena pesada y/o ligera se pueden delecionar, sustituir o modificar.

Todavía en otro caso se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de la 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:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAVISPYGGSTYYADSVKGRF
TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
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:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC (SEQ ID NO:33).

En algunos casos 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 algunos casos 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 algunos casos 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 algunos casos, el anticuerpo anti-PD-L1 aislado está aglucosilado. La glucosilación de anticuerpos se realiza típicamente mediante enlaces N-glucosídicos o bien mediante enlaces O-glucosídicos. Se realiza mediante enlaces N-glucosídicos se refiere al acoplamiento del resto glucídico a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas 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 tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación mediante enlaces O-glucosídicos 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 mediante enlaces N-glucosídicos). La alteración se puede realizar por sustitución de un residuo de asparagina, serina o treonina dentro del sitio de glucosilación con otro residuo de aminoácido (por ejemplo, glicina, alanina o una sustitución conservadora).

En cualquiera de los casos 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 otro caso se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento. En algunos casos, 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 fragmentos 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.

Se contempla expresamente que dichos anticuerpos antagonistas de unión al eje de PD-L1 (por ejemplo, anticuerpos anti-PD-L1, anticuerpos anti-PD-1 y anticuerpos anti-PD-L2) u otros anticuerpos descritos en el presente documento (por ejemplo, anticuerpos anti-PD-L1 para la detección de los niveles de expresión de PD-L1) para su uso en cualquiera de los casos enumerados anteriormente puedan tener cualquiera de los rasgos característicos, individualmente o en combinación, descritos en las Secciones 1-7 a continuación.

1. Afinidad de los anticuerpos

En determinados casos, un anticuerpo proporcionado en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 o un anticuerpo anti-PD-1) tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ 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 un caso, Kd se mide por un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA). En un caso, se realiza un RIA con la versión de Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno. Por ejemplo, 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 (pH 9,6) y posteriormente se bloquea con soroalbúmina 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 [^{125}I]-antígeno 100 pM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, consecuente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta *et al.*, *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). A continuación, el Fab de interés se incuba durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo de tiempo mayor (por ejemplo, aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcanza el equilibrio. Después de esto, las mezclas

se transfieren a la placa de captura para su incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). A continuación, se retira la solución y la placa se lava ocho veces con polisorbato 20 (TWEEN-20®) al 0,1 % en PBS. Cuando las placas se han secado, se agregan 150 µl/pocillo de centelleador (MICROSCINT-20™; Packard), y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab con una unión inferior o igual a un 20 % de la unión máxima se eligen para su uso en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otro caso, K_d se mide usando un ensayo de resonancia de plasmones superficiales BIACORE®. Por ejemplo, se realiza un ensayo usando un BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips CM5 con antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). En un caso, los chips de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore, Inc.) se activan 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, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de su inyección a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones seriadas a 1/2 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_{as}) 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 sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calcula como la proporción k_{dis}/k_{as}. Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). Si la velocidad de asociación supera 10⁶ M⁻¹ s⁻¹ mediante el ensayo de resonancia de plasmones superficiales anterior, entonces la velocidad de asociación se puede determinar usando una técnica de desactivación 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.

2. Fragmentos de anticuerpo

En determinados casos, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 o un anticuerpo anti-PD-1) proporcionado en el presente documento es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv y scFv y otros fragmentos descritos a continuación. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Para una revisión de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York), pp. 269-315 (1994); véanse también el documento WO 93/16185 y las patentes de EE. UU. n.º 5.571.894 y 5.587.458. Para un análisis de los fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden residuos de epítipo de unión al receptor de rescate y que tienen una semivida *in vivo* incrementada, véase la patente de EE. UU. n.º 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véanse, 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).

Los anticuerpos de un único dominio son fragmentos de anticuerpo que comprenden todo o una parte del dominio variable de la cadena pesada o todo o una parte del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En determinados casos, un anticuerpo de un único dominio es un anticuerpo de un único dominio humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.248.516 B1).

Se pueden preparar fragmentos de anticuerpo por diversas técnicas que incluyen, pero sin limitarse a, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como producción mediante células huésped recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en el presente documento.

3. Anticuerpos quiméricos y humanizados

En determinados casos, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 o un anticuerpo anti-PD-1) proporcionado en el presente documento es un anticuerpo quimérico. Se describen determinados anticuerpos quiméricos, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 4.816.567 y en 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 con respecto a la del anticuerpo original. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

En determinados casos, el anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente, se humaniza un anticuerpo no humano para reducir la inmunogenicidad con respecto a 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), derivan de un anticuerpo no humano y las FR (o partes de las mismas) derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante humana. En algunos casos se sustituyen algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado por los residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que derivan los residuos de HVR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los procedimientos de preparación de los mismos 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.º 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 de región determinante de especificidad (SDR)); Padlan, *Mol. Immunol* 28: 489-498 (1991) (que describe el "rechapado"); Dall'Acqua *et al.*, *Methods* 36:43-60 (2005) (que describe el "reordenamiento de FR"); y Osbourn *et al.*, *Methods* 36:61-68 (2005) y Klimka *et al.*, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (que describen el enfoque de "selección guiada" con respecto al reordenamiento 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 las 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 (mutadas de manera somática) maduras 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)).

4. Anticuerpos humanos

En determinados casos, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 o un anticuerpo anti-PD-1) proporcionado en el presente documento es un anticuerpo humano. Se pueden producir anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos humanos se describen, en general, 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 intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a la exposición antigénica. Dichos animales contienen típicamente todo o una parte de los locus de inmunoglobulina humana, que remplazan 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 a partir de animales transgénicos, véase Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Véanse también, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 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 KM 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 intactos generados por dichos animales se pueden modificar adicionalmente, por ejemplo, por combinación con una región constante humana diferente.

También se pueden preparar anticuerpos humanos por procedimientos basados en hibridoma. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma humano-murino para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. Véanse, 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 por medio de tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos también se describen en Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Los 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 hibridoma) y Ni, *Xiandai Miaryixue*, 26(4):265-268 (2006) (que describe hibridomas humano-humano). La tecnología de hibridoma humano (tecnología Trioma) también se describe en Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y 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.

5. Anticuerpos derivados de colecciones

Los anticuerpos de la divulgación (por ejemplo, anticuerpos anti-PD-L1 y anticuerpos anti-PD-1) se pueden aislar cribando colecciones combinatorias para determinar anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, una variedad de procedimientos son conocidos en la técnica para generar colecciones de presentación en fagos y cribar dichas colecciones para determinar los anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Dichos procedimientos 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). Los fagos típicamente 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). Por último, 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 para conseguir el reordenamiento *in vitro*, como se describe en Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388 (1992). Las publicaciones de patente que describen colecciones de fagos-anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: la patente de EE. UU. n.º 5.750.373 y las publicaciones de patente de EE. UU. n.º 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.

En el presente documento, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo aislados de colecciones de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpo humano.

6. Anticuerpos multiespecíficos

En cualquiera de los aspectos anteriores, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 o un anticuerpo anti-PD-1) proporcionado en el presente documento puede ser un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos sitios diferentes. En determinados casos, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. En determinados casos, una de las especificidades de unión es para PD-L1 y la otra es para cualquier otro antígeno. En determinados casos, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítomos diferentes de PD-L1. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos con respecto a las células que expresan PD-L1. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

Las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tienen especificidades diferentes (véase Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983), el documento WO 93/08829 y Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10:3655 (1991)) y la tecnología de "botón en ojal" (knob-in-hole) (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.731.168). Los anticuerpos multiespecíficos también se pueden preparar mediante tecnología de efectos de la orientación por interacción electrostática para preparar moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpos (véase, por ejemplo, el documento WO 2009/089004A1); reticulación de dos o más anticuerpos o fragmentos (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.676.980 y Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985)); uso de cremalleras de leucinas para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148 (5):1547-1553 (1992)); uso de tecnología de "diacuerpo" para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Hollinger y *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993)); uso de dímeros de Fv monocatenario (sFv) (véase, por ejemplo, Gruber *et al.*, *J. Immunol.* 152:5368 (1994)) y preparación de anticuerpos trispecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147:60 (1991).

En el presente documento también se incluyen anticuerpos genomanipulados con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluyendo los "anticuerpos pulpo" (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576A1).

El anticuerpo o fragmento en el presente documento también incluye un "FAB de doble acción" o "DAF" que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a PD-L1 así como a otro antígeno diferente.

7. Variantes de anticuerpo

En determinados casos se contemplan variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos de la divulgación (por ejemplo, anticuerpos anti-PD-L1 y anticuerpos anti-PD-1). Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se pueden preparar variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o por 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 preparar cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno.

I. Variantes de sustitución, inserción y deleción

En determinados casos se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las HVR y las FR. Se muestran sustituciones conservadoras en la Tabla 2 bajo el encabezado "sustituciones preferentes". Se proporcionan cambios más sustanciales en la Tabla 2 bajo el encabezado de "sustituciones ejemplares" y como se describe además a continuación en referencia a las clases de cadena lateral de aminoácidos. Se pueden introducir sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y se pueden cribar los productos para una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno retenida/mejorada, inmunogenicidad disminuida, o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mejoradas.

Tabla 2. Sustituciones de aminoácidos ejemplares y preferentes

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

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

- (1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

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

- 5 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 y/o inmunogenicidad reducida) con respecto al anticuerpo original y/o habrá(n) retenido sustancialmente determinadas propiedades biológicas del anticuerpo original. Una variante de sustitución
- 10 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, la afinidad de unión).
- 15 Se pueden realizar alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en las HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad de los anticuerpos. Se pueden realizar dichas alteraciones en "puntos calientes" de la HVR, es decir, residuos codificados por codones que se someten a una mutación con frecuencia alta durante el proceso de maduración somática (véase, por ejemplo, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)) y/o residuos que están en contacto con el antígeno, sometiendo a prueba la variante VH o VL resultante para determinar su afinidad de unión. La maduración de la afinidad
- 20 por construcción y nueva selección 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 algunos casos de maduración de la afinidad se introduce diversidad en los genes variables elegidos para la maduración por cualquiera de una variedad de procedimientos (por ejemplo, PCR propensa a error, reordenamiento de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). A continuación, se crea una segunda colección. A continuación, se criba la colección
- 25 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 mutagénesis o modelado por barrido de alanina. A menudo se seleccionan como diana en particular CDR-H3 y CDR-L3.
- 30 En determinados casos se pueden producir sustituciones, inserciones o deleciones en 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
- 35 estar, por ejemplo, fuera de los residuos en contacto con el antígeno en las HVR. En determinados casos de las secuencias de las VH y VL variantes proporcionadas anteriormente, cada HVR está inalterada o bien no contiene más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.
- 40 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
- 45 sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. De forma alternativa, o adicional, 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 como diana o eliminar como candidatos para la sustitución. Se pueden cribar las variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.
- 50 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 de aminoácidos 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
- 55 del anticuerpo.

II. Variantes de glucosilación

- 60 En determinados casos, los anticuerpos de la divulgación se pueden alterar para incrementar o disminuir el grado en el que el anticuerpo se glucosila. La adición o delección de sitios de glucosilación a un anticuerpo de la divulgación se puede conseguir convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se cree o elimine uno o más sitios de glucosilación.

- 65 Si el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato unido a la misma. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero típicamente comprenden un oligosacárido biantenarico ramificado que se une, en general, mediante un enlace N-glucosídico 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 carbohidratos, 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 algunos casos se pueden realizar modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la divulgación para crear variantes de anticuerpo con determinadas propiedades mejoradas.

En un caso se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. 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 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de glúcidos 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 en el documento WO 2008/077546, por ejemplo. 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, 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 ADCC mejorada. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de EE. UU. n.º US 2003/0157108 y US 2004/0093621. Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpo "desfucosilado" o "carente de fucosa" incluyen: 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; WO2005/053742; WO2002/031140; 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 deficitarias en 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, Adams *et al.*, especialmente en el Ejemplo 11) y líneas celulares inactivadas, tales como el gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO inactivadas (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 WO2003/085107.

Se pueden proporcionar además variantes de anticuerpo con oligosacáridos bisegmentados, por ejemplo, en las que un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo está bisegmentado por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una fucosilación reducida y/o función ADCC mejorada. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpo, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878; la patente de EE. UU. n.º 6.602.684 y el documento US 2005/0123546. También se proporcionan variantes de anticuerpo con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una función CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en los documentos WO 1997/30087; WO 1998/58964 y WO 1999/22764.

III. Variantes de la región Fc

En determinados casos se pueden introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo de la divulgación, 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 determinados casos, la divulgación contempla una variante de anticuerpo que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, lo que la convierte en un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, aunque determinadas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son 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 CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo ensayos de unión al receptor de Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carezca de unión a FcγR (de ahí que probablemente carezca de actividad ADCC), pero que retenga su capacidad de unión a FcRn. Las células principales para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, expresan solo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. 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). Los ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362 (véanse, por ejemplo, Hellstrom, I. *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); la patente de EE. UU. n.º 5.821.337 (véase Bruggemann, M. *et al.*, *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). De forma alternativa, se pueden emplear procedimientos de ensayos no radioactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA) y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo 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 adicional, se puede evaluar la actividad ADCC de la molécula de interés *in vivo*, 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 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 (véase, 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 la unión al FcRn y las determinaciones de la eliminación/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 (patentes de EE. UU. n.º 6.737.056 y 8.219.149). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácido 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el mutante de Fc llamado "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 con alanina (patentes de EE. UU. n.º 7.332.581 y 8.219.149).

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

En determinados casos, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de los residuos).

En algunos casos 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 reducidas), 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 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 a 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, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, la sustitución del residuo de la región Fc 434 (patente de EE. UU. n.º 7.371.826).

Véanse 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 en relación con otros ejemplos de variantes de la región Fc.

IV. Variantes de anticuerpos genomanipulados con cisteína

En determinados casos puede ser deseable crear anticuerpos genomanipulados con cisteína, por ejemplo, "tioAcM", en los que uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen por residuos de cisteína. En casos particulares se producen los residuos sustituidos en sitios accesibles del anticuerpo. Sustituyendo esos residuos por cisteína, los grupos tiol reactivos se sitúan de este modo en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden usar para conjugar el anticuerpo a otros restos, tales como restos de fármaco o restos de conector-fármaco, para crear un inmunoconjugado, como se describe adicionalmente en el presente documento. En determinados casos se puede sustituir uno cualquiera o más de los siguientes residuos por cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Se pueden generar anticuerpos genomanipulados con cisteína como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.521.541.

V. Derivados de anticuerpos

En determinados casos, un anticuerpo proporcionado en el presente documento se puede modificar además para que contenga restos no proteínicos adicionales que son conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles. Los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles 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 poli(óxido de propileno)/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y mezclas de los mismos. El polietilenglicol-propionaldehído puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y, si se une 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 no se limitan 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.

En otro caso se proporcionan conjugados de un anticuerpo y un resto no proteínico que se pueden calentar de forma selectiva mediante exposición a radiación. En un caso, el resto no proteínico es un nanotubo de carbono (Kam *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda e incluye, pero no se limita a, las longitudes de onda que no dañan a las células normales, pero que calientan el resto no proteínico a una temperatura en la que se destruyen las células proximales al anticuerpo-resto no proteínico.

VI. Inmunoconjugados

La invención también proporciona inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 o un anticuerpo anti-PD-1) conjugado a uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes o fármacos quimioterápicos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas proteínicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o fragmentos de las mismas) o isótopos radioactivos.

En un caso, un inmunoconjugado es un conjugado anticuerpo-fármaco (CAF) en el que el anticuerpo se conjuga a uno o más fármacos, que incluyen, pero sin limitarse a, un maytansinoide (véanse las patentes de EE. UU. n.º 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1); una auristatina tal como restos de fármaco de monometilauristatina DE y DF (MMAE y MMAF) (véanse las patentes de EE. UU. n.º 5.635.483 y 5.780.588 y 7.498.298); una dolastina; una calicheamicina o derivado de la misma (véanse las patentes de EE. UU. n.º 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001 y 5.877.296; Hinman *et al.*, *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993) y Lode *et al.*, *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)); una antraciclina tal como daunomicina o doxorubicina (véanse Kratz *et al.*, *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey *et al.*, *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov *et al.*, *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000); Dubowchik *et al.*, *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); King *et al.*, *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002) y la patentes de EE. UU. n.º 6.630.579); metotrexato; vindesina; un taxano tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno y CC1065.

En otro caso, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado a una toxina enzimáticamente activa o fragmento de la misma, incluyendo, pero sin limitarse a, la cadena A de difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina diftérica, la cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

En otro caso, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado a un átomo radioactivo para formar un radioconjugado. Una variedad de isótopos radioactivos está disponible para la producción de radioconjugados. Los ejemplos incluyen At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radioactivos de Lu. Cuando se usa el radioconjugado para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para estudios gammagráficos, por ejemplo, tc99m o I¹²³, o un marcador de espín para resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como resonancia magnética, RM), tal como yodo-123, de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro. Los conjugados de un anticuerpo y un agente citotóxico se pueden preparar usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis-(p-azidobenzoi)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoi)etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina, como se describe en Vitetta *et al.*, *Science* 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionúclido al anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El conector puede ser un "conector escindible" que facilite la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede usar un conector lábil en ácido, conector sensible a peptidasa, conector fotolábil, conector de dimetilo o conector que contiene disulfuro (Chari *et al.*, *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); patente de EE. UU. n.º 5.208.020).

Los inmunoconjugados o CAF en el presente documento contemplan expresamente, pero no se limitan a, dichos conjugados preparados con reactivos de reticulación, incluyendo, pero sin limitarse a, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, sulfo-SMPB, y SVSB ((4-vinilsulfona)benzoato de succinimidilo), que están disponibles comercialmente (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE. UU.).

V. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas de los antagonistas de unión al eje de PD-L1 usadas de acuerdo con la presente divulgación (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, MPDL3280A)) se preparan para almacenamiento

mezclando el antagonista que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Para información general sobre las formulaciones, véanse, por ejemplo, Gilman *et al.* (eds.), *The Pharmacological Bases of Therapeutics*, 8.^a ed., Pergamon Press, 1990; A. Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18.^a edición, Mack Publishing Co., Pensilvania, 1990; Avis *et al.* (eds.), *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications* Dekker, Nueva York, 1993; Lieberman *et al.* (eds.), *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets* Dekker, Nueva York, 1990; Lieberman *et al.* (eds.), *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems* Dekker, Nueva York, 1990 y Walters (ed.), *Dermatological and Transdermal Formulations* (Drugs and the Pharmaceutical Sciences), Vol 119, Marcel Dekker, 2002.

Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen 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 carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; glúcidos tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

La formulación en el presente documento también puede contener más de un compuesto activo, preferentemente aquellos que tienen actividades complementarias que no resultan afectadas de manera adversa entre sí. El tipo y las cantidades eficaces de dichos medicamentos dependen, por ejemplo, de la cantidad y tipo de antagonista presente en la formulación y de los parámetros clínicos de los sujetos.

Los ingredientes activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por 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 prolongada incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el antagonista, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación prolongada incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) o poli(vinilalcohol)), polilactidas (patente de EE. UU. n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, copolímeros de etileno y acetato de vinilo no degradables, copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas de copolímero ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones que se van a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se entenderá que cualquiera de los artículos de fabricación anteriores puede incluir un inmunoconjugado descrito en el presente documento en lugar de o además de un antagonista de unión al eje de PD-L1.

VI. Kits de diagnóstico y artículos de fabricación

En el presente documento se proporcionan kits de diagnóstico que comprenden uno o más reactivos para determinar la presencia de un biomarcador (por ejemplo, niveles de expresión de PD-L1, por ejemplo, en células inmunitarias infiltrantes de tumor) en una muestra de un individuo o paciente con una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer, incluyendo el cáncer de vejiga). En algunos casos, la presencia del biomarcador en la muestra indica una mayor probabilidad de eficacia cuando se trata al individuo con un antagonista de unión al eje de PD-L1. En algunos casos, la ausencia del biomarcador en la muestra indica una menor probabilidad de eficacia cuando se trata al individuo con la enfermedad con el antagonista de unión al eje de PD-L1. Opcionalmente, el kit puede incluir además instrucciones de uso del kit para seleccionar un medicamento (por ejemplo, un antagonista de unión al eje de PD-L1, tal como un anticuerpo anti-PD-L1, tal como MPDL3280A) para tratar la enfermedad o trastorno si el individuo expresa el biomarcador en la muestra. En otro caso, las instrucciones son para usar el kit para seleccionar un medicamento distinto del antagonista de unión al eje de PD-L1 si el individuo no expresa el biomarcador en la muestra.

En el presente documento también se proporcionan artículos de fabricación que incluyen, envasados juntos, un antagonista de unión al eje de PD-L1 (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1) en un vehículo farmacéuticamente aceptable y un prospecto del envase que indica que el antagonista de unión al eje de PD-L1 (por ejemplo, anticuerpo

anti-PD-L1) es para tratar a un paciente con una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) en base a la expresión de un biomarcador. Los procedimientos de tratamiento incluyen cualquiera de los procedimientos de tratamiento divulgados en el presente documento. La invención también se refiere a un procedimiento para fabricar un artículo de fabricación que comprende combinar en un envase una composición farmacéutica que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1 (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1) y un prospecto del envase que indica que la composición farmacéutica es para tratar a un paciente con una enfermedad o trastorno en base a la expresión de un biomarcador (por ejemplo, niveles de expresión de PD-L1, por ejemplo, en células tumorales y/o células inmunitarias infiltrantes de tumor).

El artículo de fabricación puede incluir, por ejemplo, un recipiente y una ficha técnica o prospecto del envase en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas y similares. El recipiente se puede formar a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente alberga o contiene una composición que comprende el medicamento contra el cáncer como agente activo y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica).

El artículo de fabricación puede incluir además un segundo recipiente que comprende un tampón diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (BWHI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y/o solución de dextrosa. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

El artículo de fabricación también puede incluir información, por ejemplo, en forma de un prospecto del envase, que indica que la composición se usa para tratar el cáncer en base al nivel de expresión del/de los biomarcador(es) en el presente documento. El prospecto o ficha técnica puede adoptar cualquier forma, tal como papel o en un medio electrónico tal como un medio grabado magnéticamente (por ejemplo, un disquete), un CD-ROM, una memoria flash bus universal en serie (USB) y similares. La ficha técnica o prospecto también puede incluir otra información respecto a las composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas en el kit o artículo de fabricación.

