

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 950**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.02.2016 PCT/EP2016/052107**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.08.2016 WO16124558**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2016 E 16702150 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 3254110**

54 Título: **Ensayo histoquímico para evaluar la expresión del ligando de muerte programada 1 (PD-L1)**

30 Prioridad:

**03.02.2015 US 201562111352 P**

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

**06.11.2020**

73 Titular/es:

**VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (100.0%)  
1910 E. Innovation Park Drive  
Tucson, Arizona 85755, US**

72 Inventor/es:

**MISTRY, AMITA y  
SABALOS, CONSTANTINE**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 791 950 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**

Ensayo histoquímico para evaluar la expresión del ligando de muerte programada 1 (PD-L1)

**5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION****CAMPO TÉCNICO**

10 Esta divulgación se refiere a procedimientos histoquímicos de clasificación de un tumor en base a la expresión del ligando de muerte programada 1 (PD-L1), en particular en combinación con tratamientos que alteran la señalización iniciada por PD-L1.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA**

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

25 El PD-L1 está involucrado en la regulación negativa de algunas respuestas inmunitarias y puede desempeñar un papel importante en la regulación de la tolerancia periférica. Es conocido que el PD-L1 se une a dos receptores: proteína de muerte celular programada 1 (PD-1, también conocida como PCDP-1 y CD279); y B7-1 (también conocido como CD80). La interacción de PD-L1 con PD1 o con B7-1 da como resultado la inhibición de la proliferación mediada por TCR y la producción de citocinas (Freeman *et al.*, J. Exp. Med. 192(7): 1027-34 (2000); Butte *et al.*, Immunity 27(1): 111-22 (2007)). Se ha sugerido que PD-L1 desempeña un papel en la inmunidad tumoral al incrementar la apoptosis de los clones de linfocitos T específicos de antígeno (Dong *et al.* Nat Med 8:793-800 (2002)). De hecho, se ha encontrado expresión de PD-L1 en varios cánceres murinos y humanos, incluyendo carcinoma de pulmón, ovario y colon y en diversos mielomas humanos (Iwai *et al.* PNAS 99:12293-7 (2002); Ohigashi *et al.* Clin Cancer Res 11:2947-53 (2005)). Por tanto, la medición de la cantidad de proteína PD-L1 en muestras biológicas puede ayudar en la detección temprana de patologías cancerosas y puede ayudar a evaluar la eficacia y durabilidad de los fármacos en fase de investigación clínica que inhiben la unión de la proteína PD-L1.

40 El documento WO 2014/165422 A1 divulga un procedimiento para pronosticar si es probable que un paciente humano con diagnóstico de carcinoma de pulmón no microcítico responda al tratamiento con un antagonista de PD-1, en el que se asigna una "puntuación P modificada" (PPM) a un corte histológico que se ha teñido con un ensayo IHQ en cada nido tumoral usando un anticuerpo que se une específicamente al PD-L1 humano. La PPM resulta de estimar, en todas las células tumorales viables y leucocitos monomorfonucleares inflamatorios en todos los nidos tumorales examinados, el porcentaje de células que tienen una tinción al menos parcial de la membrana de cualquier intensidad. El procedimiento de puntuación puede comprender además asignar una "puntuación de estroma" basada en la presencia o ausencia de tinción de la membrana del PD-L1 en el estroma que rodea cada nido tumoral.

50 El documento WO 2014/165082 A2 se refiere al cribado y desarrollo de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que se unen específicamente al PD-L1. En particular, se divulgan anticuerpos anti-PD-L1 que tienen secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera específicas, y el uso de estos anticuerpos para la detección del PD-L1 en ensayos IHQ con muestras de tejido fijadas con formol e incluidas en parafina.

55 Un comunicado de prensa de Ventana Medical Systems, Inc. y MedImmune (<http://www.ventana.com/documents/media/pd-l1-assay-6-4-2014.pdf>) anuncia el desarrollo de un ensayo IHQ con el anticuerpo monoclonal de conejo anti-PD-L1 SP263 para inscribir pacientes en ensayos clínicos para el tratamiento anti-PD-L1 con MEDI4736 de MedImmune para el cáncer de pulmón no microcítico.