EJEMPLOS

Se proporcionan los siguientes ejemplos para ilustrar, pero no para limitar, la presente invención reivindicada.

Ejemplo 1: Análisis inmunohistoquímico (IHQ) de la expresión de PD-L1 en muestras tumorales

Inmunohistoquímica (IHQ): Se desparafinaron secciones tisulares fijadas en formol e incluidas en parafina antes de la recuperación, bloqueo e incubación del antígeno con anticuerpo anti-PD-L1 primario. Después de la incubación con anticuerpo secundario y desarrollo de color enzimático, se contratiñeron las secciones y se deshidrataron en series de alcoholes y xilenos antes de la cobertura. Se usó el siguiente protocolo para IHQ. Se usó el sistema Ventana Benchmark XT o Benchmark Ultra para realizar la tinción IHQ de PD-L1 usando los siguientes reactivos y materiales:

Anticuerpo primario: anticuerpo primario monoclonal de conejo anti-PD-L1

Tipo de muestra: sección fijada en formol e incluida en parafina (FFIP) de muestras tumorales

Condiciones de recuperación del epítipo: acondicionamiento celular, estándar 1 (CC1, Ventana, n.º cat. 950-124)

Condiciones de los anticuerpos primarios: 1/100, 6,5 µg/ml durante 16 minutos a 36 °C

Diluyente: tampón de dilución de anticuerpos (solución salina tamponada con Tris que contiene proteína transportadora y BRIJ™-35)

Control negativo: IgG de conejo sin exposición previa a 6,5 µg/ml (Cell Signaling) o diluyente solo

Detección: se usaron el kit Optiview o ultraview Universal DAB Detection (Ventana) y el kit de amplificación (según sea aplicable) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Ventana).

Contratinción: hematoxilina II de Ventana (n.º cat. 790-2208)/con reactivo Bluing (n.º cat. 760-2037) (4 minutos y 4 minutos, respectivamente)

El protocolo Ventana Benchmark fue como sigue:

1. Parafina (seleccionado)

2. Desparafinación (seleccionado)

3. Acondicionamiento celular (seleccionado)
4. Acondicionador n.º 1 (seleccionado)
- 5 5. CC1 estándar (seleccionado)
6. Temperaturas de incubación de Ac (seleccionado)
7. 36C Ab Inc. (seleccionado)
- 10 8. Valoración (seleccionado)
9. Autosuministro (anticuerpo primario) e incubación durante (16 minutos)
- 15 10. Contratación (seleccionado)
11. Aplicar una gota de (hematoxilina II) (contratación), aplicar cubreobjetos e incubar durante (4 minutos)
12. Poscontratación (seleccionado)
- 20 13. Aplicar una gota de (reactivo Bluing) (poscontratación), aplicar cubreobjetos e incubar durante (4 minutos)
14. Lavar los portaobjetos con agua jabonosa para retirar el aceite
- 25 15. Enjuagar los portaobjetos con agua
16. Deshidratar los portaobjetos a través de etanol al 95 %, etanol al 100 % a xileno (programa de autoteñidor Leica n.º 9)
- 30 17. Cubreobjetos.

Ejemplo 2: Asociación entre la expresión de PD-L1 en células inmunitarias (CI) infiltrantes de tumor y la respuesta al tratamiento con antagonistas de unión al eje de PD-L1

35 Se evaluó la asociación entre la expresión de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor dentro de tumores de cáncer de vejiga urotelial (CVU) y el beneficio del tratamiento con antagonistas de unión al eje de PD-L1. Los pacientes con CVU estudiados se incluyeron en un estudio de fase Ia en curso que incluye una cohorte de pacientes con CVU (población con CVU evaluable para seguridad = 92). Los criterios clave de elegibilidad incluyeron enfermedad medible según los Criterios de evaluación de la respuesta en tumores sólidos (RECIST) v1.1 y un estado funcional (EF) del Grupo Oncológico Cooperativo de la Costa Este de los EE. UU. (ECOG) de 0 o 1. La cohorte con CVU originalmente incluyó pacientes con puntuaciones de CI para expresión de PD-L1 de CI2/3, pero, a continuación, se amplió para incluir a todos los pacientes, incluyendo principalmente pacientes con CI0/1 para expresión de PD-L1. Las puntuaciones de CI para expresión de PD-L1 se dieron como se muestra en la Tabla 3. Atezolizumab (MPDL3280A) se administró por vía intravenosa (IV) cada tres semanas (c3s) a una dosis fija de 15 mg/kg o 1200 mg.

Tabla 3: Criterios diagnósticos IHQ de células inmunitarias (CI) infiltrantes de tumor

Evaluación diagnóstica de PD-L1	Puntuación de CI
Ausencia de cualquier tinción distinguible de PD-L1 O Presencia de tinción distinguible de PD-L1 de cualquier intensidad en células inmunitarias infiltrantes de tumor que abarca <1 % del área tumoral ocupada por células tumorales, estroma intratumoral asociado y estroma desmoplásico peritumoral contiguo	CI0
Presencia de tinción distinguible de PD-L1 de cualquier intensidad en células inmunitarias infiltrantes de tumor que abarca de ≥1 % a <5 % del área tumoral ocupada por células tumorales, estroma intratumoral asociado y estroma desmoplásico peritumoral contiguo	CI1

Presencia de tinción distinguible de PD-L1 de cualquier intensidad en células inmunitarias infiltrantes de tumor que abarca de ≥ 5 % a < 10 % del área tumoral ocupada por células tumorales, estroma intratumoral asociado y estroma desmoplásico peritumoral contiguo	CI2
Presencia de tinción distinguible de PD-L1 de cualquier intensidad en células inmunitarias infiltrantes de tumor que abarca ≥ 10 % del área tumoral ocupada por células tumorales, estroma intratumoral asociado y estroma desmoplásico peritumoral contiguo	CI3

El nivel de expresión de PD-L1 en el microambiente tumoral de CVU se evaluó realizando IHQ usando un anticuerpo primario monoclonal de conejo anti-PD-L1 (véase el Ejemplo 1). Este ensayo se optimiza para detectar el nivel de expresión de PD-L1 tanto en células inmunitarias infiltrantes de tumor como en células tumorales (CT). La Figura 1B muestra la prevalencia de la expresión de PD-L1 en los diferentes valores de corte de las puntuaciones de CI en el tejido tumoral de archivo de pacientes cribados previamente en el estudio de fase Ia. La Figura 1C muestra un ejemplo de una sección de tumor de CVU que muestra la expresión de PD-L1 en CI según lo evaluado por IHQ de PD-L1. El ensayo IHQ fue altamente sensible y específico para la expresión de PD-L1.

Se observaron respuestas al tratamiento con atezolizumab (MPDL3280A) en todos los subgrupos de PD-L1, con tasas de respuesta objetiva (TRO) mayores asociadas con una mayor expresión de PD-L1 en CI (Figura 2). Por ejemplo, las TRO fueron de un 50 % y un 17 % en pacientes con CI2/3 y CI0/1, respectivamente (Figura 2). Un 20 % de los pacientes con CI2/3 tuvo una respuesta completa (RC) y un 30 % tuvo una respuesta parcial (RP) (Figura 2). Los pacientes que respondían al tratamiento también incluyeron pacientes con metástasis viscerales al inicio del estudio: un 38 % de TRO (intervalo de confianza (IC) del 95 %, 21-56) en 32 pacientes con CI2/3 y un 14 % (IC del 95 %, 5-30) en 36 pacientes con CI0/1. Cuarenta y cuatro de los 80 (55 %) pacientes con evaluaciones tumorales posteriores al inicio del estudio experimentaron una reducción en la masa tumoral (Figura 3). También se observó una disminución del marcador inflamatorio circulante (proteína C-reactiva) y marcadores tumorales (ACE, AC-19-9) en pacientes que respondieron a atezolizumab.

La duración del tratamiento y la respuesta para pacientes con CVU tratados con atezolizumab (MPDL3280A) se muestra en la Figura 4. La mediana del tiempo hasta la respuesta fue de 62 días (pacientes con CI2/3, intervalo de 1+ a 10+ meses; pacientes con CI0/1, intervalo de 1+ a 7+ meses). Veinte de los 30 pacientes que respondieron tenían respuestas activas en el momento del cierre de los datos (2 de diciembre de 2014). La mediana de la duración de la respuesta (DR) no se había alcanzado en el momento del cierre de los datos.

La expresión de PD-L1 en CI pareció predecir el beneficio del tratamiento con atezolizumab (Figuras 5A y 5B). La mediana de la supervivencia sin progresión (mSSP) y las tasas de SSP a 1 año fueron mayores en pacientes tratados con atezolizumab con una expresión de PD-L1 mayor (Figura 5A). Se observó la misma asociación para las tasas de supervivencia global (SG) a 1 año, y la mediana de supervivencia global (SG) aún no se había alcanzado en el momento del cierre de los datos (Figuras 5A y 5B). Las tasas de SG a 1 año fueron de un 57 % y un 38 % para pacientes con CI2/3 e CI0/1, respectivamente (Figura 5A).

En resumen, atezolizumab (MPDL3280A) ha demostrado una actividad clínica prometedora en una cohorte con CVU metastásico sometida a múltiples tratamientos previos con una supervivencia alentadora y respuestas clínicamente significativas. La expresión de PD-L1 en CI parecía ser un biomarcador predictivo para la respuesta a los antagonistas de unión al eje de PD-L1, tal como el anticuerpo anti-PD-L1 atezolizumab (MPDL3280A).

Ejemplo 3: Estudio de fase Ia que examina la asociación entre la firma del inmunobloqueante y los niveles de expresión de CTLA4 durante el tratamiento y la respuesta de pacientes con CVU a atezolizumab

La asociación entre la respuesta al tratamiento con atezolizumab y la expresión de una firma del "inmunobloqueante" (incluyendo los genes *CTLA4*, *BTLA*, *LAG3*, *HAVCR2* y *PD1*) durante el tratamiento se evaluó durante el transcurso de un estudio clínico de fase Ia que incluyó una cohorte de pacientes con CVU.

Como se muestra en la Figura 6, una expresión de ARNm incrementada (según lo determinado por un ensayo de Nanostring personalizado) de la firma del inmunobloqueante, así como de *CTLA4*, por los linfocitos T en el ciclo 3, día 1 de tratamiento se asoció con la respuesta al atezolizumab en pacientes con CVU. Por lo tanto, los niveles de expresión de *CTLA4*, *BTLA*, *LAG3*, *HAVCR2* y *PD1* representan biomarcadores potenciales para la respuesta de pacientes con CVU al tratamiento con antagonistas de unión al eje de PD-L1, incluyendo el anticuerpo anti-PD-L1 atezolizumab.

Ejemplo 4: Visión general del estudio de fase II que examina la asociación entre atezolizumab y el subtipo de TCGA en pacientes con carcinoma localmente avanzado y metastásico

Supervisión y ejecución del estudio

El estudio fue aprobado por la junta de revisión independiente en cada sitio participante y se realizó en total conformidad con las disposiciones de la Declaración de Helsinki y las guías para la buena práctica clínica. Un comité independiente de monitorización de datos revisó los datos de seguridad disponibles cada seis meses después de la inclusión del primer paciente.

Diseño y tratamiento del estudio

Este fue un ensayo de fase 2, global, multicéntrico, de un solo grupo y dos cohortes, como se describe en la Figura 7. Una cohorte consistió en pacientes que no habían recibido tratamiento en el contexto metastásico y que no se consideraban elegibles para cisplatino. La segunda cohorte consistió en pacientes con carcinoma urotelial localmente avanzado o metastásico inoperable cuya enfermedad había progresado después de la quimioterapia anterior con derivado de platino y recibió una dosis fija de 1200 mg de atezolizumab intravenoso administrado el día 1 de cada ciclo de 21 días. Se permitieron interrupciones de las dosis, pero no se permitieron reducciones de las dosis. Se informó a los pacientes de la posibilidad de pseudoprogresión como parte del proceso de consentimiento y se les aconsejó que analizaran el tratamiento más allá de la progresión con su médico del estudio. Se permitió a los pacientes continuar con el tratamiento con atezolizumab después de que se cumplieran los criterios RECIST v1.1 para la enfermedad progresiva si cumplían los criterios especificados previamente para el beneficio clínico para así permitir la identificación de respuestas no convencionales.

El criterio de valoración principal de eficacia de este estudio fue la tasa de respuesta objetiva (TRO) basada en dos procedimientos distintos: evaluada por un centro de revisión independiente (IRF) según los criterios RECIST versión 1.1 y evaluada por un investigador según los criterios RECIST modificados para evaluar mejor la cinética de la respuesta atípica observada con inmunoterapia (véanse Eisehauer *et al.*, *Eur. J. Cancer*. 45:228-47, 2009; Nishino *et al.*, *Eur. J. Radiol.* 84:1259-68, 2015). Se eligieron criterios de valoración dobles debido al reconocimiento emergente de que RECIST v1.1 puede ser inadecuado para captar plenamente el beneficio de los patrones únicos de respuesta de los agentes inmunoterápicos (véase Chiou *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 33:3541-3, 2015). Los criterios de valoración de eficacia secundarios incluyeron: duración de la respuesta y de la supervivencia sin progresión, tanto evaluada por la revisión independiente según RECIST v1.1 como evaluada por un investigador según los criterios RECIST modificados, supervivencia global, supervivencia global a los 12 meses y seguridad. Los análisis exploratorios incluyeron la asociación del perfil de expresión génica y la infiltración de linfocitos T CD8+ con los resultados clínicos.

Pacientes

Los pacientes eran elegibles para su inclusión en el estudio si tenían carcinoma urotelial localmente avanzado (T4b, cualquier N; o cualquier T, N 2-3) o metastásico (M1, estadio IV) documentado histológica o citológicamente (incluyendo pelvis renal, uréter, vejiga urinaria, uretra). Los pacientes elegibles tenían un estado funcional según el Grupo Oncológico Cooperativo de la Costa Este de los EE. UU. (ECOG) de 0 o 1; enfermedad medible definida según los criterios RECIST v1.1; función hemática y del órgano específico adecuadas; y ausencia de enfermedad autoinmunitaria o infecciones activas. Se requirieron muestras tumorales fijadas en formol e incluidas en parafina (FFIP) con suficiente contenido de tumor viable antes de su inclusión en el estudio.

Evaluaciones del estudio

Las lesiones medibles y evaluables se evaluaron y documentaron antes del tratamiento. Los pacientes se sometieron a evaluaciones tumorales cada nueve semanas durante los primeros 12 meses después del ciclo 1, día 1. Después de 12 meses, las evaluaciones tumorales se realizaron cada 12 semanas. Las evaluaciones de seguridad se realizaron de acuerdo con los Criterios terminológicos comunes para acontecimientos adversos del Instituto Nacional del Cáncer de los EE. UU. (CTCAE del NCI), Versión 4.0. Se recogieron muestras de tejidos tumorales de archivo, así como muestras de suero y plasma, para evaluaciones exploratorias de biomarcadores.

Inmunohistoquímica de PD-L1

Las muestras tumorales de los pacientes se evaluaron de forma prospectiva y central para determinar la expresión de PD-L1 mediante inmunohistoquímica usando el anticuerpo monoclonal SP142 de diagnóstico anti-PD-L1 humano (véase Powles *et al.*, *Nature* 515:558-62, 2014). El estado de las células inmunitarias (CI) infiltrantes de tumor para PD-L1 se definió por el porcentaje de CI positivas para PD-L1: CI0 (<1 %); CI1 (≥ 1 % pero <5 %) y CI2/3 (≥ 5 %). Las áreas de respuesta inflamatoria del bacilo de Calmette y Guérin (BCG) se excluyeron de la evaluación del estado de expresión de PD-L1 en CI. También se realizó un análisis de la expresión de PD-L1 en células tumorales y la infiltración de CD8+ por inmunohistoquímica (véanse Herbst *et al.*, *Nature* 515:563-7, 2014; Ferlay *et al.*, *Int. J. Cancer* 136:E359-86, 2012).

Las biopsias previas al cribado se recogieron de tejido de archivo incluido en parafina. Se requirió que los pacientes enviaran tejido al laboratorio central antes de entrar en el estudio. Las muestras se procesaron en el momento del cribado. El tejido tumoral fijado en formol e incluido en parafina se tiñó prospectivamente para determinar la expresión de PD-L1 mediante inmunohistoquímica usando SP142. Las muestras se puntuaron en cuanto a la expresión de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor, que incluían macrófagos, células dendríticas y linfocitos. Las muestras se puntuaron según la inmunohistoquímica como CI 0, 1, 2 o 3 si <1 %, ≥1 % pero <5 %, ≥5 % pero <10 % o ≥10% de células inmunitarias infiltrantes de tumor fueron positivas para PD-L1, respectivamente. Las puntuaciones de expresión de PD-L1 en pacientes con múltiples muestras de diferentes puntos temporales o muestras se basaron en la puntuación más alta. Este ensayo se validó para su uso en investigación en ensayos clínicos en el valor de corte de CI1 y CI2. Se realizó un análisis exploratorio de la expresión de PD-L1 en células tumorales (CT). Las muestras se puntuaron según la inmunohistoquímica como CT0, CT1, CT2 o CT3 si <1 %, ≥1 % pero <5 %, ≥5 % pero <50 % o ≥50 % de células tumorales fueron positivas para PD-L1, respectivamente.

Análisis exploratorios de los biomarcadores

Los niveles de expresión génica se cuantificaron mediante RNA-Seq con TruSeq RNA Access de Illumina (véanse Wu *et al.*, *Bioinformatics* 26:873-81, 2010; Law *et al.*, *Genome Biol.* 15:R29, 2014; Ritchie *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 43:e47, 2015). Los subtipos moleculares se asignaron siguiendo TCGA (véanse, por ejemplo, Cancer Genome Atlas Research Network *Nature* 507:315-22, 2014 y Jiang *et al.*, *Bioinformatics* 23:306-13, 2007), con algunas modificaciones para adaptarlo para el uso de la plataforma de RNA-Seq RNA Access para tejidos FFIP.

Preparación de la colección de RNA-SEQ

El ARN se aisló de los portaobjetos de muestras tumorales FFIP como se describe previamente en Torre *et al.*, (2012) *Cancer J Clin.* 65:87-108. Se realizó RNA-Seq usando el kit TruSeq RNA Access de Illumina. Las colecciones y la captura híbrida se realizaron según el protocolo del fabricante. En resumen, se usaron aproximadamente 100 ng de ARN, según se cuantifica mediante RiboGreen®, como estímulo. La calidad se evaluó ejecutando las muestras en el bioanizador para determinar el valor de DV200 (% de fragmentos de ARN >200 pb). La síntesis de la primera hebra de ADNc se cebó a partir del ARN total usando cebadores aleatorios, seguida de la síntesis de la segunda hebra de ADNc con dUTP para preservar la información de la hebra. El ADNc bicatenario sometido a reparación de extremos, adición de una cola de nucleótidos de adenina y ligación de adaptadores específicos de Illumina incluye secuencias de índice para la codificación con código de barras de las muestras. Las colecciones resultantes se amplificaron por PCR y se cuantificaron para determinar la distribución de rendimiento y tamaño. Todas las colecciones se normalizaron y cuatro colecciones se agruparon en una única reacción de hibridación/captura. Las colecciones agrupadas se incubaron con una mezcla de oligonucleótidos biotinilados correspondientes a las regiones codificantes del genoma. Las moléculas seleccionadas de la colección se capturaron mediante sondas de oligonucleótidos biotinilados hibridados usando microesferas conjugadas con estreptavidina. Después de dos rondas de reacciones de hibridación/captura, las moléculas de la colección enriquecidas se sometieron a una segunda ronda de amplificación por PCR antes de la secuenciación 2x50 de extremos emparejados en el HiSeq de Illumina.

Alineación, normalización y cuantificación de la expresión génica

Las lecturas se filtraron por su calidad y para eliminar la contaminación por ARNr y, a continuación, se alinearon con el genoma (GRCh38) usando GSNAP (versión 10-10-2013) con las siguientes opciones: -M 2 -n 10 -B 2 -i 1 -N 1 -w 200000 -E 1 --pairmax-rna=200000 --clip-overlap (véase Morales *et al.*, *J Urol.* 116:180-3, 1976). Se obtuvo un promedio de 54,7 millones de pares de lectura alineados de manera concordante y única por muestra. Con propósitos de normalización, los factores de tamaño se calcularon usando el algoritmo DESeq (véase von der Maase *et al.*, *J Clin. Oncol.* 23:4602-8, 2005). Los recuentos de lectura se transformaron a continuación usando el algoritmo voom, que proporciona resultados transformados logarítmicamente adecuados para visualización. Además de transformar los datos de recuento, voom también proporciona pesos según observación que permiten la aplicación del marco de Bayes empírico limma para las pruebas de expresión diferencial, en relación con IHQ de PD-L1 en CI o respuesta (véanse De Santis *et al.*, *J Clin. Oncol.* 30:191-9, 2012; Bellmunt *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 27:4454-61, 2009).

Asignación del subtipo

El subtipo molecular se basó en subtipos moleculares en la vejiga sugeridos por TCGA y descritos en Dong *et al.*, (2002) *Nat Med.* 8:793-800. El clasificador de TCGA no se pudo aplicar directamente a estos datos, debido a diferencias significativas en el comportamiento de la señal por gen entre el método RNA-seq poli(A) estándar para material fresco y el RNA-seq con RNA Access para material FFIP. En cambio, estas muestras se agruparon de acuerdo con la expresión de los siguientes genes, que corresponden a la Figura 3 de TCGA: FGFR3, CDKN2A, KRT5, KRT14, EGFR, GATA3, FOXA1 y ERBB2 (véase Dong *et al.*, *Nat. Med.* 8:793-800, 2002). CDKN2A se usó como un reemplazo para miR-99a-5p y miR-100-5p de TCGA porque, al igual que miR-99a-5p y miR-100-5p, TCGA descubrió que CDKN2A estaba considerablemente anticorrelacionado con FGFR3. Véase la Figura 1 de TCGA en Dong *et al.*, (2002) *Nat Med.* 8:793-80. A continuación, los grupos (clusters) de pacientes se podrían asignar de forma directa a los subtipos moleculares de TCGA haciendo coincidir los patrones de expresión génica de cada cluster con los

patrones registrados por TCGA. Un grupo externo con comportamiento de expresión mixta que no era consecuente con los datos de TCGA I, II, III o IV (n = 18) se dejó sin clasificar y se omitió del análisis posterior.