60 Weber *et al.* (J Clin Oncol. 1 de diciembre de 2013; 31(34):4311-8) divulgan los resultados de un estudio de fase I con noventa pacientes con melanoma que se trataron con nivolumab, un anticuerpo humano que bloquea la inmunoglobulina G4 contra el PD-1. El análisis inmunohistoquímico de tumores antes del tratamiento de cuarenta y cuatro pacientes para la detección del PD-L1 muestra una asociación significativa entre la tinción del PD-L1 y la respuesta al tratamiento. Sin embargo, también se señala que la tinción del PD-L1 no se podría usar para seleccionar con exactitud a pacientes para el tratamiento con nivolumab porque los pacientes con tinción negativa podrían responder al nivolumab.

65 Ribas *et al.* (Clin Cancer Res. 1 de octubre de 2014; 20(19):4982-4) analizan en general las posibles interacciones entre las células cancerosas y los linfocitos T limitadas por PD1/PD-L1 y llegan a la conclusión de que los ensayos

para pronosticar la respuesta de un paciente al tratamiento con anticuerpos anti-PD1/PD-L1 probablemente tendrá que tener en cuenta la expresión de PD-L1, así como otras variables que cuantifican la infiltración de linfocitos T específicos del antígeno tumoral.

## 5 SUMARIO DE LA INVENCION

En el presente documento se proporciona un procedimiento histoquímico de clasificación de un tumor en base a la expresión de PD-L1, comprendiendo el procedimiento:

10 poner en contacto una muestra de tejido del tumor con un anticuerpo específico contra el PD-L1 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una manera que deposite un colorante en la muestra tumoral cerca de áreas de la muestra tumoral a las que se une el anticuerpo, en el que el anticuerpo comprende una CDR1 de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 1, una CDR2 de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 2, una CDR3 de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 3, una CDR1 de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 4, una CDR2 de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 5, una CDR3 de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 6;

20 cuantificar un porcentaje de células tumorales que tienen tinción de la membrana a cualquier intensidad por encima del fondo; y

25 puntuar la expresión del PD-L1 en el tumor, en el que el tumor se puntúa como positivo para PD-L1 si las células tumorales que tienen tinción de la membrana a cualquier intensidad por encima del fondo exceden un límite predeterminado que se correlaciona con una probabilidad de que el tumor responda a un agente terapéutico de unión al eje de PD-1, y en el que el límite es de un 25 % o más de las células tumorales que tienen tinción de la membrana a cualquier intensidad por encima del fondo y la puntuación no incluye la cuantificación de células inmunitarias teñidas con anti-PD-L1.

30 Los anticuerpos ejemplares pueden incluir cadenas pesadas que tienen una secuencia de aminoácidos de dominio variable que comprende la SEQ ID NO: 7 y/o una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de dominio variable que comprende la SEQ ID NO: 8.

35 En un modo de realización, el colorante se deposita poniendo en contacto la muestra de tejido con un segundo anticuerpo que se puede unir al anticuerpo específico contra el PD-L1 humano, en el que el segundo anticuerpo comprende un marcador detectable que media en el depósito del colorante.

En un modo de realización, el anticuerpo específico contra el PD-L1 humano es un anticuerpo monoclonal de conejo, y el segundo anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-Ig de conejo.

40 En otro modo de realización, el marcador detectable comprende una marca de afinidad, y el depósito del colorante comprende además poner en contacto la muestra con una entidad de unión específica para la marca de afinidad, comprendiendo la entidad de unión una enzima que cataliza el depósito del colorante. En un modo de realización, la marca de afinidad es un hapteno y la entidad de unión es un tercer anticuerpo que es específico contra el hapteno.

45 En un modo de realización, el colorante es el resultado de una reacción entre la enzima y un cromógeno.

50 En un modo de realización, el cromógeno se selecciona del grupo que consiste en diaminobencidina (DAB), fosfato de 4-nitrofenilo (pNPP), Fast Red, fosfato de bromocloroindolilo (BCIP), nitroazul de tetrazolio (NBT), BCIP/NBT, Fast Red, AP Orange, AP Blue, tetrametilbencidina (TMB), 2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolin-sulfonato] (ABTS), o-dianisidina, 4-cloronaftol (4-CN), nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG), o-fenilendiamina (OPD), 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-galactopiranosido (X-Gal), metilumbeliferil-β-D-galactopiranosido (MU-Gal), p-nitrofenil-α-D-galactopiranosido (PNP), 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurónido (X-Gluc), 3-amino-9-etilcarbazol (AEC), fucsina, yodonitrotetrazolio (INT), azul de tetrazolio y violeta de tetrazolio.