Análisis estadístico

Los análisis de eficacia se basaron en la población por intención de tratar (IT). La tasa de respuesta objetiva se determinó en la población con respuesta objetiva evaluable, definida como pacientes por intención de tratar que tenían una enfermedad medible según RECIST v1.1 al inicio del estudio, y se realizaron análisis de duración de respuesta en el subconjunto de pacientes que lograron una respuesta objetiva. Para el criterio de valoración principal de la tasa de respuesta objetiva se usó un procedimiento de prueba de secuencia fija jerárquica para comparar la tasa de respuesta objetiva entre el grupo de tratamiento y un control histórico de un 10 % para tres poblaciones especificadas previamente: pacientes con respuesta objetiva evaluable con una puntuación IHQ de PD-L1 de [i] CI2/3; [ii] CI1/2/3 y [iii] todos los pacientes evaluables para respuesta objetiva. Las pruebas de hipótesis en estas tres poblaciones se realizaron secuencialmente sobre la base de la tasa de respuesta objetiva evaluada por IRF de acuerdo con RECIST v1.1 y la tasa de respuesta objetiva evaluada por un investigador de acuerdo con los criterios RECIST modificados a un nivel α bilateral específico de 0,05 para cada prueba, mientras se controlaba el error global de tipo I en el mismo nivel α , desencadenado por un mínimo de 24 semanas de seguimiento desde la inclusión del último paciente. Se realizaron análisis de seguridad en todos los pacientes tratados, definidos como pacientes reclutados que recibieron cualquier cantidad del fármaco del estudio. Los análisis de biomarcadores adicionales más allá de PD-L1 en CI fueron solo exploratorios y no se especificaron previamente. La población con biomarcadores evaluables se basó en una población con respuesta objetiva evaluable que tenía disponibles datos de expresión génica asociados.

Ejemplo 5: Resultados del estudio de fase II que examina la asociación de atezolizumab y el subtipo de TCGA en pacientes con carcinoma localmente avanzado y metastásico

Características de los pacientes

Se cribó un total de 486 pacientes y 315 pacientes se incluyeron en el estudio en la Cohorte 2, como se ve en las Figuras 7 y 8. 310 pacientes recibieron al menos una dosis de atezolizumab y se pudo evaluar la eficacia y seguridad. En el momento del cierre de los datos, 202 pacientes (65 %) habían interrumpido el tratamiento (193 pacientes habían muerto, y 9 pacientes abandonaron el estudio, ocho debido a la retirada por parte del paciente y uno debido a otras razones), mientras que 118 pacientes (35 %) permanecieron en el estudio después de un mínimo de 9,9 meses de seguimiento desde la inclusión del último paciente.

La Tabla 4 resume las características iniciales de los pacientes. Un 41 % de los pacientes había recibido dos o más tratamientos sistémicos anteriores para enfermedad metastásica. Muchos pacientes tenían factores de riesgo de pronóstico adverso, incluyendo metástasis viscerales y/o hepáticas al inicio del estudio (un 78 % y un 31 %, respectivamente) y hemoglobina basal <10 g/dl (22 %).

El tejido para el análisis de inmunohistoquímica de PD-L1 consistió en muestras de resección quirúrgica (n = 215), biopsias de lesiones elementales (n = 23) o sitios metastásicos (n = 41), muestras de resección transuretral de tumor de vejiga (TURBT) (n = 29) y biopsia de lesión desconocida (n = 2). La prevalencia de CI2/3 para expresión de PD-L1 fue mayor en las muestras de resección y TURBT frente a biopsias de lesiones elementales o sitios metastásicos (un 39 % y un 34 % frente a un 17 % y un 8 %, respectivamente). Los pacientes se distribuyeron uniformemente entre los grupos de expresión de PD-L1 en CI: CI0 (33 %), CI1 (35 %) y CI2/3 (32 %). Las características basales estaban bien equilibradas entre el grupo CI2/3, el grupo CI1/2/3 y población por intención de tratar (Tabla 4).

Tabla 4. Grupo CI1/2/3 y población por intención de tratar

Característica	CI2/3 n = 100	CI1/2/3 n = 207	Todos los pacientes N = 310
Edad, mediana, años (intervalo)	66 (41-84)	67 (32-91)	66 (32-91)
Sexo, masculino, n (%)	78 (78)	160 (77)	241 (78)
Raza, caucásica, n (%)	87 (87)	184 (89)	282 (91)
Sitio del tumor primario, n (%)			
Vejiga	79 (79)	159 (77)	230 (74)
Pelvis renal	11 (11)	27 (13)	42 (14)
Uréter	5 (5)	12 (6)	23 (7)
Uretra	3 (3)	5 (2)	5 (2)
Otro	2 (2)	4 (2)	10 (3)
Aclaramiento de creatinina basal <60 ml/min, n (%)	40 (40)	69 (33)	110 (36)

EF del ECOG de 0, n (%)			
0	42 (42)	83 (40)	117 (38)
1	58 (58)	124 (60)	193 (62)
Hemoglobina <10 g/dl, n (%)	24 (24)	50 (24)	69 (22)
Tabaquismo, n (%)			
Actual	6 (6)	19 (9)	35 (11)
Nunca	34 (34)	72 (35)	107 (35)
Previo	60 (60)	116 (56)	168 (54)
Factores de riesgo de Bellmunt, número, n (%)			
0	31 (31)	61 (30)	83 (27)
1	35 (35)	72 (35)	117 (38)
2	28 (28)	59 (29)	89 (29)
3	6 (6)	15 (7)	21 (7)
Sitios metastásicos al inicio del estudio, n (%)			
Viscerales ^a	66 (66)	152 (73)	243 (78)
Hepáticos	27 (27)	61 (30)	96 (31)
Solo ganglios linfáticos	24 (24)	39 (19)	43 (14)
Cistectomía anterior, sí, n (%)	44 (44)	83 (40)	115 (37)
Tiempo desde quimioterapia anterior ≤3 meses, n (%)	43 (43)	87 (42)	121 (39)
Tratamiento anterior con derivado de platino, n (%)			
Con derivado de cisplatino	83 (83)	161 (78)	227 (73)
Con derivado de carboplatino	17 (17)	43 (21)	80 (26)
Otra combinación de platino	0	3 (1)	3 (1)
Quimioterapia neoadyuvante o adyuvante anterior, con primera progresión ≤12 meses, n (%)	24 (24)	42 (20)	57 (18)
Número de tratamientos sistémicos anteriores en el contexto metastásico, %			
0	24 (24)	42 (20)	59 (19)
1	36 (36)	83 (40)	124 (40)
2	19 (19)	41 (20)	64 (21)
3	11 (11)	24 (12)	39 (13)
≥4	10 (10)	17 (8)	24 (8)
Bacilo de Calmette y Guérin administrado por vía intravesical, n (%)	15 (15)	46 (22)	73 (24)

Eficacia

- El análisis primario planificado previamente de 24 semanas demostró que el tratamiento con atezolizumab dio como resultado una tasa de respuesta objetiva (TRO) según RECIST v1.1 significativamente mejorada para cada grupo de CI especificado previamente (CI2/3, 27 % (IC del 95 %, 19 a 37), $p < 0,0001$); CI1/2/3, 18 % (IC del 95 %, 13 a 24), $p = 0,0004$) y todos los pacientes, 15 % (IC del 95 %, 11 a 20), $p = 0,0058$) en comparación con una TRO de control histórica de un 10 % (Tabla 5). El análisis actualizado de la eficacia descrito en el presente documento se realizó posteriormente para evaluar la durabilidad de la respuesta (Tabla 6). Mediante una revisión radiológica independiente (RECIST v1.1), el análisis actualizado de la eficacia mostró una TRO de un 26 % (IC del 95 %, 18 a 36) en el grupo CI2/3, incluyendo un 11 % de los pacientes que lograron una respuesta completa (RC). En el grupo CI1/2/3, la TRO fue de un 18 % (IC del 95 %, 13 a 24), con RC observada en 13 pacientes (6 %). Para todos los pacientes evaluables, la tasa de respuesta objetiva fue de un 15 % (IC del 95 %, 11 a 19); con respuesta completa observada en 15 pacientes (5 %). Las tasas de respuesta evaluadas por un investigador (según RECIST modificado) fueron similares a los resultados de RECIST v1.1 (Tabla 6). Con una mediana de seguimiento de 11,7 meses, no se había alcanzado aún la mediana de duración de la respuesta en ninguno de los grupos de inmunohistoquímica de PD-L1 (intervalo, 2,0*, 13,7* meses, *valores censurados) (los datos para el grupo CI2/3 se muestran en las Figuras 9A-9C; los grupos CI0 y CI1 se muestran en las Figuras 10A-10F). En el momento del cierre de los datos, se observaron respuestas activas en 38 de los 45 pacientes que respondieron (84 %). La mediana del tiempo hasta la respuesta fue de 2,1 meses (IC

del 95 %, 2,0 a 2,2). A partir de un modelo de regresión logística multivariante de la TRO sobre el estado de PD-L1 en CI y la puntuación de riesgo de Bellmunt, la razón de posibilidades de tener un paciente con respuesta confirmada al tratamiento por IRF según RECIST v1.1 es de 4,12 (IC del 95 %: 1,71, 9,90) para el grupo CI2/3 en comparación con el grupo CI0 y de 1,30 (IC del 95 %: 0,49, 3,47) para el grupo CI1 en comparación con el grupo CI0, cuando se controla la puntuación de riesgo de Bellmunt. Los resultados de la regresión logística son consecuentes con los análisis de los subgrupos.

El análisis exploratorio de los subgrupos de pacientes que demuestran una respuesta completa con respecto a factores clínicos demuestra que la ausencia de metástasis visceral (por ejemplo, enfermedad solo en ganglios linfáticos) al inicio del estudio se asoció con la tasa de respuesta completa (TRC) más alta (por ejemplo, presencia de metástasis visceral (Sí/ No): un 1,2 % (IC del 95 % 0,26-3,57) para Sí (n = 243) frente a un 17,9 % (IC del 95 %, 9,61-29,20) para No (n = 67). También se realizó un análisis de la asociación entre el sitio del tumor primario y la TRC (por ejemplo, vejiga (n = 230), 6,5 % (IC del 95 %, 3,70-10,53); renal/pelvis (n = 42), 0 % (IC del 95 %, 0,00-8,41); uréter (n = 23), 0 % (IC del 95 %, 0,00-14,82); uretra (n = 5), 0 % (IC del 95 %, 0,00-52,18) y otros (n = 10), 0 % (IC del 95 %, 0,00, 30,85)). Adicionalmente, se examinó la asociación entre el estado funcional y la TRC (por ejemplo, 8,5 % (IC del 95 %, 4,17-15,16) para EF del ECOG de 0 (n = 117) en comparación con un 2,6 % (IC del 95 %, 0,85-5,94) para EF del ECOG de 1 (n = 193)). Finalmente, se analizó la asociación entre el estado de PD-L1 en CI y la TRC (por ejemplo, CI0 (n = 103) 1,9 % (IC del 95 %, 0,24-6,84) en comparación con CI1 (n = 107) 1,9 % (IC del 95 %, 0,23 -6,59) en comparación con CI2/3 (n = 100) 11 % (IC del 95 %, 5,62-18,83) en comparación con todos los pacientes (n = 310) 4,8 % (2,73-7,86)).

Los análisis de la TRC evaluada por un IRF según RECIST v.1.1 en muestras de tejido primario en comparación con metastásico respaldaron una asociación entre el estado IHQ de PD-L1 y la respuesta clínica independientemente del sitio anatómico. De los 311 pacientes en el análisis principal, en 233 se evaluó la expresión de PD-L1 en base a muestras tumorales obtenidas del sitio primario de la enfermedad, mientras que en 78 se evaluó la expresión de PD-L1 en muestras tumorales obtenidas del sitio metastásico de la enfermedad. De los pacientes en los que se evaluó la expresión de PD-L1 sobre la base de tejido de los sitios primarios de la enfermedad, la TRC evaluada por un IRF según RECIST v1.1 fue un 26 % (IC del 95 %, 16 a 37), un 18 % (IC del 95 %, 12 a 25) y un 16 % (IC del 95 %, 11 a 21) para las poblaciones CI2/3, CI1/2/3 y para todos los pacientes, respectivamente. Entre los pacientes en los que se evaluó la expresión de PD-L1 sobre la base de tejido de los sitios metastásicos de la enfermedad, la TRC evaluada por un IRF según RECIST v1.1 fue un 32 % (IC del 95 %, 14 a 55), un 20 % (IC del 95 %, 10 a 35) y un 14% (IC del 95 %, 7 a 24) para las poblaciones CI2/3, CI1/2/3 y para todos los pacientes, respectivamente.

Tabla 5. Tasa de respuesta objetiva por puntuación de CI: criterios RECIST v1.1 evaluados por revisión independiente

Subgrupo de PD-L1	n	RC (%)	TRO (%)	IC del 95 %	Valor de p^b
CI2/3	100	8 %	27 %	19, 37	<0,0001
CI1/2/3	208	5 %	18 %	13, 24	0,0004
Todos	311	4 %	15 %	11, 20	0,0058
CI1	108	3 %	10 %	5, 18	n. d.
CI0	103	1 %	9 %	4, 16	n. d.

^a Población con respuesta objetiva evaluable: todos los pacientes tratados tenían enfermedad medible al inicio del estudio según RECIST v1.1 evaluado por un investigador.

^b Valor de p para Ho: TRO = 10 % frente a Ha: TRO $\neq$ 10 %, donde un 10 % de TRO es control histórico, α = 0,05.

Tabla 6. Eficacia de la tasa de respuesta

Subgrupo de PD-L1	n	TRO, n (%) (IC del 95 %)	RC, n (%)	RP, (%)	EE, n (%)	EP, n (%)
Criterios RECIST versión 1.1 evaluados por revisión independiente						
CI2/3	100	26 (26) (18, 36)	11 (11)	15 (15)	16 (16)	44 (44)
CI1/2/3	207	37 (18) (13, 24)	13 (6)	24 (12)	34 (16)	107 (52)
Todos	310	45 (15) (11, 19)	15 (5)	30 (10)	59 (19)	159 (51)
CI1	107	11 (10) (5, 18)	2 (2)	9 (8)	18 (17)	63 (59)

CI0	103	8 (8) (3, 15)	2 (2)	6 (6)	25 (24)	52 (51)
Criterios RECIST modificados evaluados por un investigador						
CI2/3	100	27 (27) (19, 37)	8 (8)	19 (19)	31 (31)	28 (28)
CI1/2/3	207	45 (22) (16, 28)	14 (7)	31 (15)	58 (28)	74 (36)
Todos	310	58 (19) (15, 24)	16 (5)	42 (14)	92 (30)	110 (35)
CI1	107	18 (17) (10, 25)	6 (6)	12 (11)	27 (25)	46 (43)
CI0	103	13 (13) (7, 21)	2 (2)	11 (11)	34 (33)	36 (35)

Para explicar la aparición de pseudoprogresión, se permitió que los pacientes se sometieran a tratamiento más allá de la progresión según RECIST v1.1 evaluada por un IRF. 121 pacientes se sometieron a tratamiento más allá de la progresión durante una mediana de 7,8 semanas y, de estos, 21 (17 %) experimentaron posteriormente una reducción de la lesión diana de al menos un 30 % con respecto a sus exploraciones basales como se muestra en la Figura 11B. Aproximadamente un 27 % de los pacientes tratados más allá de la progresión según RECIST demostraron estabilidad de la enfermedad.

Las respuestas duraderas observadas incluyeron pacientes con enfermedad del tracto superior y pacientes con rasgos característicos de mal pronóstico. Aunque la presencia de metástasis hepática en pacientes dio como resultado una tasa de respuesta objetiva menor en comparación con los pacientes sin metástasis hepática (un 5 % en comparación con un 19 %, Tabla 7), estas respuestas fueron duraderas, con la duración de la respuesta no alcanzada en el momento del cierre de los datos. Se observó una tendencia similar en pacientes con metástasis visceral (un 10 % frente a un 31 % para pacientes sin metástasis visceral) y EF del ECOG de 1 (un 8 % en comparación con un 25 % para pacientes con un EF del ECOG de 0). La mediana de la duración de la respuesta no se había alcanzado aún en ninguno de los subgrupos analizados.

Tabla 7. Tasas de respuesta global según RECIST v1.1 y RECIST modificada para subgrupos de pacientes en IMvigor 210 (Análisis actualizado. Cierre de los datos: 14 de septiembre de 2015)

Subgrupo de pacientes	Parámetro	n	TRO según RECIST v1.1 evaluada por revisión independiente, n (%)	TRO según RECIST modificada evaluada por un investigador, n (%)
Sexo	Hombre	241	40 (17)	52 (22)
	Mujer	69	5 (7)	6 (9)
Edad	<65	127	17 (13)	20 (16)
	≥65	183	28 (15)	38 (21)
Raza	Caucásica	282	40 (14)	49 (17)
	Otra	28	5 (18)	9 (32)
EF del ECOG	0	117	29 (25)	34 (29)
	1	193	16 (8)	24 (12)
Sitio del tumor primario	Vejiga	230	39 (17)	50 (22)
	Pelvis renal	42	3 (7)	5 (12)
	Uréter	23	2 (9)	2 (9)
	Uretra	5	0 (0)	1 (20)
	Otro	10	1 (10)	0 (0)
Enfermedad solo en ganglios linfáticos	Sí	43	13 (30)	18 (42)
	No	267	32 (12)	40 (15)
Metástasis hepática	Sí	96	5 (5)	9 (9)
	No	214	40 (19)	49 (23)
Metástasis visceral	Sí	243	24 (10)	32 (13)
	No	67	21 (31)	26 (39)

Hemoglobina <10 g/dl	Sí	69	5 (7)	5 (7)
	No	241	40 (17)	53 (22)
Aclaramiento de creatinina basal	<60 ml/min	110	13 (12)	14 (13)
	≥60 ml/min	172	26 (15)	37 (22)
	Desconocida	28	6 (21)	7 (25)
	0	83	24 (29)	30 (36)
Factores de riesgo de Bellmunt, número	1	117	16 (14)	18 (15)
	2	89	5 (6)	10 (11)
	3	21	0 (0)	0 (0)
Tratamiento anterior con derivado de platino	Cisplatino	227	32 (14)	46 (20)
	Carboplatino	80	13 (16)	12 (15)
	Otro platino	3	0 (0)	0 (0)
Número de tratamientos sistémicos anteriores en el contexto metastásico, número	0	59	13 (22)	15 (24)
	1	124	16 (13)	24 (19)
	2	64	8 (13)	9 (14)
	3	39	6 (15)	7 (18)
	≥4	24	2 (8)	3 (13)
Contexto del tratamiento sistémico anterior	Adyuvante o neoadyuvante con 1.ª EP ≤ 12 meses	57	13 (23)	15 (26)
	Adyuvante o neoadyuvante con 1.ª EP > 12 meses	2	0 (0)	0 (0)
Número de líneas de tratamiento anteriores	0	2	0 (0)	0 (0)
	1	145	23 (16)	31 (21)
	2	87	12 (14)	15 (17)
	3	46	7 (15)	8 (17)
	≥4	30	3 (10)	4 (13)
Tiempo desde quimioterapia anterior (≤3 meses)	Sí	121	13 (11)	16 (13)
	No	189	32 (17)	42 (22)
BCG anterior	Sí	73	9 (12)	9 (12)
	No	237	36 (15)	49 (21)
Expresión de PD-L1 por inmunohistoquímica en células tumorales (puntuación de CT)	CT3	12	2 (17)	2 (17)
	CT2	28	5 (18)	6 (21)
	CT1	22	3 (14)	5 (23)
	CT0	248	35 (14)	45 (18)

Con una mediana de seguimiento de la supervivencia de aproximadamente 11,7 meses (intervalo, 0,2* a 15,2; *indica un valor censurado), la mediana de supervivencia sin progresión (SSP) (RECIST v1.1) fue de 2,1 meses entre todos los pacientes (IC del 95 %, 2,1 a 2,1) y similares en todos los grupos de CI. La mediana de la SSP evaluada por un investigador según los criterios RECIST modificados fue de 4,0 meses (IC del 95 %, 2,6 a 5,9) en el grupo CI2/3 en comparación con 2,9 meses (IC del 95 %, 2,1 a 4,1) en el grupo CI1/2/3 y 2,7 meses (IC del 95 %, 2,1 a 3,9) en todos los pacientes.

La mediana de la supervivencia global fue de 11,4 meses (IC del 95 %, 9,0 a no estimable) para el grupo CI2/3, 8,8 meses (IC del 95 %, 7,1 a 10,6) en el grupo CI1/2/3 y 7,9 meses (IC del 95 %, 6,6 a 9,3) para toda la cohorte de pacientes (Figura 9D). La tasa de supervivencia global en el punto de referencia de 12 meses fue de un 48 % en el grupo CI2/3 (IC del 95 %, 38 a 58), un 39% en el grupo CI1/2/3 (IC del 95 %, 32 a 46) y un 36 % (IC del 95 %, 30 a 41) en la población por intención de tratar. En los pacientes que recibieron solo una línea de tratamiento anterior (n = 124) en el contexto metastásico y sin tratamiento adyuvante/neoadyuvante anterior, la mediana de supervivencia global no fue estimable (IC del 95 %, 9,3 a no estimable) para el grupo CI2/3, fue de 10,3 meses (IC del 95 %, 7,5 a 12,7) en el grupo CI1/2/3 y 9,0 meses (IC del 95 %, 7,1 a 10,9) para toda la población de segunda línea.