55 En un modo de realización, el cromógeno es DAB.

En un modo de realización, la intensidad de fondo se determina tiñendo un corte seriado de la muestra de tejido del tumor con un anticuerpo de control de Ig.

60 En un modo de realización específico, las células tumorales que tienen tinción de la membrana se identifican comparando la muestra de tejido en contacto con el anticuerpo anti-PD-L1 humano con un corte seriado del tumor teñido con hematoxilina y eosina (HE), y regiones coincidentes en la muestra de tejido en contacto con el anticuerpo anti-PD-L1 humano que contiene el colorante por encima del fondo con regiones que tienen las características morfológicas en el corte seriado teñido con HE.

65 En otro modo de realización específico, el tumor es un carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM) o un carcinoma

de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC).

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

- 5 La **FIG. 1** ilustra un esquema de detección útil en los presentes procedimientos.
- La **FIG. 2** ilustra diversos casos que demuestran el intervalo de tinción de la membrana y citoplasmática en muestras de CCECC con un aumento de 20X cuando se marca con SP263.
- 10 La **FIG. 3** ilustra una muestra ejemplar de CCECC positiva para PD-L1 marcada con SP263 con un intervalo de tinción de la membrana y el citoplasma de células tumorales. La imagen en la parte superior es una muestra marcada con SP263 y teñida con DAB. La imagen en la parte inferior es una muestra marcada con HE. La esquina inferior izquierda también muestra células inmunitarias más pequeñas con tinción de la membrana (flecha).
- 15 Las **FIGS. 4-6** ilustran el uso de células inmunitarias como un control positivo interno en el CCECC. Las imágenes superiores son muestras marcadas con HE. Las imágenes inferiores son muestras de CCECC marcadas con SP263 y teñidas con DAB.
- Las **FIGS. 7A y 7B** son tejidos placentarios marcados con el anticuerpo SP263 y teñidos con DAB.
- 20 La **FIG. 8** es una muestra de CCECC que se determina que es negativa usando SP263. La imagen superior es HE; la imagen inferior es DAB.
- La **FIG. 9** es una muestra de CCECC que se determina que es negativa usando SP263.
- 25 La **FIG. 10** es una muestra de CCECC teñida con SP263 que tiene un 70 % de células tumorales positivas para PD-L1 con un aumento de 1X. La imagen superior es una tinción con HE; la imagen inferior es una tinción con DAB.
- 30 La **FIG. 11** es una muestra de CCECC teñida con SP263 que tiene tinción de la membrana celular en un 100 % de las células tumorales, y se acompaña de tinción de las células inmunitarias del tumor a lo largo de la periferia del tumor con un aumento de 4X. La imagen superior es una tinción con HE; la imagen inferior es una tinción con DAB.
- 35 La **FIG. 12** es una muestra de CCECC teñida con SP263 que tiene tinción de células inmunitarias y ninguna tinción del tumor. El total de células inmunitarias en el área del tumor en esta imagen es de un 15 % con tinción de un 35 % de las células inmunitarias con expresión de PD-L1 con un aumento de 5X. La imagen superior es una tinción con HE; la imagen inferior es una tinción con DAB.
- 40 La **FIG. 13** es una muestra de CCECC teñida con SP263 y DAB que implica tinción débil de la membrana (flecha) del tumor visible con un aumento de 20X.
- La **FIG. 14** es una muestra de CCECC teñida con SP263 que implica tinción membranosa de las células inmunitarias (esquina inferior izquierda) con tinción de la membrana de las células tumorales. La imagen superior es una tinción con HE; la imagen inferior es una tinción con DAB.
- 45 La **FIG. 15** es un caso de CPNM que muestra antracosis (flecha negra en la imagen superior derecha) y reacción de células gigantes de cuerpo extraño (flecha en la imagen superior izquierda) no asociada con la interpretación del caso. Un área diferente del caso contiene pigmento antracótico (flecha discontinua) que se superpone con la tinción punteada de células inmunitarias (flecha negra en la flecha de la imagen inferior). Todas las imágenes tienen un aumento de 20X.
- 50 La **FIG. 16** ilustra diversos casos que demuestran el intervalo de tinción de la membrana y citoplasmática en muestras de CPNM con un aumento de 20X cuando se marcan con SP263.
- 55 La **FIG. 17** es un CPNM teñido con SP263 y DAB y que tiene células tumorales con patrón basolateral de tinción de la membrana que se ilustran con un aumento de 20X. La imagen superior es una tinción con HE; la imagen inferior es una tinción con DAB.
- 60 La **FIG. 18** es un CPNM teñido con SP263 y DAB y que tiene células tumorales con tinción basal solamente (flecha negra) y un patrón basolateral (flecha discontinua) de tinción de la membrana que se ilustran con un aumento de 20X. La imagen superior es una tinción con HE; la imagen inferior es una tinción con DAB.
- 65 La **FIG. 19** es un CPNM teñido con SP263 y DAB y que tiene una tinción similar a Golgi perinuclear dentro de las células tumorales con un aumento de 40X. La imagen izquierda es una tinción con HE; la imagen derecha es una tinción con DAB.