Seguridad

La mediana de duración del tratamiento fue de 12 semanas (intervalo, 0 a 66). En general, se registraron acontecimientos adversos de cualquier grado en un 97 % de los pacientes, y un 55 % de los pacientes experimentó un acontecimiento de grado 3-4 (véase la Tabla 9). El sesenta y nueve por ciento de los pacientes tuvo un acontecimiento adverso (AA) relacionado con el tratamiento de cualquier grado, y un 16 % de los pacientes tuvo un acontecimiento relacionado de grado 3-4. Se observaron acontecimientos adversos graves relacionados con el tratamiento en un 11 % de los pacientes. No se registraron muertes relacionadas con el tratamiento en el estudio. La mayoría de los acontecimientos adversos relacionados con el tratamiento fueron de naturaleza leve a moderada, con fatiga (30 %), náuseas (14 %), disminución del apetito (12 %), prurito (10 %), pirexia (9 %), diarrea (8 %), erupción cutánea (7 %) y artralgia (7 %) entre los acontecimientos más comunes de cualquier grado (Tabla 8; véase la Tabla 9 para ver los acontecimientos adversos de cualquier causa). La incidencia de acontecimientos adversos relacionados con el tratamiento de grado 3-4 fue baja, siendo la fatiga la más común con un 2 % (Tabla 8). No hubo ningún informe de neutropenia febril.

Tabla 8. Acontecimientos adversos relacionados con el tratamiento que se produjeron en 310 pacientes que recibieron atezolizumab

Acontecimiento	Todos los grados, n (%)	Grado 3-4, n (%)
Cualquier AA	215 (69)	50 (16)
Fatiga	93 (30)	5 (2)
Náuseas	42 (14)	0 (0)
Disminución del apetito	36 (12)	2 (1)
Prurito	31 (10)	1 (<1)
Pirexia	28 (9)	1 (<1)
Diarrea	24 (8)	1 (<1)
Erupción cutánea	23 (7)	1 (<1)
Artralgia	21 (7)	2 (1)
Vómitos	18 (6)	1 (<1)
Disnea	10 (3)	2 (1)
Anemia	9 (3)	3 (1)
Aspartato aminotransferasa incrementada	10 (3)	2 (1)
Neumonitis	7 (2)	2 (1)
Hipotensión	5 (2)	2 (1)
Hipertensión	3 (1)	3 (1)

Tabla 9. Acontecimientos adversos de cualquier causa que se produjeron en 310 pacientes que recibieron atezolizumab

AA, n (%) (N = 310)	Cualquier grado	Grado 3-4
Cualquier AA	300 (97)	170 (55)
Fatiga	152 (49)	18 (6)
Náuseas	81 (26)	7 (2)
Disminución del apetito	82 (27)	4 (1)
Prurito	41 (13)	1 (<1)
Pirexia	68 (22)	2 (<1)
Diarrea	61 (20)	3 (1)
Erupción cutánea	32 (10)	1 (<1)
Artralgia	52 (17)	3 (1)
Vómitos	55 (18)	4 (1)
Disnea	53 (17)	11 (4)
Anemia	48 (15)	28 (9)
Aspartato aminotransferasa incrementada	16 (5)	3 (1)
Neumonitis	7 (2)	2 (1)
Hipotensión	13 (4)	3 (1)
Hipertensión	11 (4)	6 (2)

Un siete por ciento de los pacientes tuvo un acontecimiento adverso mediado por el sistema inmunitario de cualquier grado, con neumonitis (2 %), aspartato aminotransferasa incrementada (1 %), alanina aminotransferasa incrementada (1 %) y erupción cutánea (1 %) como los acontecimientos adversos más comunes. Un cinco por ciento tuvo un acontecimiento adverso mediado por el sistema inmunitario de grado 3-4 (por cualquier causa). No se observó toxicidad renal mediada por el sistema inmunitario. Un 30 % de los pacientes tuvo un acontecimiento adverso que llevó a la interrupción de la dosis. Un cuatro por ciento de los pacientes experimentó un acontecimiento adverso que llevó a la retirada del tratamiento. Un 22 % (69/310) de los pacientes tuvo un acontecimiento adverso que requirió el uso de esteroides.

10 *Biomarcadores exploratorios*

La expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en células inmunitarias (CI) infiltrantes de tumor se asoció con la expresión de genes de un conjunto de linfocitos T CD8 efectores (T_{ef}) (Figura 12A). Entre los genes del conjunto T_{ef} , las respuestas a atezolizumab se asociaron más estrechamente con la alta expresión de dos quimiocinas de linfocitos T cooperadores de tipo 1 (T_H1) inducibles por interferón γ , CXCL9 ($P = 0,0057$) y CXCL10 ($P = 0,0079$) (Figura 12B). Una tendencia similar, aunque menos pronunciada, se observó también con respecto a otros genes del conjunto (Figura 13A). Consecuente con el incremento de la expresión de quimiocinas que transportan linfocitos T, la infiltración tumoral de linfocitos T CD8+ también se asoció tanto con la expresión de PD-L1 en CI (Figura 12C, $P < 0,001$) como con la respuesta a atezolizumab (Figura 12D, $P = 0,027$).

El análisis de expresión génica ($n = 195$) se usó para clasificar a los pacientes en subtipos luminal ($n = 73$) y basal ($n = 122$) según lo definido por TCGA (Figura 14). La prevalencia de la expresión de PD-L1 en CI estuvo altamente enriquecida en el subtipo basal frente al subtipo luminal (un 60 % frente a un 23 %, $P < 0,001$, Figura 12E) con expresión de CI2/3 de un 15 % en el subtipo de cluster luminal de tipo papilar I, un 34 % en el de cluster luminal II, un 68 % en el de cluster basal de tipo escamoso III y un 50 % en el de cluster basal IV. Por el contrario, la expresión de PD-L1 en células tumorales CI2/3 se observó casi exclusivamente en el subtipo basal (un 39 % en basal frente a un 4 % en luminal, $P < 0,001$; Figura 12F) y no se correlacionó con la TRO. De acuerdo con la expresión de PD-L1 de CI2/3, la expresión génica de los linfocitos T CD8 efectores fue elevada en el cluster luminal II y el cluster basal III/IV y no en el cluster luminal I (Figura 14). La respuesta a atezolizumab se produjo en todos los subtipos de TCGA, pero inesperadamente fue significativamente mayor en el subtipo de cluster luminal II que en otros subtipos, lo que demostró una tasa de respuesta objetiva de un 34 % ($P = 0,0017$, Figura 12G).

Análisis

Desde el desarrollo del tratamiento combinado de metotrexato, vinblastina, doxorubicina y quimioterapia con cisplatino hace 30 años, no ha habido mejoras importantes en los resultados del tratamiento en pacientes con carcinoma urotelial (véase Sternberg *et al.*, *J. Urol.* 133:403-7, 1985). Los resultados de este gran estudio de fase 2 de un solo grupo muestran que el atezolizumab en monoterapia indujo respuestas antitumorales duraderas en pacientes con carcinoma urotelial avanzado cuyos tumores habían progresado durante o después de la quimioterapia con derivado de platino. Este ensayo incluyó pacientes sometidos a múltiples tratamientos previos y, en particular, no se alcanzó la mediana de la duración de la respuesta a pesar de una mediana de seguimiento de 11,7 meses. La baja incidencia de acontecimientos adversos clínicamente pertinentes relacionados con el tratamiento hace que atezolizumab sea ampliamente aplicable en esta población de pacientes que a menudo tienen múltiples comorbilidades y/o insuficiencia renal. Esta eficacia y tolerabilidad duraderas son sorprendentes en comparación con los resultados observados con la quimioterapia de segunda línea actualmente disponible (véanse Bellmunt *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 27:4454-61, 2009; Choueiri *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 30:507-12, 2012; Bambury *et al.*, *Oncologist* 20:508-15, 2015).

La tasa de SG a los 12 meses en toda la cohorte que incluyó aproximadamente un 42 % de los pacientes tratados en la tercera línea o posterior fue de un 48 % (IC del 95 %, 38 a 58) en el grupo CI2/3, un 39 % en el grupo CI1/2/3 (IC del 95 %, 32 a 46) y un 36 % (IC del 95 %, 30 a 41) en la población IT. Estos resultados de SG son favorables en comparación con una tasa de supervivencia en el punto de referencia de 12 meses de un 20 % (IC del 95 %, 17 a 24) de un análisis agrupado de diez ensayos de fase 2 que evaluaron a 646 pacientes que recibieron quimioterapia de segunda línea o productos biológicos (véase Agarwal *et al.*, *Clin. Genitourin. Cancer* 12:130-7, 2014).

Actualmente se desconoce el valor pronóstico de la expresión de PD-L1 en CI, con informes contradictorios en la literatura, aunque no parece estar asociado con factores de riesgo adversos validados en este conjunto de datos (véanse Boorjian *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 14:4800-8, 2008; Bellmunt *et al.*, *Ann. Oncol.* 26:812-7, 2015). Por lo tanto, parece probable que la supervivencia mejorada en esta población de pacientes esté relacionada con el tratamiento con atezolizumab. No obstante, los resultados de los estudios aleatorizados en curso (NCT02302807) son necesarios para evaluar adecuadamente el valor pronóstico y predictivo del ensayo de inmunohistoquímica Ventana SP142 y para comprender mejor qué pacientes obtienen un beneficio clínico.

Las respuestas a atezolizumab se asociaron tanto con RECIST convencional como con la cinética de respuesta atípica, con un 17 % adicional de pacientes tratados más allá de la progresión con una reducción de las lesiones diana después de la progresión según RECIST v1.1. La mediana de supervivencia sin progresión fue similar en todos los

subconjuntos de inmunohistoquímica con RECIST v1.1; sin embargo, se incrementó cuando se usaron criterios RECIST modificados para explicar las respuestas no clásicas que se pueden observar con la inmunoterapia contra el cáncer. En este estudio se observó una desconexión entre SSP y SG, similar a la de otros agentes de punto de control inmunitario en otras enfermedades, lo que sugiere además que se necesitan modificaciones de RECIST v1.1 para captar mejor el beneficio del tratamiento de la inmunoterapia.

Este estudio requirió que se enviara una muestra tumoral durante el cribado para la prueba prospectiva de PD-L1 usando el SP142. En un análisis especificado previamente, los niveles mayores de expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en las células inmunitarias se asociaron con una mayor tasa de respuesta a atezolizumab y una supervivencia global más larga. Por el contrario, la frecuencia de la expresión de PD-L1 en las células tumorales fue baja y no mostró una asociación con la respuesta objetiva, lo que brinda un mayor respaldo a la importancia de la inmunidad adaptativa para impulsar el beneficio clínico de los inhibidores del punto de control inmunitario.

De forma similar, la asociación entre subconjuntos de genes de activación inmunitaria (por ejemplo, CXCL9 y CD8A) y otros genes de punto de control inmunitario (PD-L1, CTLA-4 y TIGIT, datos no mostrados) y la expresión de PD-L1 en CI pero no en CT sugiere que la expresión de PD-L1 en CI representa la regulación inmunitaria adaptativa y la presencia de una respuesta inmunitaria preexistente (pero suprimida) en tumores de carcinoma urotelial (véase Herbst *et al.*, Nature 515:563-7, 2014). La presencia de otros reguladores negativos (por ejemplo, TIGIT) sugiere además que los enfoques inmunoterápicos combinados pueden potenciar aún más las respuestas.

De forma interesante, los subtipos moleculares identificados por el análisis de TCGA también se asociaron con la respuesta a atezolizumab, lo que sugiere que, además de la expresión de PD-L1, los subtipos diferían en la biología inmunitaria subyacente. Aunque se observaron respuestas en todos los subtipos de TCGA, se observaron tasas de respuesta significativamente mayores en el subtipo de cluster luminal II, que se caracterizó por firmas transcripcionales asociadas con la presencia de linfocitos T efectores activados. Por el contrario, el cluster luminal I se asoció con una baja expresión de genes de linfocitos CD8+ efectores, una menor expresión de PD-L1 en CI/CT y respuestas menores a atezolizumab, lo que es consecuente con un panorama a menudo desprovisto de actividad inmunitaria preexistente. Los clusters basales III y IV también se asociaron con una mayor expresión de PD-L1 en CI, así como con genes de linfocitos CD8+ efectores. Sin embargo, a diferencia del cluster luminal II, los clusters basales III/IV también exhibieron una expresión de PD-L1 en CT alta. Las tasas de respuesta reducidas en los subtipos basales en comparación con el cluster luminal II sugieren fuertemente que existen otros factores inmunosupresores en los subtipos basales que evitan la activación eficaz de los linfocitos T con la inhibición de la vía PD-L1/PD-1. Las diferencias en el panorama inmunitario de los subtipos luminales frente a los subtipos basales resaltan la necesidad de comprender además la biología inmunitaria subyacente para desarrollar futuras estrategias de tratamiento secuenciales o combinadas racionales.

Aunque el estado de PD-L1 en CI se asocia claramente con la respuesta a atezolizumab, la incorporación del subtipo de expresión génica de TCGA en un modelo basado en la tinción de PD-L1 en CI mejoró significativamente la asociación con la respuesta (Figura 15). Por tanto, el subtipo de enfermedad no recapitula simplemente la información ya proporcionada por la expresión de PD-L1 en las células inmunitarias, sino que proporciona información independiente y complementaria.

LISTADO DE SECUENCIAS

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

5 <120> PROCEDIMIENTOS TERAPÉUTICOS Y DE DIAGNÓSTICOS PARA EL CÁNCER

<130> 50474-116WO3

10 <150> US 62/301.599
<151> 02/29/2016

<150> US 62/168.669
<151> 29/05/2015

15 <160> 33

<170> PatentIn versión 3,5

20 <210> 1
<211> 440
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Polipéptido sintético

<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

30

ES 2 789 500 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

<210> 2
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<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

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> Polipéptido sintético

5

<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
    
```

10

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Polipéptido sintético

<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
    
```

20

	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> Polipéptido sintético	
15	<220> <221> MOD_RES <222> (6)..(6) <223> Xaa es Asp o Gly	
	<400> 5 Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Ser Trp Ile His	
	1	5 10
20	<210> 6 <211> 18 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Polipéptido sintético	
30	<220> <221> MOD_RES <222> (4)..(4) <223> Xaa es Ser o Leu	
35	<220> <221> MOD_RES <222> (10)..(10) <223> Xaa es Thr o Ser	
	<400> 6 Ala Trp Ile Xaa Pro Tyr Gly Gly Ser Xaa Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
	1	5 10 15
40	Lys Gly <210> 7 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Polipéptido sintético	
50	<400> 7 Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr	
	1	5
55	<210> 8 <211> 25 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
	<220>	

<223> Polipéptido sintético

<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
 5 20 25

<210> 9
 <211> 13
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

15 <400> 9

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

<210> 10
 20 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> Polipéptido sintético

<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

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

35 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 11

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

<210> 12
 <211> 11
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es Asp o Val

55

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es Val o Ile
 5
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es Ser o Asn
 10
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa es Ala o Phe
 15
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa es Val o Leu
 20
 <400> 12

 Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Ala
 1 5 10
 25 <210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Polipéptido sintético

 <220>
 <221> MOD_RES
 35 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es Phe o Thr

 <220>
 <221> MOD_RES
 40 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es Tyr o Ala

 <400> 13

 Ser Ala Ser Xaa Leu Xaa Ser
 45 1 5

 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido sintético

 55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa es Tyr, Gly, Phe o Ser

 60 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es Leu, Tyr, Phe o Trp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es Tyr, Asn, Ala, Thr, Gly, Phe o Ile
 5
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es His, Val, Pro, Thr o Ile
 10
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa es Ala, Trp, Arg, Pro o Thr
 15
 <400> 14
 Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr
 1 5
 20 <210> 15
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 15
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 30 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20
 <210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 40 <400> 16
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15
 45 <210> 17
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Polipéptido sintético
 <400> 17
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 55

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 18
 10
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10
 <210> 19
 <211> 10
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 20 <400> 19
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His
 1 5 10
 25 <210> 20
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 20
 Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15
 35 Lys Gly
 <210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 45 <400> 21
 Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr
 1 5
 50 <210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Polipéptido sintético
 <400> 22

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10
 <210> 23
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 10 <400> 23
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5
 15 <210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 24
 Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr
 25 1 5
 <210> 25
 <211> 118
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 35 <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
 115

<210> 26
 <211> 122
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido sintético

 10 <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

 15 <210> 27
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Polipéptido sintético

 <400> 27

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

 25 <210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Polipéptido sintético

 <400> 28

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

 <210> 29

<211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <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
 10 20 25 30
 <210> 30
 <211> 14
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 20 <400> 30
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10
 <210> 31
 <211> 15
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Polipéptido sintético
 <400> 31
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 1 5 10 15
 35 <210> 32
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 32
 45 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

ES 2 789 500 T3

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 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

ES 2 789 500 T3

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
<213> Secuencia artificial

- 10 <220>
<223> Polipéptido sintético

<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

- 15 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

ES 2 789 500 T3

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 unión al eje de PD-L1 para su uso en el tratamiento de un paciente que padece un cáncer de vejiga, en el que se ha determinado que una muestra tumoral obtenida del paciente tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 1 % o más, aproximadamente un 5 % o más, o aproximadamente un 10 % o más de la muestra tumoral, y en el que se ha determinado que la muestra tumoral obtenida del paciente es un tumor de subtipo luminal.
2. El antagonista de unión al eje de PD-L1 para su uso de la reivindicación 1, en el que:
 - (i) la mediana del tiempo de supervivencia global de un paciente al que se le administró una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-L1 es de al menos 8 meses, opcionalmente en el que la mediana del tiempo de supervivencia global de un paciente al que se le administró una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-L1 es de al menos aproximadamente 8,8 meses; o
 - (ii) la tasa de respuesta objetiva de un paciente al que se le administró una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-L1 es de al menos aproximadamente un 12 % o al menos aproximadamente un 21 %, opcionalmente en el que la tasa de respuesta objetiva de un paciente al que se le administró una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-L1 es de aproximadamente un 18 %.
3. El antagonista de unión al eje de PD-L1 para su uso de la reivindicación 1, en el que:
 - (i) se ha determinado que la muestra tumoral obtenida del paciente tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 5 % o más de la muestra tumoral, opcionalmente en el que la mediana del tiempo de supervivencia global de un paciente al que se le administró una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-L1 es de al menos 9 meses o al menos 11 meses o la tasa de respuesta objetiva de un paciente al que se le administró una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-L1 es de al menos aproximadamente un 14 % o al menos aproximadamente un 25 %, más opcionalmente en el que la tasa de respuesta objetiva de un paciente al que se le administró una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-L1 es de aproximadamente un 27 % o
 - (ii) se ha determinado que la muestra tumoral obtenida del paciente tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 10 % o más de la muestra tumoral.
4. El antagonista de unión al eje de PD-L1 para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el tumor de subtipo luminal es un tumor de subtipo de cluster luminal II.
5. Un procedimiento para (i) determinar si es probable que un paciente que padece un cáncer de vejiga responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1 o (ii) predecir la reactividad de un paciente que padece un cáncer de vejiga al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1, comprendiendo el procedimiento:

determinar el nivel de expresión de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor en una muestra tumoral obtenida del paciente,

en el que un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 1 % o más, aproximadamente un 5 % o más o aproximadamente un 10 % o más de la muestra tumoral indica que es probable que el paciente responda al tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1, en el que se ha determinado que la muestra tumoral obtenida del paciente es un tumor de subtipo luminal.
6. Un procedimiento para seleccionar un tratamiento para un paciente que padece un cáncer de vejiga, comprendiendo el procedimiento:

determinar el nivel de expresión de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor en una muestra tumoral obtenida del paciente, y

seleccionar un tratamiento que comprende un antagonista de unión al eje de PD-L1 para el paciente en base a un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 1 % o más, aproximadamente un 5 % o más o aproximadamente un 10 % o más de la muestra tumoral, en el que se ha determinado que la muestra tumoral obtenida del paciente es un tumor de subtipo luminal.
7. El antagonista de unión al eje de PD-L1 para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o el procedimiento de la reivindicación 5 o 6, en el que el antagonista de unión al eje de PD-L1 se selecciona del grupo que consiste en un antagonista de unión a PD-L1, un antagonista de unión a PD-1 y un antagonista de unión a PD-L2.

8. El antagonista de unión al eje de PD-L1 para su uso o el procedimiento de la reivindicación 7, en el que el antagonista de unión al eje de PD-L1 es un antagonista de unión a PD-L1, opcionalmente en el que el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a uno o más de sus compañeros de unión a ligando, más opcionalmente en el que el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1, B7-1, o tanto a PD-1 como a B7-1.
9. El antagonista de unión al eje de PD-L1 para su uso o el procedimiento de la reivindicación 7 u 8, en el que el antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo.
10. El antagonista de unión al eje de PD-L1 para su uso o el procedimiento de la reivindicación 9, en el que:
- (i) el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en atezolizumab (MPDL3280A), YW243.55.S70, MDX-1105, MEDI4736 (durvalumab) y MSB0010718C (avelumab);
 - (ii) el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de HVR-H1 de SEQ ID NO:19, la secuencia de HVR-H2 de SEQ ID NO:20 y la secuencia de HVR-H3 de SEQ ID NO:21; y una cadena ligera que comprende la secuencia de HVR-L1 de SEQ ID NO:22, la secuencia de HVR-L2 de SEQ ID NO:23 y la secuencia de HVR-L3 de SEQ ID NO:24 o
 - (iii) 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.
11. El antagonista de unión al eje de PD-L1 para su uso o el procedimiento de la reivindicación 7, en el que el antagonista de unión al eje de PD-L1 es un antagonista de unión a PD-1, opcionalmente, en el que el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a uno o más de sus compañeros de unión a ligando, más opcionalmente, en el que el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L1, PD-L2, o tanto a PD-L1 como a PD-L2.
12. El antagonista de unión al eje de PD-L1 para su uso o el procedimiento de la reivindicación 11, en el que el antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo o una proteína de fusión Fc, opcionalmente en el que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: MDX-1106 (nivolumab), MK-3475 (pembrolizumab), MEDI-0680 (AMP-514), PDR001, REGN2810 y BGB-108, o la proteína de fusión Fc es AMP-224.
13. El antagonista de unión al eje de PD-L1 para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o 7-12, en el que el antagonista de unión al eje de PD-L1 se formula para la administración con un segundo agente terapéutico, opcionalmente en el que el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un agente citotóxico, un agente inhibidor del crecimiento, un agente de radioterapia, un agente antiangiogénico y combinaciones de los mismos.
14. El antagonista de unión al eje de PD-L1 para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o 7-13, o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 5-12, en el que:
- (i) el cáncer de vejiga es un cáncer de vejiga urotelial, opcionalmente en el que el cáncer de vejiga urotelial es un cáncer de vejiga urotelial metastásico o un cáncer de vejiga urotelial localmente avanzado;
 - (ii) el paciente ha progresado después del tratamiento con un agente quimioterápico derivado de platino;
 - (iii) la muestra tumoral es una muestra tumoral fijada en formol e incluida en parafina (FFIP), una muestra tumoral de archivo, una muestra tumoral fresca o una muestra tumoral congelada;
 - (iv) el nivel de expresión de PD-L1 es un nivel de expresión de proteínas, opcionalmente en el que el nivel de expresión de proteínas de PD-L1 se determina usando un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en inmunohistoquímica (IHQ), inmunofluorescencia, citometría de flujo e inmunoelectrotransferencia, más opcionalmente en el que el nivel de expresión de proteínas de PD-L1 se determina usando IHQ y/o el nivel de expresión de proteínas de PD-L1 se detecta usando un anticuerpo anti-PD-L1 o
 - (v) el nivel de expresión de PD-L1 es un nivel de expresión de ARNm, opcionalmente en el que el nivel de expresión de ARNm de PD-L1 se determina usando un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), qPCR con transcripción inversa (RT-qPCR), secuenciación de ARN, análisis de micromatrices, hibridación *in situ* y análisis en serie de la expresión génica (SAGE).
15. Una composición que comprende una cantidad eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-L1 para su uso en un procedimiento para tratar a un paciente que padece un cáncer de vejiga, en el que se ha determinado que una muestra tumoral obtenida del paciente tiene un nivel de expresión detectable de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes de tumor que comprende aproximadamente un 1 % o más, un 5 % o más o un 10 % o más de la muestra tumoral, en el que se ha determinado que la muestra tumoral obtenida del paciente es un tumor de subtipo luminal.

16. El antagonista de unión al eje de PD-L1 para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o 7-14, el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 5-12 o 14, o la composición para su uso de la reivindicación 15, en el que:

(a) se ha determinado que el nivel de expresión de al menos uno de *CDKN2A*, *GATA3*, *FOXA1* y *ERBB2* en la muestra tumoral obtenida del paciente se incrementa en relación con un nivel de referencia del al menos un gen, opcionalmente en el que se ha determinado que los niveles de expresión de *CDKN2A*, *GATA3*, *FOXA1* y *ERBB2* en la muestra tumoral obtenida del paciente incrementan en relación con los niveles de referencia de los genes; y/o

(b) se ha determinado que el nivel de expresión de al menos uno de *FGFR3*, *KRT5*, *KRT14* y *EGFR* en la muestra tumoral obtenida del paciente disminuye en relación con un nivel de referencia del al menos un gen, opcionalmente en el que se ha determinado que los niveles de expresión de *FGFR3*, *KRT5*, *KRT14* y *EGFR* en la muestra tumoral obtenida del paciente disminuyen en relación con los niveles de referencia de los genes, más opcionalmente en el que:

(c) se ha determinado que el nivel de expresión de miR-99a-5p o miR100-5p en la muestra tumoral obtenida del paciente se incrementa en relación con un nivel de referencia del microARN (miARN); y/o

(d) se ha determinado que el nivel de expresión de al menos uno de *CD8A*, *GZMA*, *GZMB*, *IFNG*, *CXCL9*, *CXCL10*, *PRF1* y *TBX21* en la muestra tumoral obtenida del paciente se incrementa en relación con un nivel de referencia del al menos un gen, más opcionalmente en el que se ha determinado que los niveles de expresión de al menos *CXCL9* y *CXCL10* en la muestra tumoral obtenida del paciente se incrementan en relación con los niveles de referencia de los genes.

Figuras 1A-1B

1A

Prevalencia de PD-L1 en CVU	
Puntuación de CI (N = 205)	CI puntuadas como PD-L1+, n (%)
CI3	18 (9 %)
CI2	37 (18 %)
CI1	89 (43 %)
CI0	61 (30 %)

1B



Expresión de PD-L1 en CI

Figura 2

IHQ de PD-L1, n = 87	TRO, % (IC del 95 %)		RC, n (%)		RP, n (%)	
CI3 (n = 12)	67 % (35, 90)	50 % (35, 65)	4 (33 %)	9 (20 %)	4 (33 %)	14 (30 %)
CI2 (n = 34)	44 % (27, 62)		5 (15 %)		10 (29 %)	
CI1 (n = 26)	19 % (7, 39)	17 % (7, 32)	-	-	5 (19 %)	7 (17 %)
CI0 (n = 15)	13 % (2, 40)		-		2 (13 %)	

Figura 3

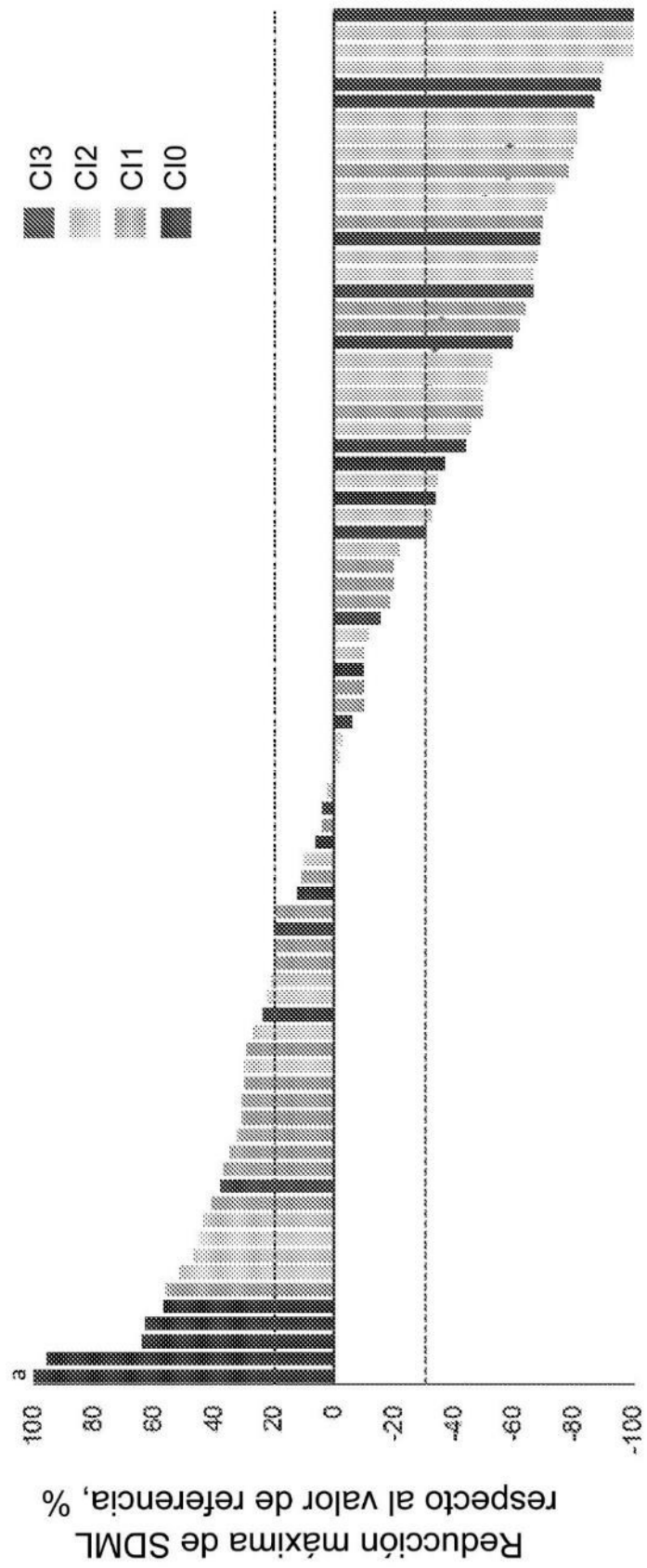


Figura 4

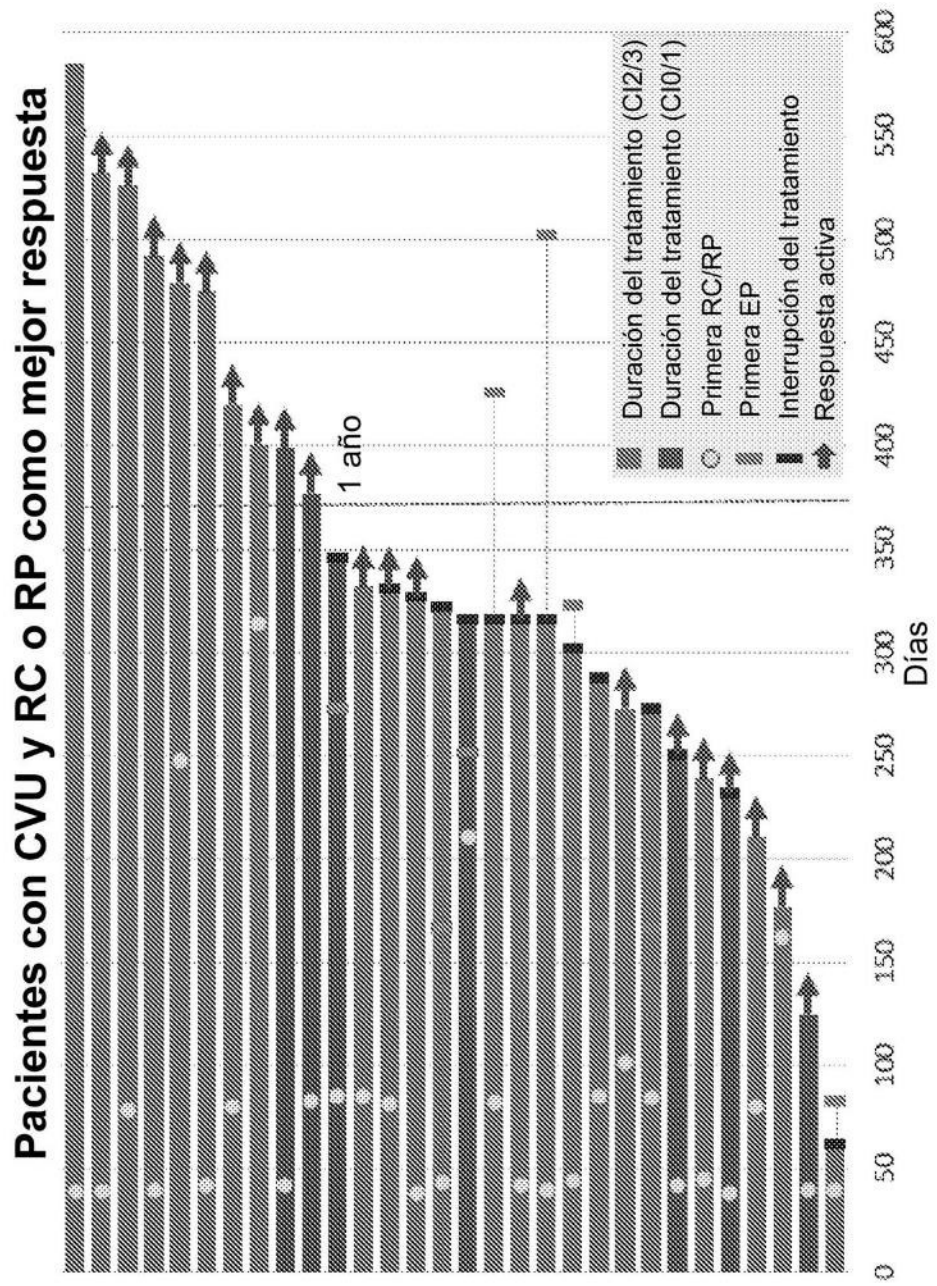


Figura 5A

Supervivencia N = 92	CI2/3 n = 48	CI0/1 n = 44
SSP		
Mediana de SSP (meses)	6 meses (0+ a 18)	1 mes (0+ a 14+)
SSP a 1 año (IC del 95 %)	39 % (24-54)	10 % (0-21)
SG		
Mediana de SG (meses)	No alcanzado (1 a 20+ meses)	8 meses (1 a 15+ meses)
Supervivencia a 1 año (IC del 95 %)	57 % (41-73)	38 % (19-56)

Figura 5B

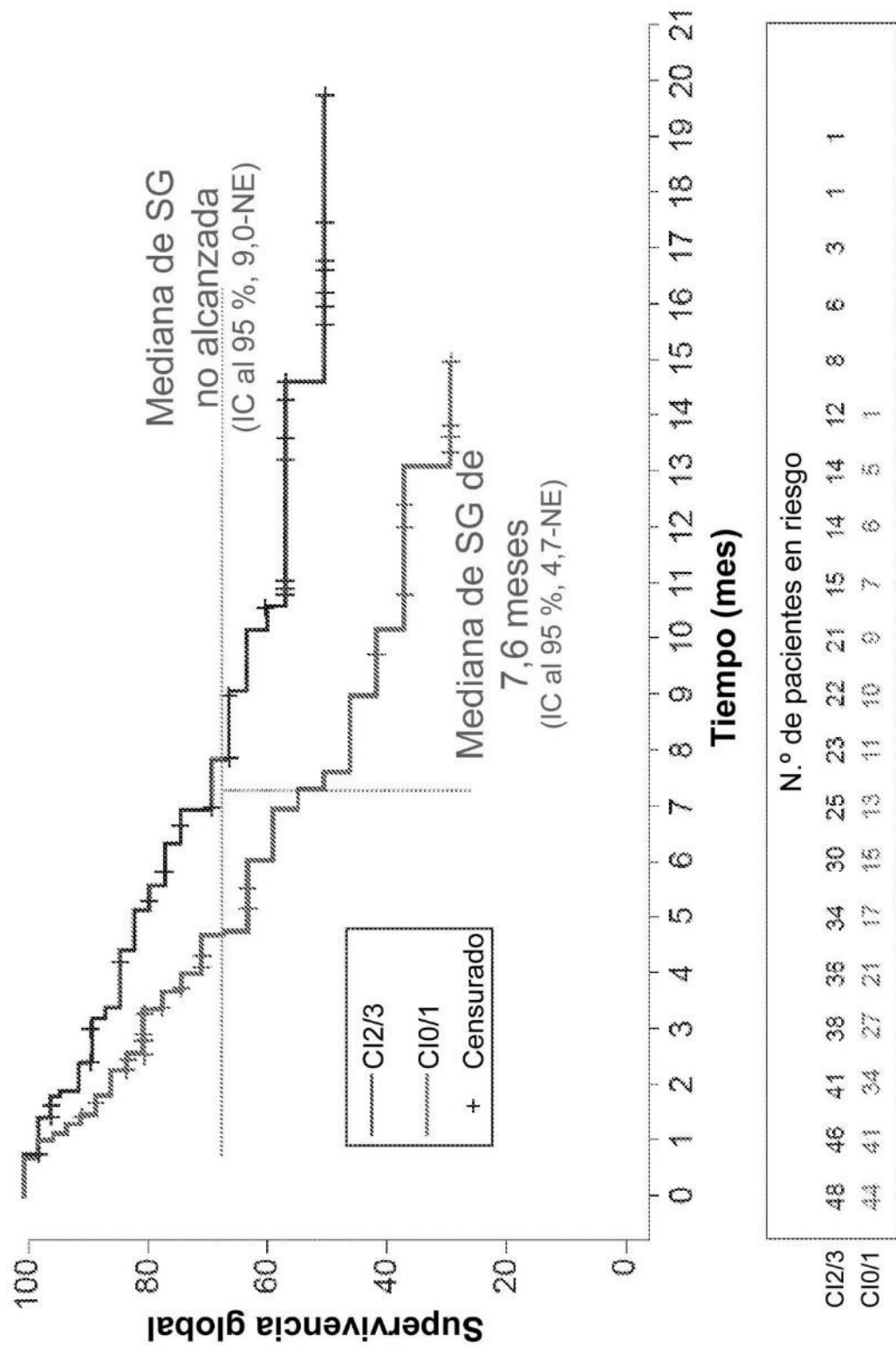
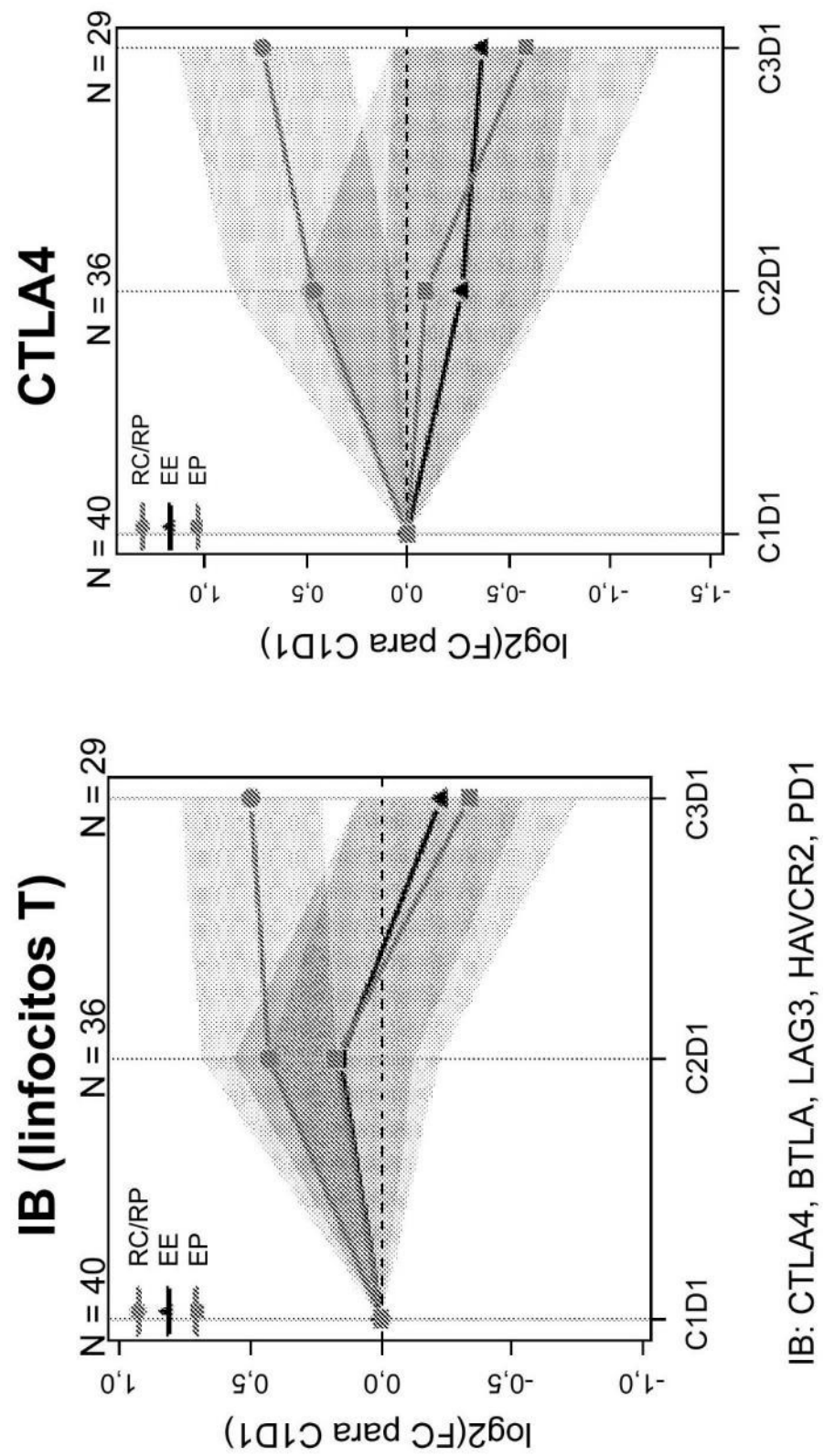