La **FIG. 20** es un CPNM teñido con SP263 y DAB y que tiene células tumorales con macrófagos alveolares (flecha) con un aumento de 20X. La imagen superior es una tinción con HE; la imagen inferior es una tinción con DAB.

5 La **FIG. 21** es un CPNM teñido con SP263 y DAB que muestra células tumorales con células inmunitarias de células linfocíticas y plasmáticas con un aumento de 20X. La imagen superior es una tinción con HE; la imagen inferior es una tinción con DAB. En la imagen teñida con DAB se puede ver una tinción de células inmunitarias punteada (flecha continua) y difusa (flecha discontinua) con tumor adyacente negativo para PD-L1 (tinción de un cero por ciento con un aumento de 20X).

10 La **FIG. 22** ilustra un CPNM teñido con SP263 que tiene células plasmáticas con tinción citoplasmática difusa débil. Las células tumorales circundantes demuestran una tinción heterogénea de la membrana de las células tumorales (10X izquierda, 20X derecha, HE arriba, DAB, abajo).

15 La **FIG. 23** ilustra un CPNM teñido con SP263 que tiene neutrófilos que muestran la expresión de PD-L1 (flecha discontinua). El caso también tiene una tinción moderada de la membrana de las células tumorales (flecha negra) (40X). La imagen superior es una tinción con HE; la imagen inferior es una tinción con DAB.

20 La **FIG. 24** ilustra un CPNM teñido con SP263 que tiene tinción negativa para el tumor y las células inmunitarias (cero por ciento) con un aumento de 20X. La imagen izquierda es una tinción con HE; la imagen derecha es una tinción con DAB.

25 La **FIG. 25** ilustra un CPNM teñido con SP263 que tiene la membrana de las células tumorales con un cero por ciento de tinción. El área tumoral contiene un 30 % de células inmunitarias en una vista de menor resolución con un 35 % de células inmunitarias que muestran la expresión de PD-L1 (10X izquierda, 20X derecha, HE arriba, DAB, abajo).

30 La **FIG. 26** ilustra un CPNM teñido con SP263 que tiene un tumor con un 5 % de células que demuestran tinción de la membrana (flecha). El área tumoral (que consiste en tumor viable y desmoplasia e inflamación circundantes) contiene un 10 % de células inmunitarias y un 50 % de células inmunitarias con expresión de PD-L1 (4X). La imagen superior es una tinción con HE; la imagen inferior es una tinción con DAB.

35 La **FIG. 27** ilustra un CPNM teñido con SP263 que tiene un tumor con un 10 % de células que demuestran tinción de la membrana en este campo. El área tumoral contiene un 10 % de células inmunitarias y un 10 % de células inmunitarias con expresión de PD-L1 (10X). La imagen superior es una tinción con HE; la imagen inferior es una tinción con DAB.

40 La **FIG. 28** ilustra un CPNM teñido con SP263 que tiene un tumor con un 15 % de células que muestran tinción de la membrana (región delineada). También se observa tinción de células inmunitarias asociadas a tumores (2X). La imagen superior es una tinción con HE; la imagen inferior es una tinción con DAB.

45 La **FIG. 29** ilustra un CPNM teñido con SP263 que tiene un tumor con un 20 % de células que demuestran tinción de la membrana en este campo. El área tumoral contiene un 5 % de células inmunitarias y un 10 % de células inmunitarias con expresión de PD-L1 (10X). La imagen superior es una tinción con HE; la imagen inferior es una tinción con DAB.

50 La **FIG. 30** ilustra un CPNM teñido con SP263 que tiene un tumor con un 25 % de células que demuestran tinción de la membrana en este campo. El área tumoral contiene un 5 % de células inmunitarias y un 5 % de células inmunitarias con expresión de PD-L1 (4X). La imagen superior es una tinción con HE; la imagen inferior es una tinción con DAB.