Figura 6



IB: CTLA4, BTLA, LAG3, HAVCR2, PD1

Figura 7

Esquema de ensayo IMvigor 210

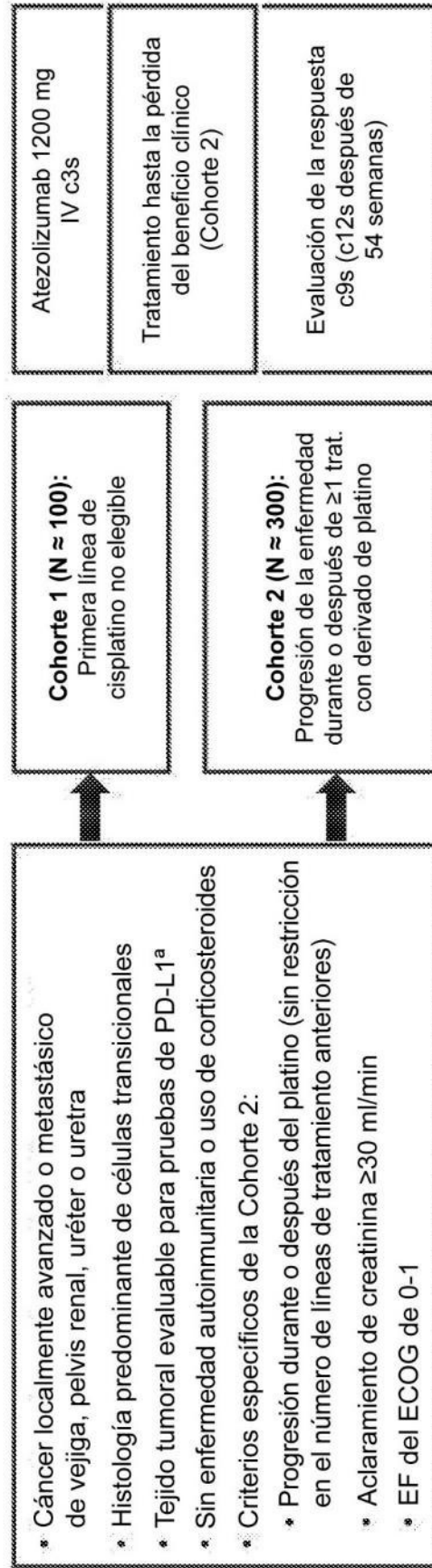
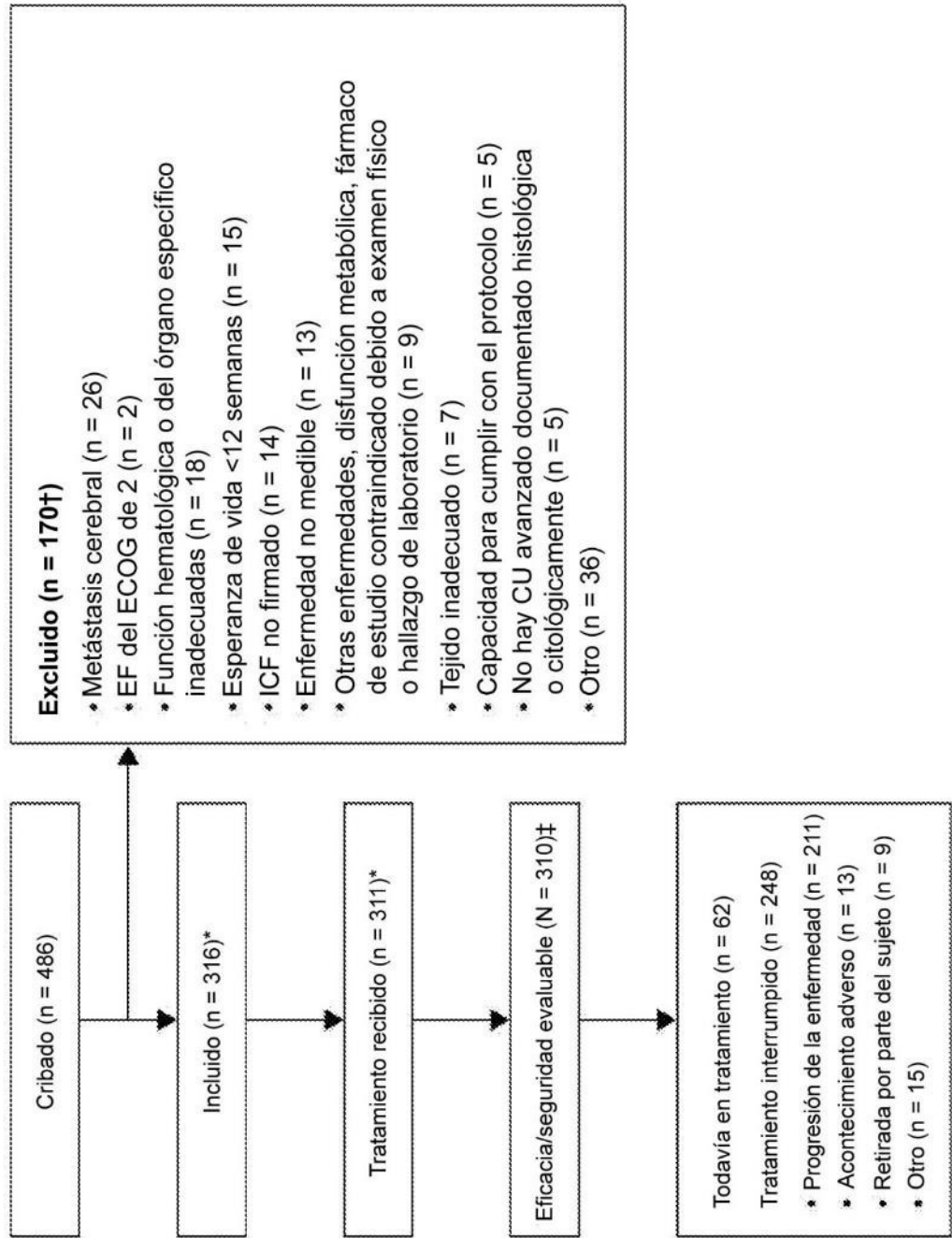


Figura 8

Participante de la Cohorte 2 IMvigor 210



Figuras 9A-9C

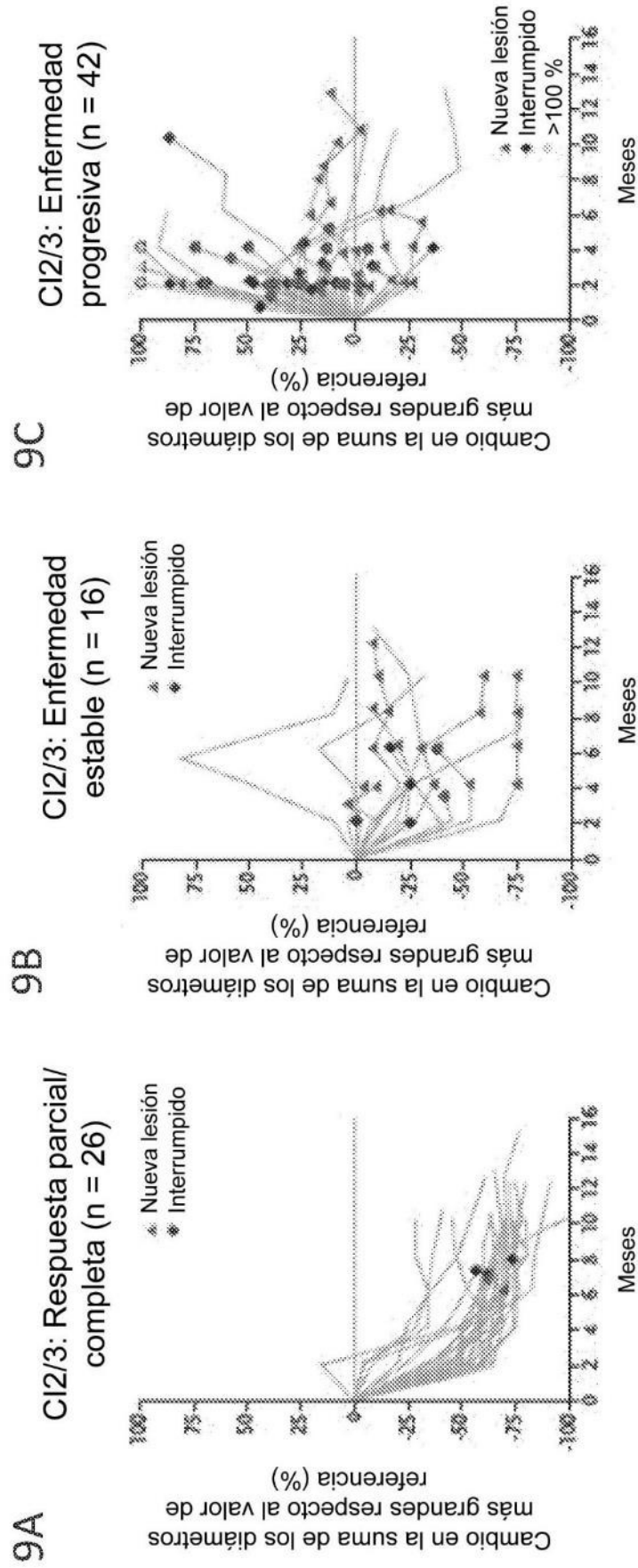


Figura 9D

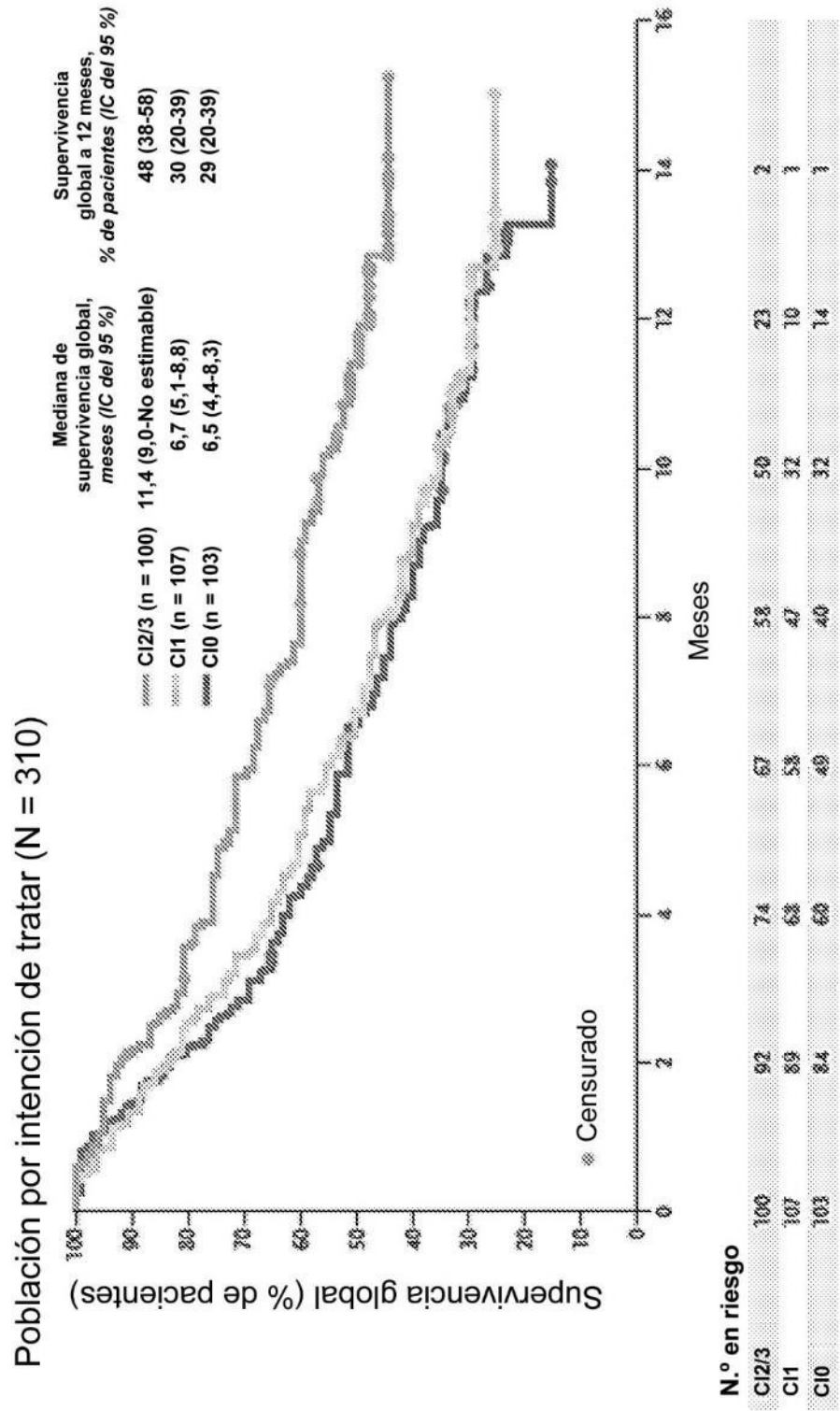


Figura 10A

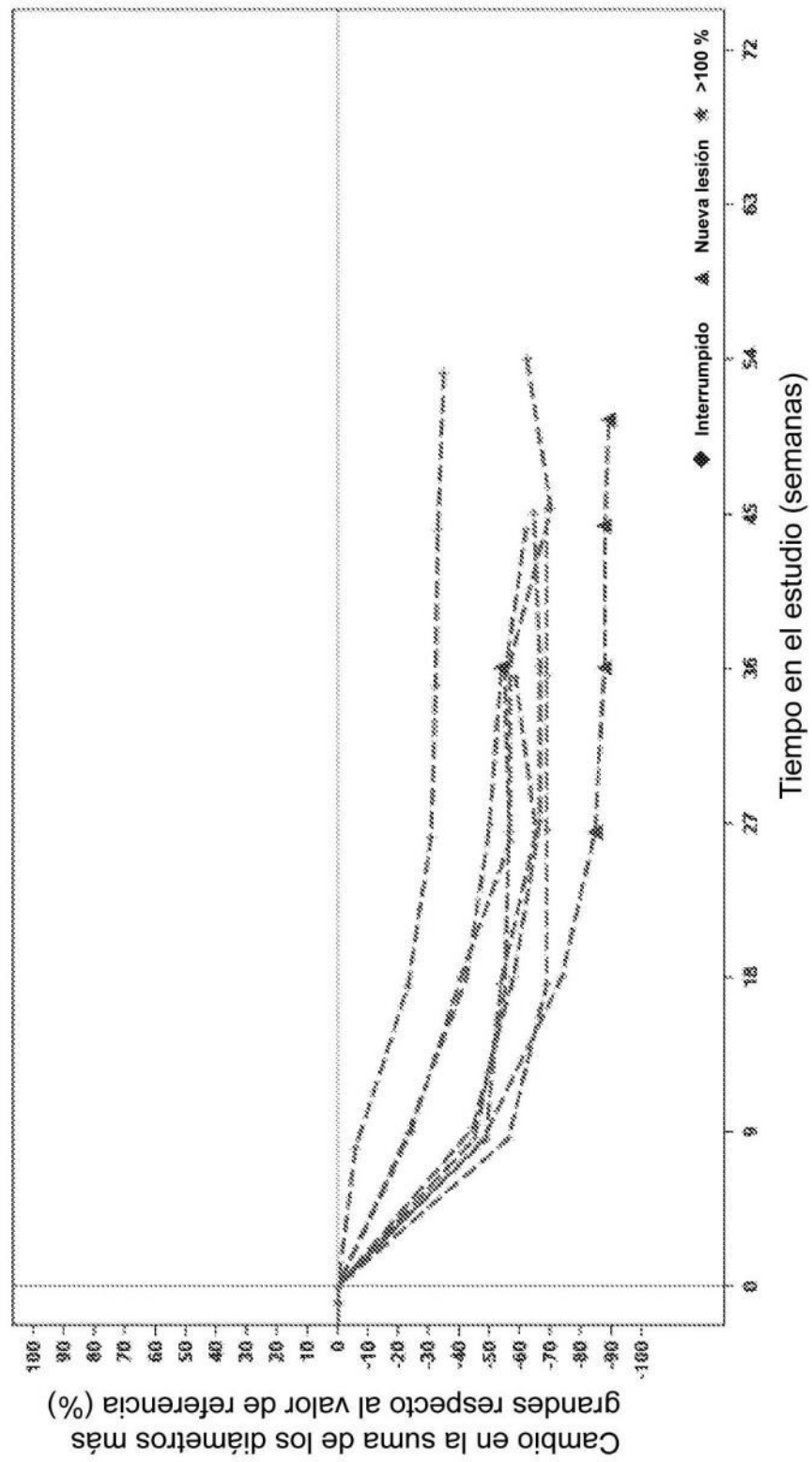


Figura 10B

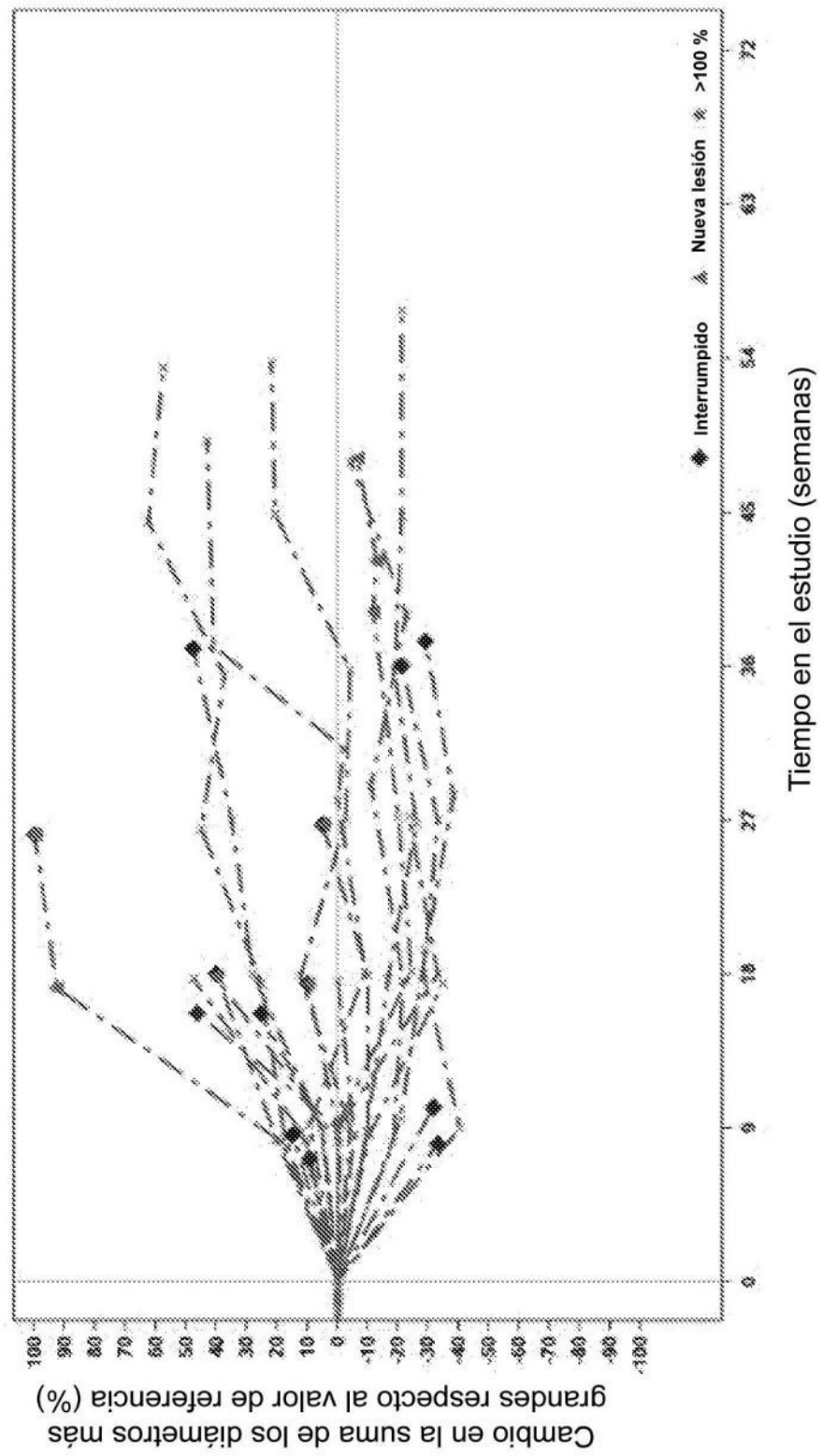


Figura 10C

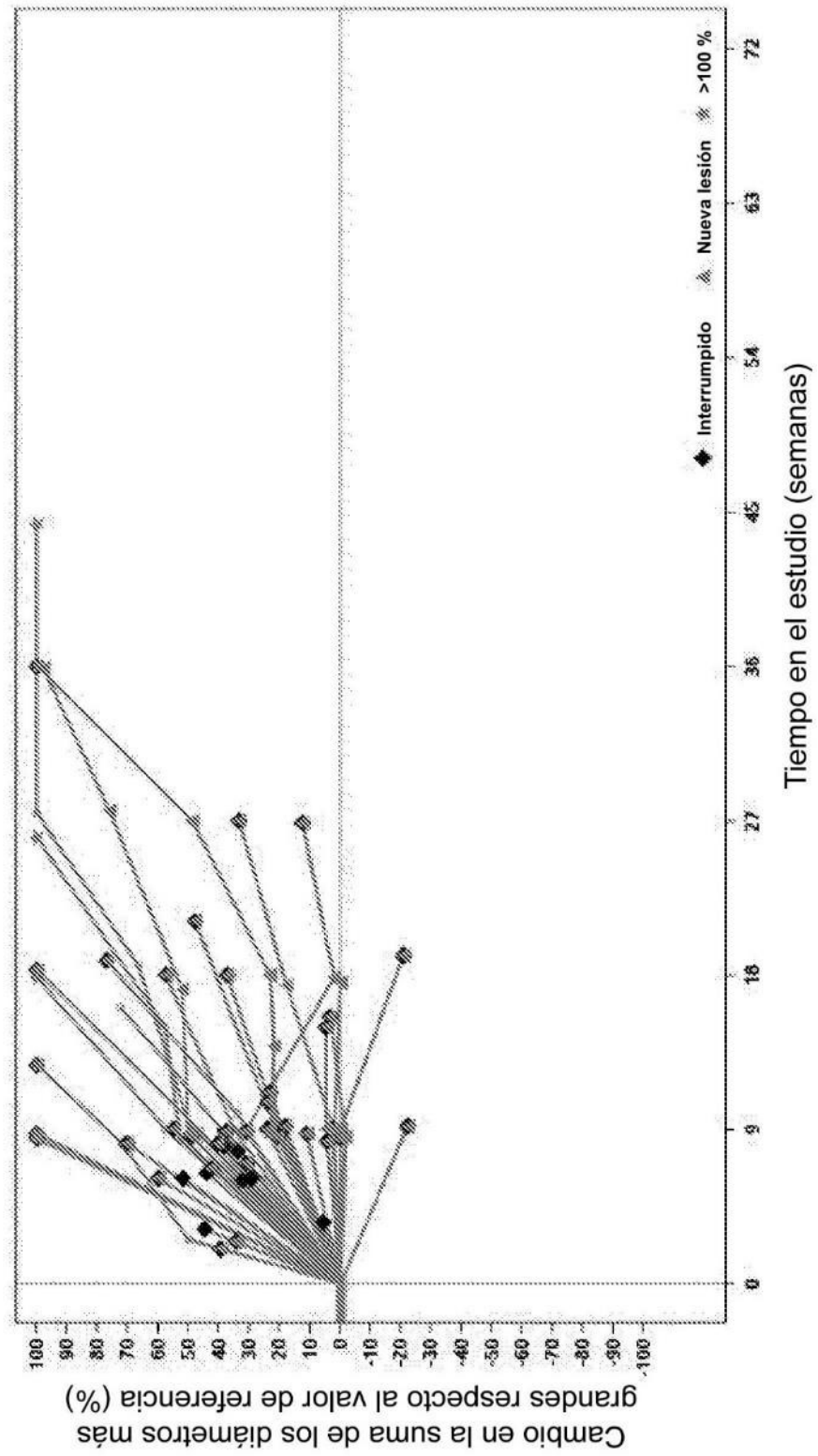


Figura 10D

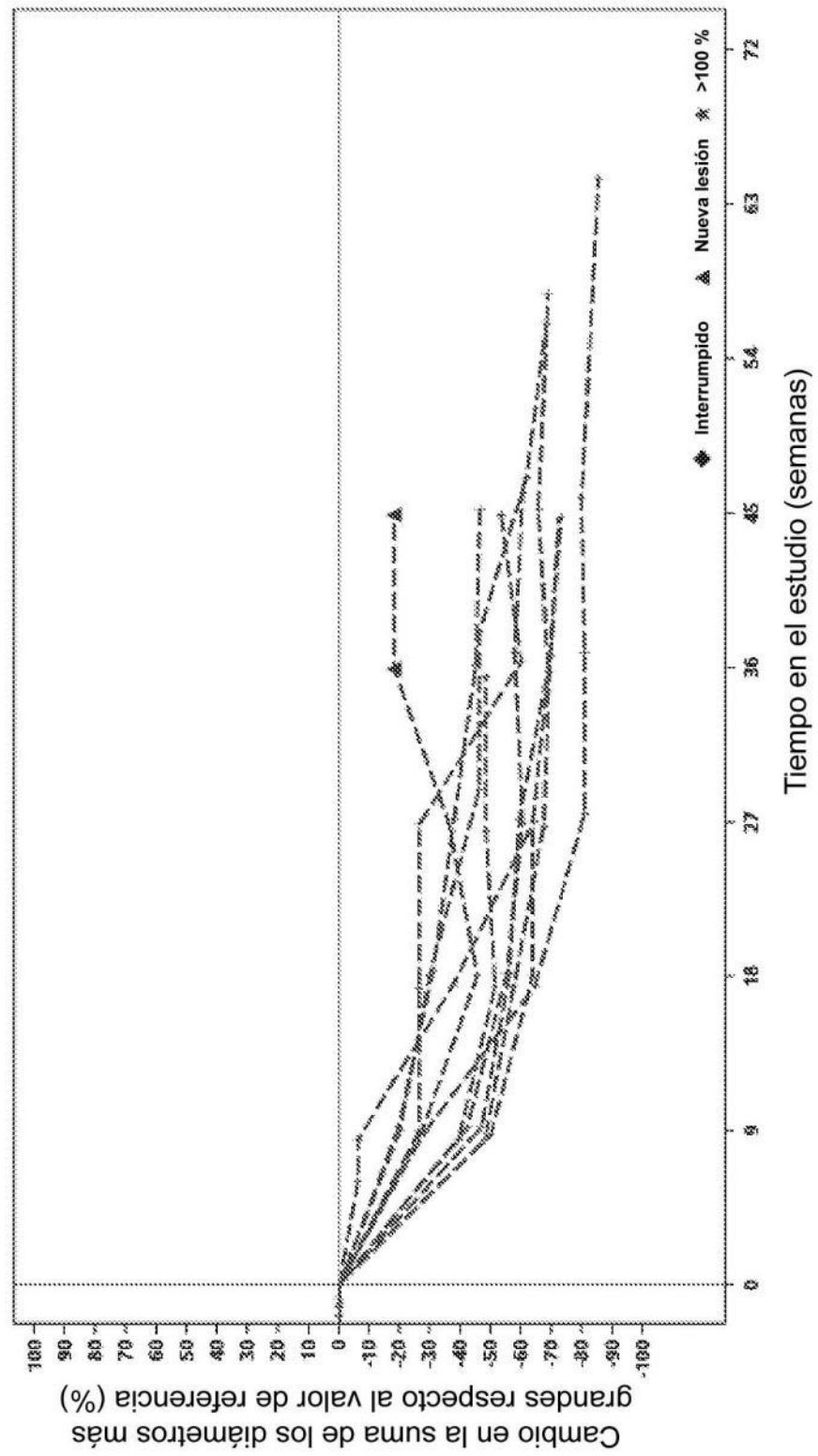


Figura 10E

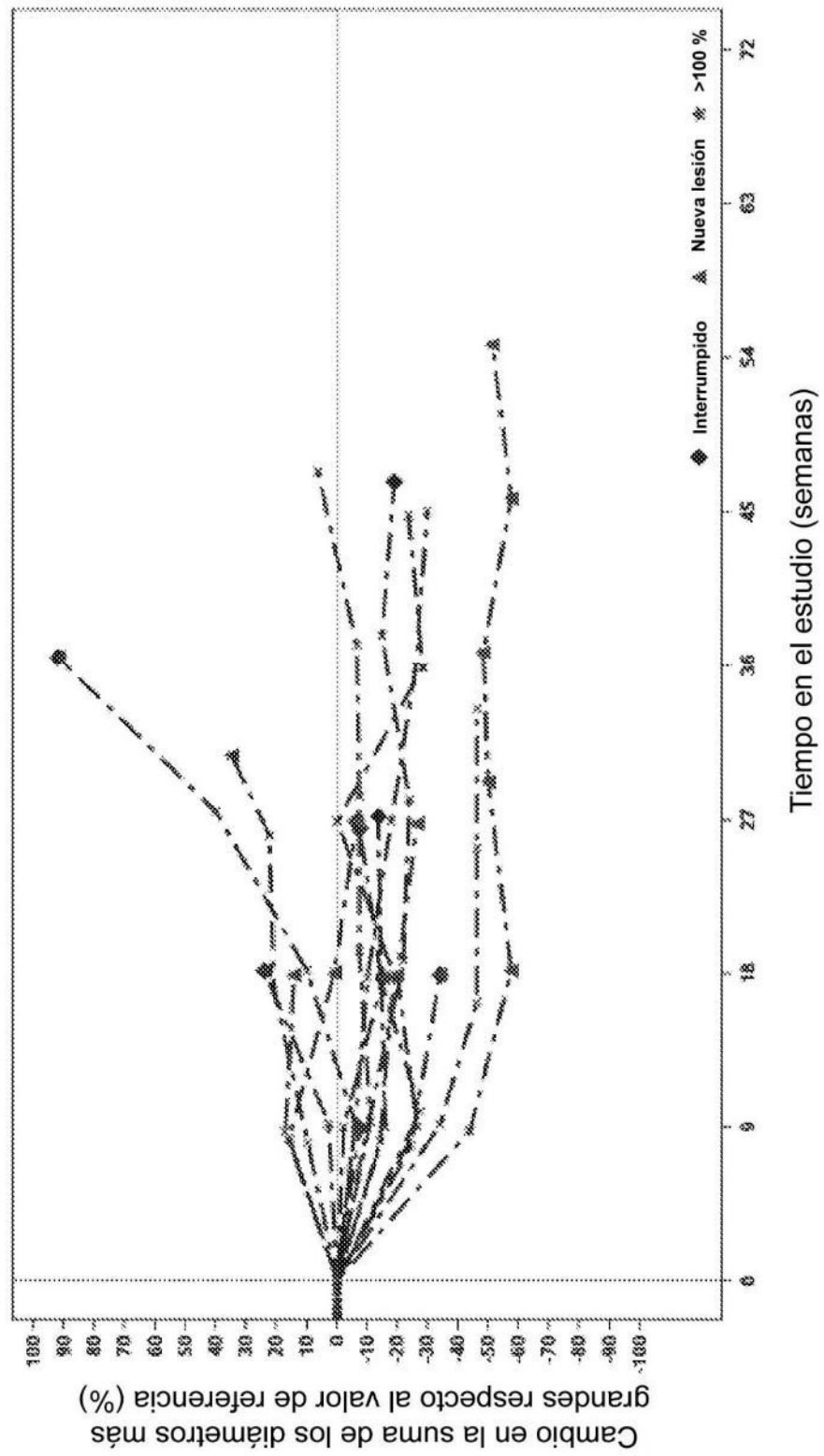


Figura 10F

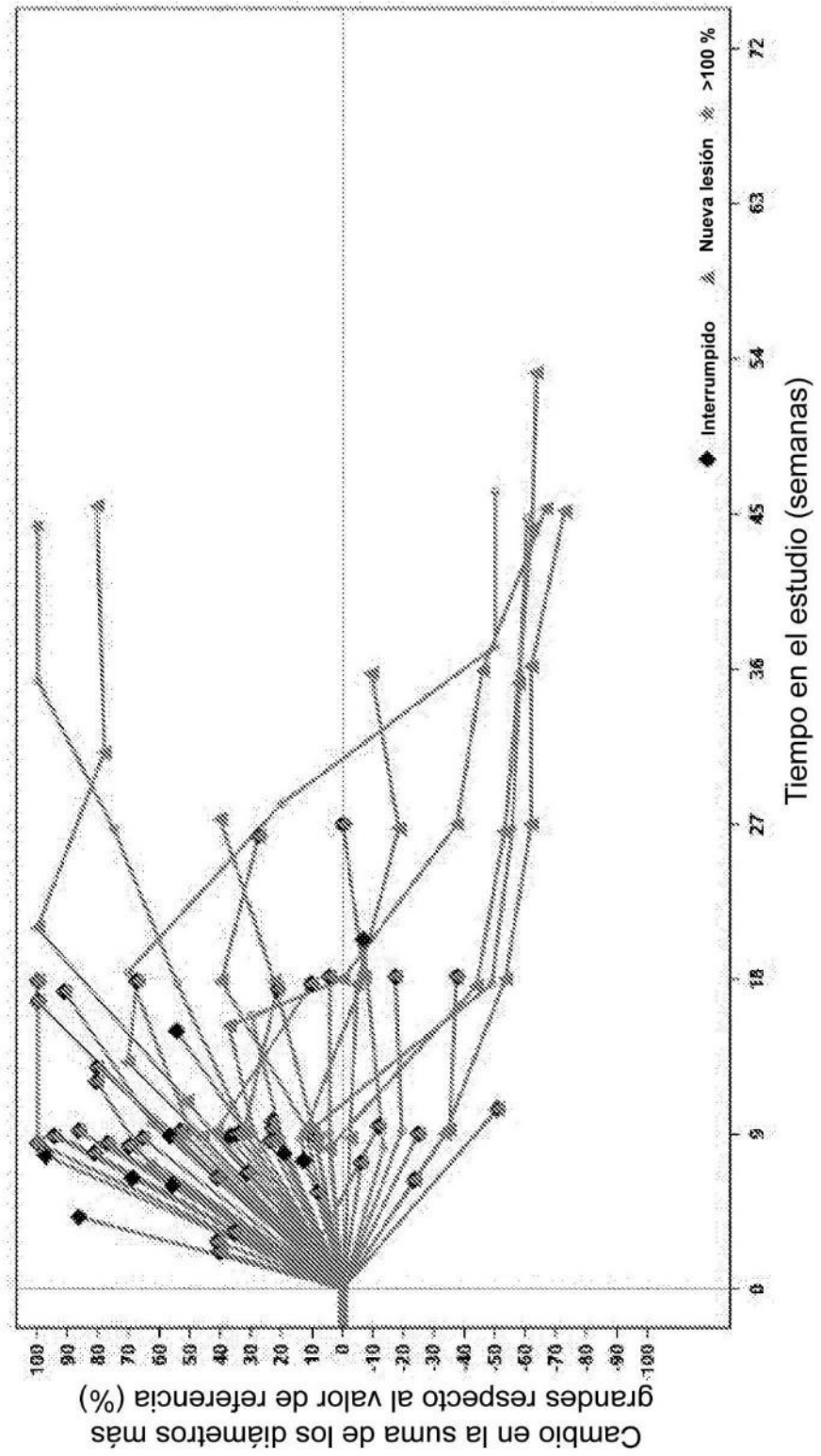


Figura 11A

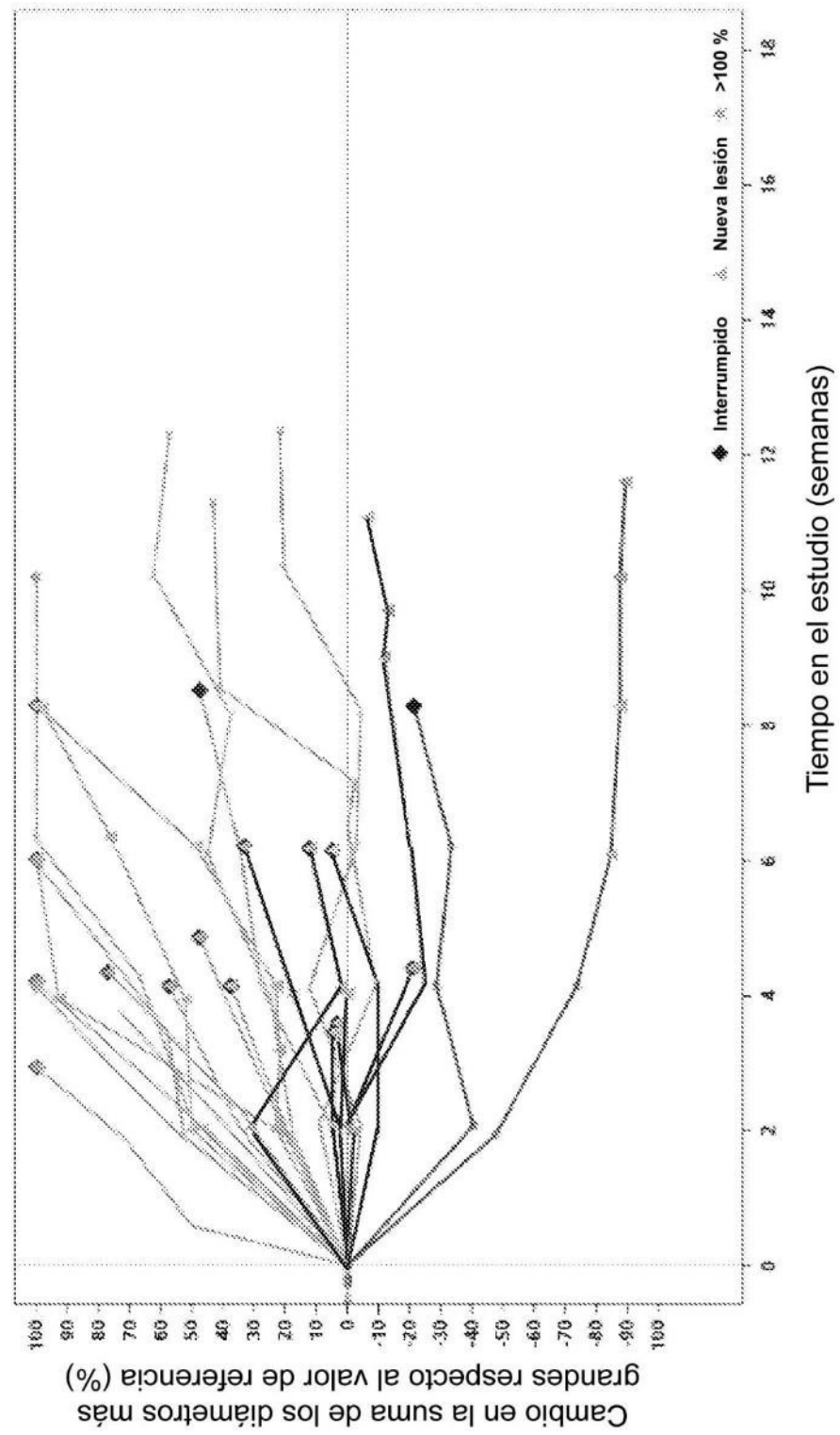


Figura 11B

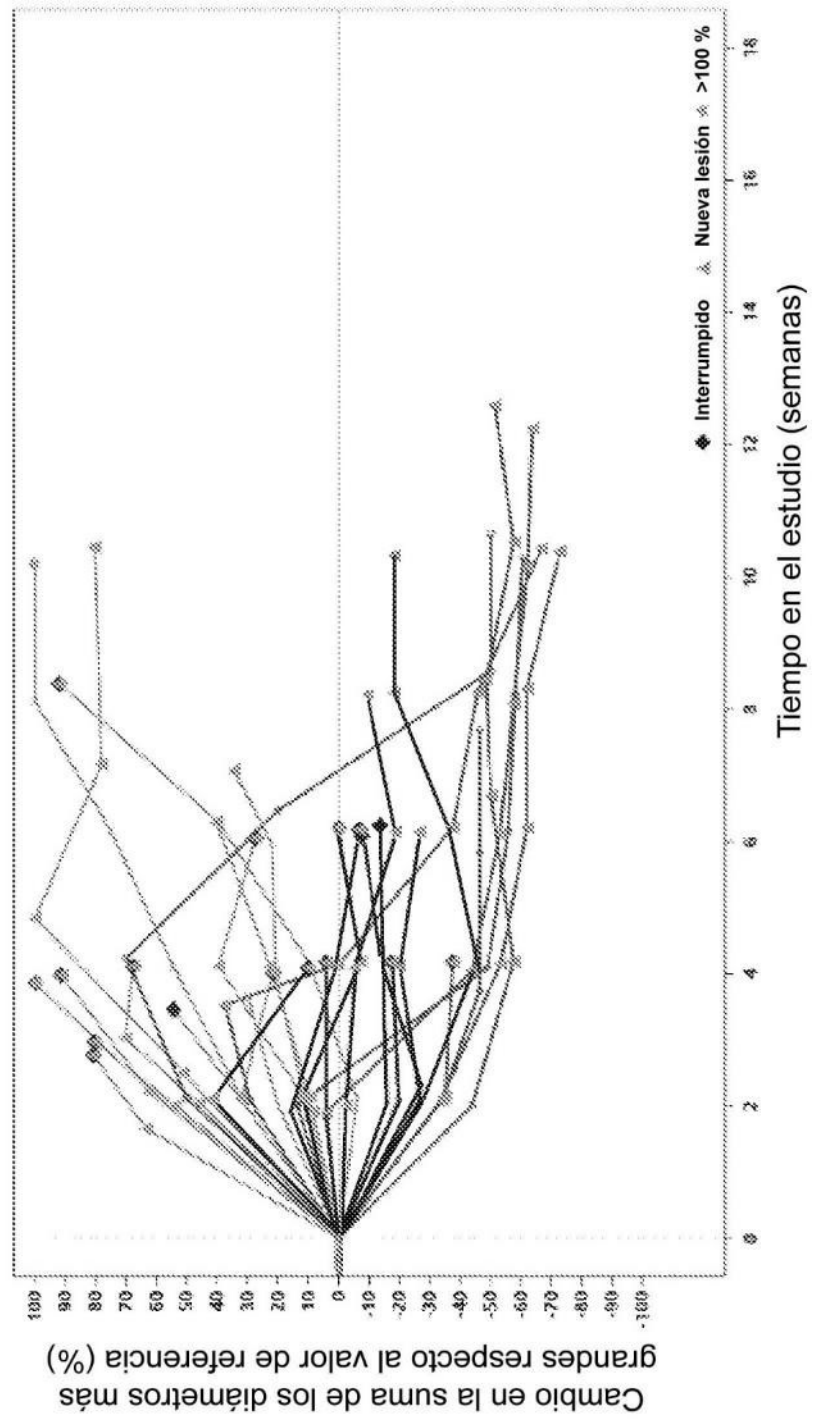
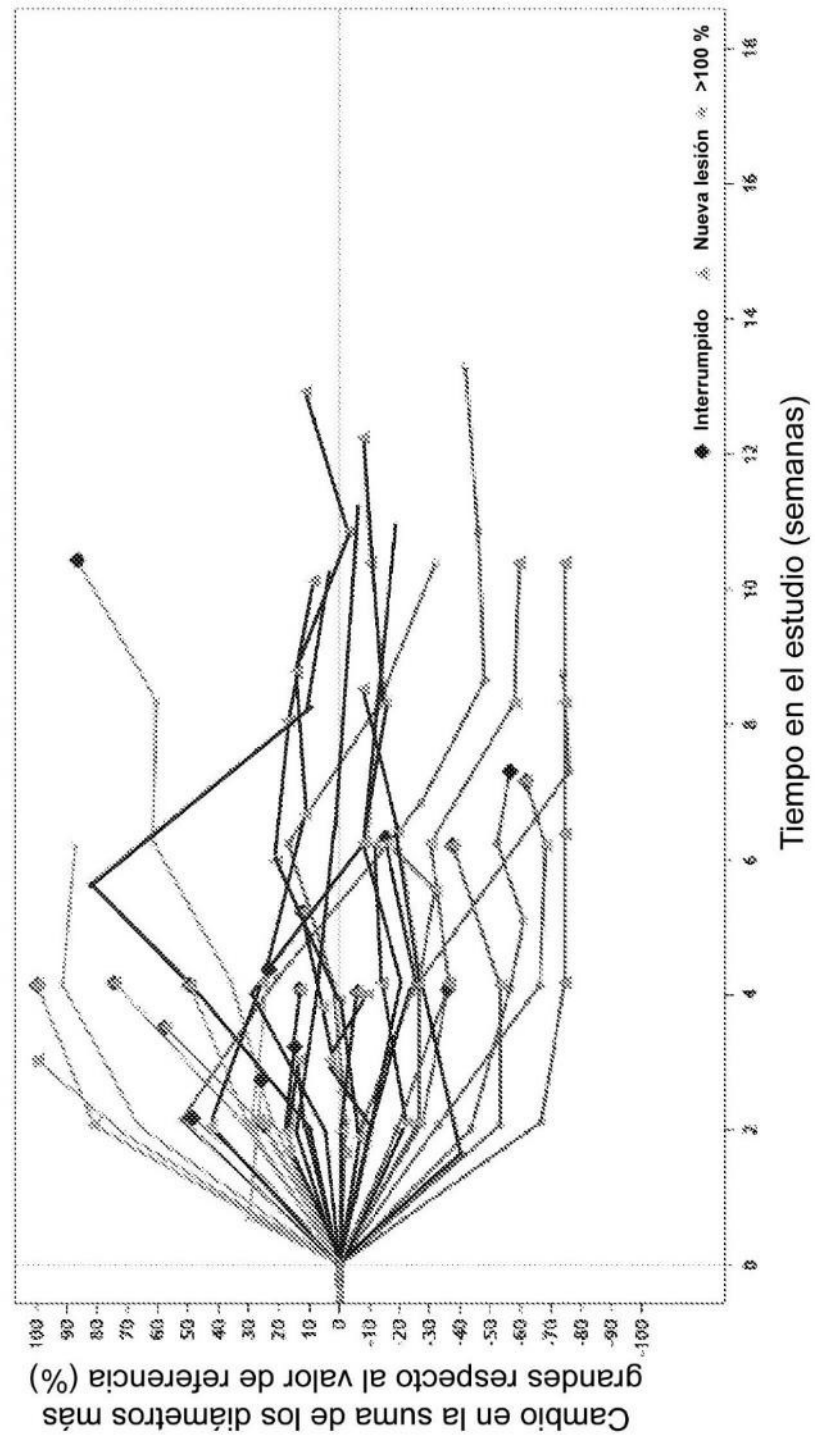
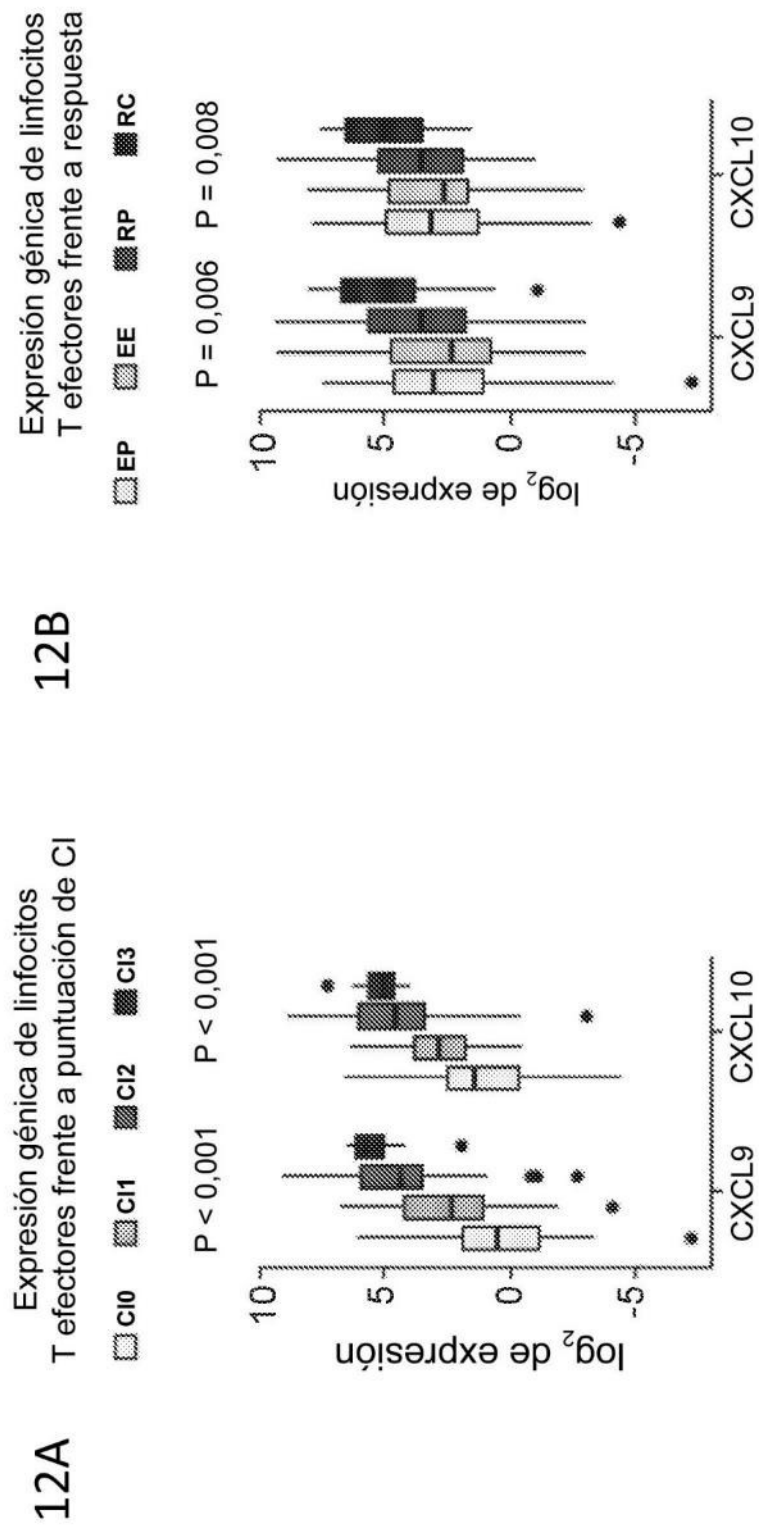


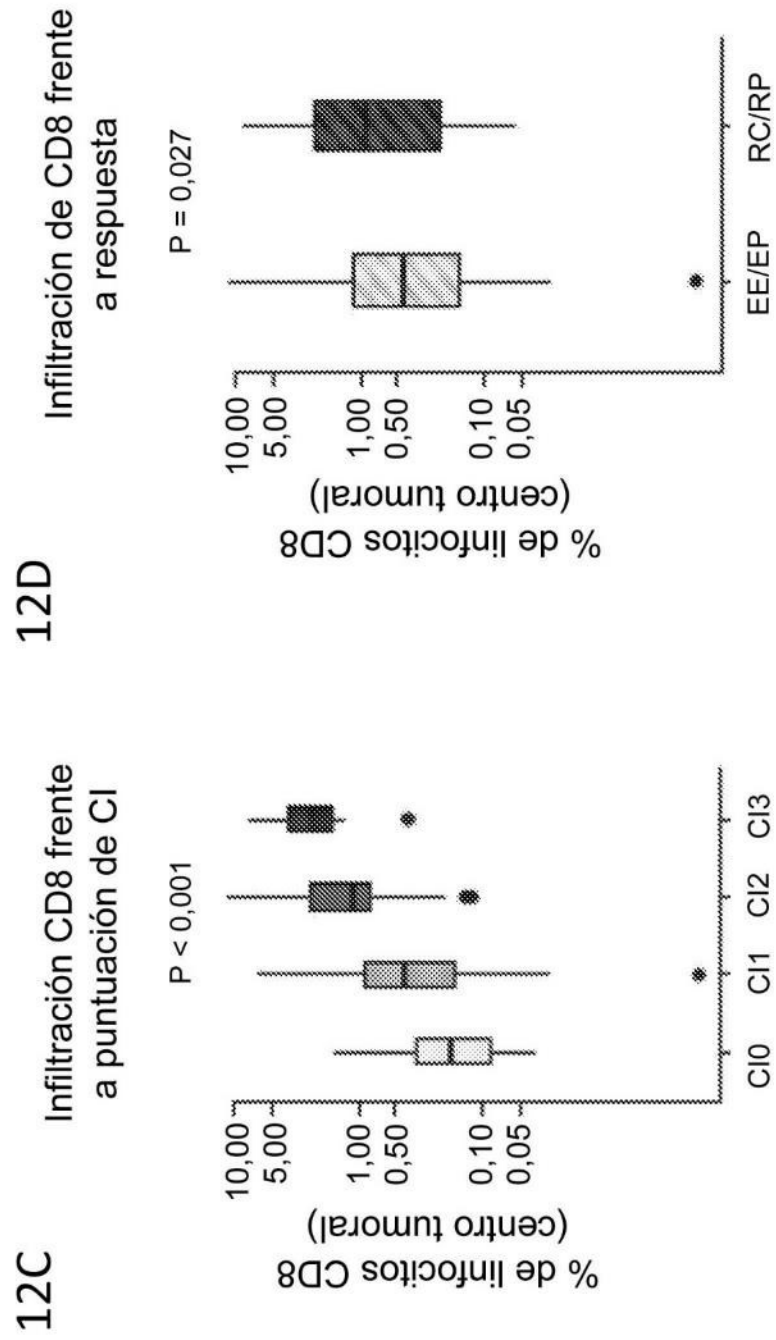
Figura 11C



Figuras 12A-12B



Figuras 12C-12D



Figuras 12E-12F

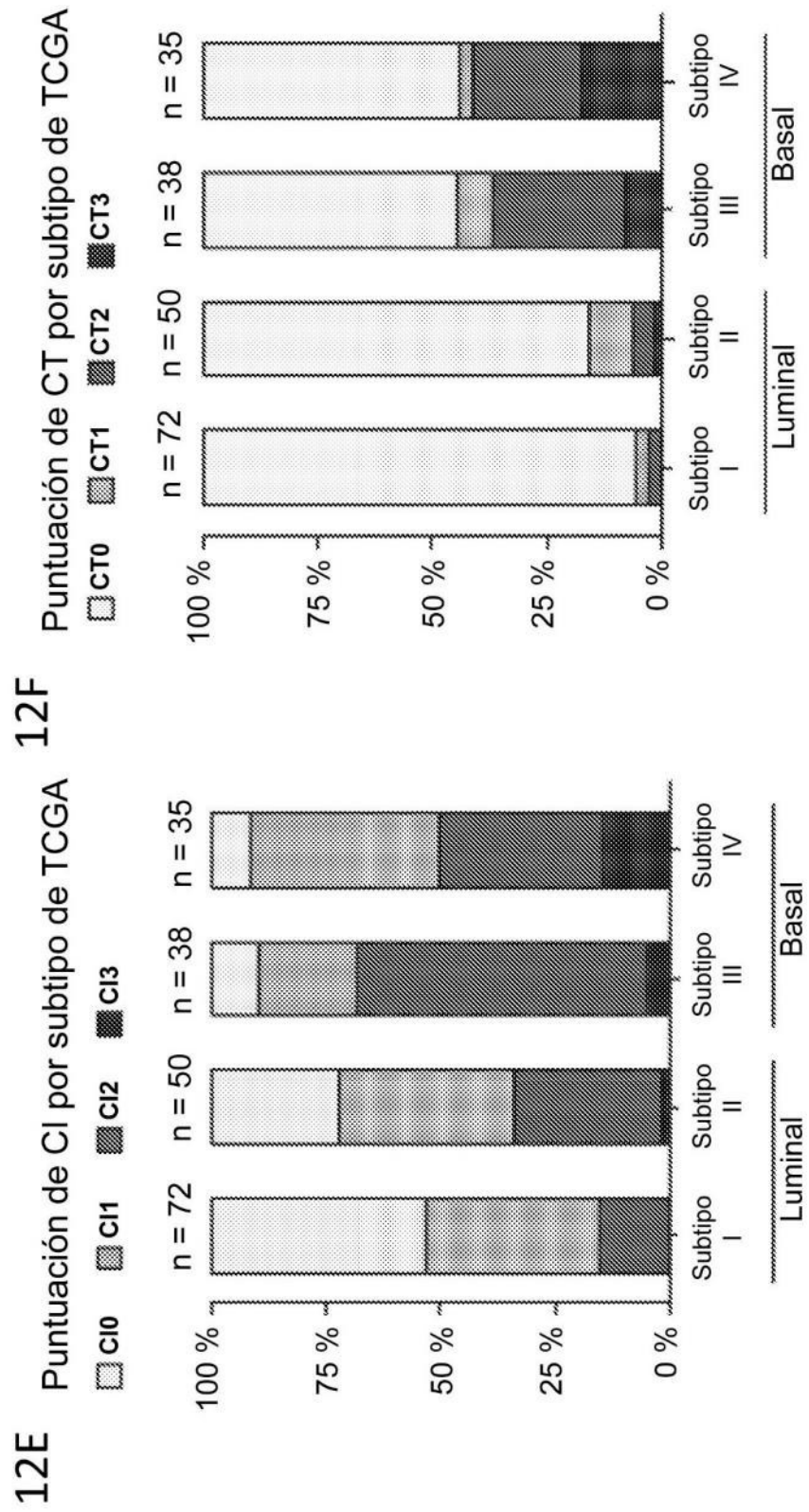


Figura 12G

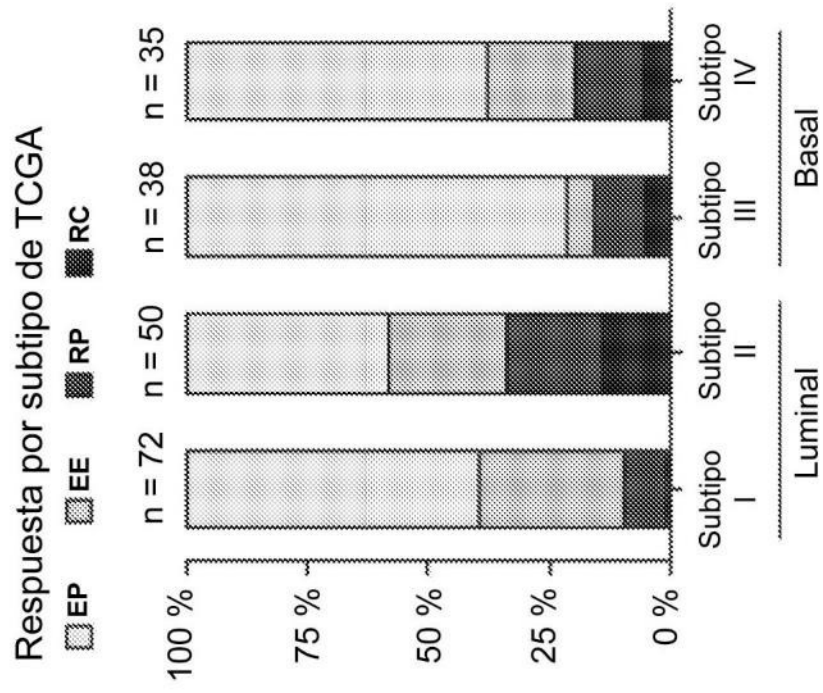


Figura 13A

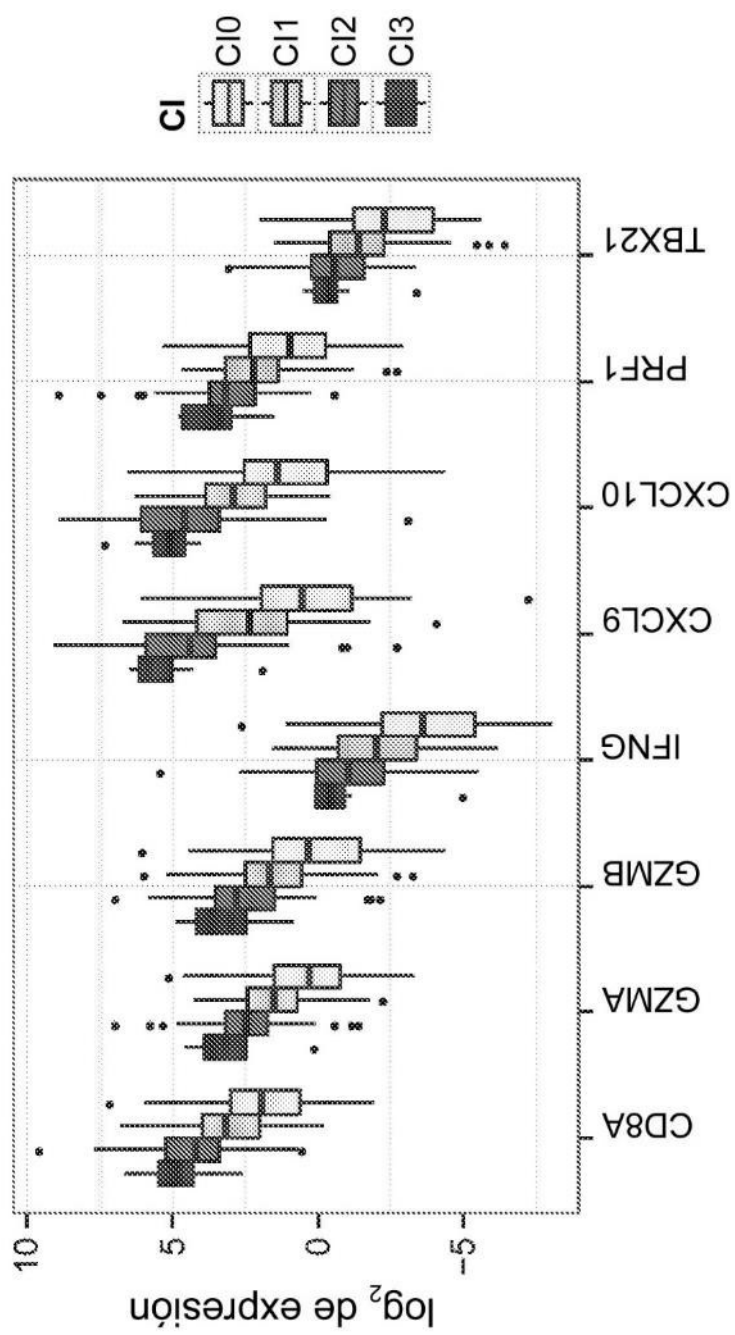


Figura 13B

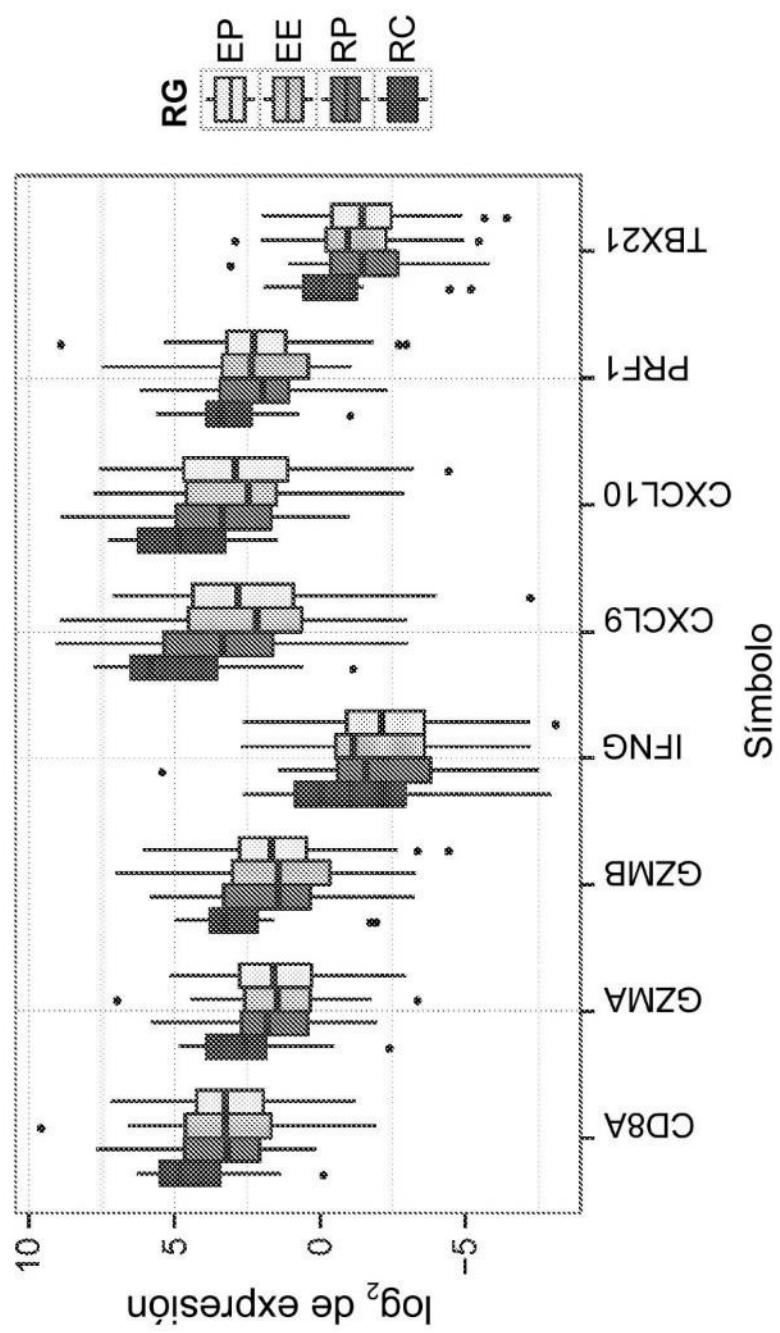


Figura 14

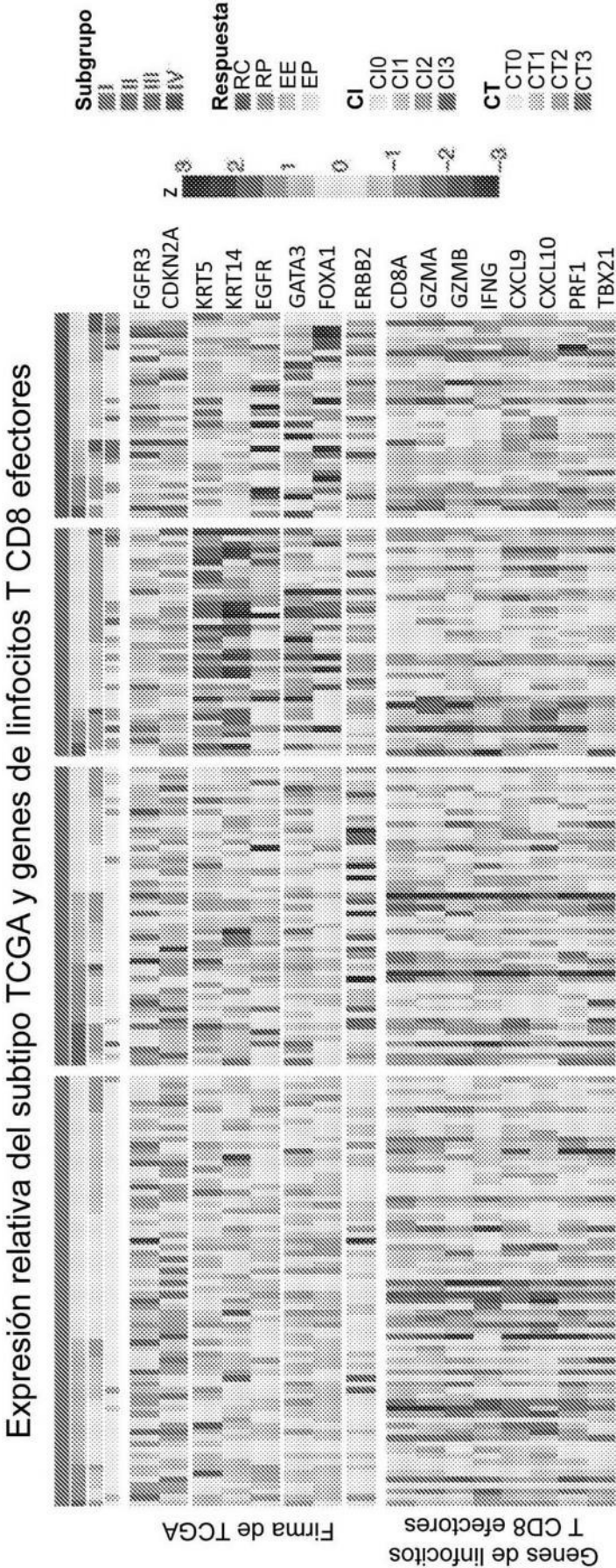


Figura 15