55 La **FIG. 31** ilustra un CPNM teñido con SP263 que tiene un tumor con un 35 % de células que demuestran tinción de la membrana en este campo. El área tumoral (que consiste en tumor viable y desmoplasia e inflamación circundantes) contiene un 10 % de células inmunitarias y un 5 % de células inmunitarias con expresión de PD-L1 (4X). La imagen superior es una tinción con HE; la imagen inferior es una tinción con DAB.

60 La **FIG. 32** ilustra un CPNM teñido con SP263 que tiene un tumor con un 50 % de células que demuestran tinción de la membrana en este campo. El área tumoral (que consiste en tumor viable y desmoplasia e inflamación circundantes) contiene un 10 % de células inmunitarias y un 5 % de células inmunitarias con expresión de PD-L1 (4X). La imagen superior es una tinción con HE; la imagen inferior es una tinción con DAB.

65 La **FIG. 33** ilustra un CPNM teñido con SP263 que tiene un tumor con un 70 % de células que demuestran tinción de la membrana en este campo. El área tumoral contiene un 3 % de células inmunitarias y un 15 % de células inmunitarias con expresión de PD-L1 (4X). La imagen superior es una tinción con HE; la imagen inferior es una tinción con DAB.

La **FIG. 34** ilustra un CPNM teñido con SP263 que tiene tinción de la membrana de las células tumorales a un 100 % (4X). La imagen superior es una tinción con HE; la imagen inferior es una tinción con DAB.

5 La **FIG. 35** ilustra un CPNM teñido con SP263 que tiene una tinción positiva de la membrana de las células tumorales con una tinción negativa de las células inmunitarias del tumor (20X). La imagen superior es una tinción con HE; la imagen inferior es una tinción con DAB.

10 La **FIG. 36** ilustra un CPNM teñido con SP263 que tiene una tinción de macrófagos alveolares asociada con el tumor (flecha negra) y una tinción de macrófagos alveolares no asociada con el tumor (flecha discontinua) (10X). Solo se enumeran las células inmunitarias asociadas con el tumor. La imagen superior izquierda es una tinción con HE; las imágenes superior derecha e inferior son una tinción con DAB.

15 La **FIG. 37** ilustra un CPNM teñido con SP263. Con un aumento de 4X (las dos imágenes superiores), el patrón de tinción parece ser predominantemente una tinción de la membrana de las células tumorales; sin embargo, el examen a mayor resolución (20X, imagen inferior) revela que el tumor es negativo para PD-L1 con tinción de las células inmunitarias membranosa (punta de flecha cerrada) y punteada (flecha discontinua). También se observa tinción de las células dendríticas (punta de flecha abierta). La imagen superior izquierda es una tinción con HE; las imágenes superior derecha e inferior son una tinción con DAB.

20 Las **FIGS. 38 y 39** ilustran un caso de CPNM negativo para SP263 con tinción de células inmunitarias. Con un aumento de 4X (FIG. 38), las células inmunitarias en el área tumoral se aprecian mejor en la imagen con tinción del PD-L1 y comprenden un 40 % del área tumoral con un 80 % de tinción de células inmunitarias (4X). Una resolución mayor (FIG. 39) confirma que el PD-L1 se expresa altamente en el componente de células inmunitarias del tumor (20X). Las imágenes superiores son una tinción con HE; las imágenes inferiores son una tinción con DAB.

La **FIG. 40** ilustra un caso positivo para SP263 con tinción de las células inmunitarias. En esta vista, un 15 % del área tumoral contiene células inmunitarias, expresando PD-L1 un 30 % de las células inmunitarias (4X).

30 La **FIG. 41** ilustra un CPNM teñido con SP263 que tiene una tinción citoplasmática débil (flecha negra) y débil de la membrana (punta de flecha cerrada) del tumor. También se observa tinción de macrófagos alveolares (flecha discontinua). Las imágenes superiores tienen un aumento de 10X; la imagen inferior tiene un aumento de 20X. La imagen superior izquierda es una tinción con HE; las imágenes superior derecha e inferior son una tinción con DAB.

35 La **FIG. 42** ilustra un CPNM teñido con SP263 que tiene una tinción débil de la membrana (flechas negras). Las imágenes superiores tienen un aumento de 10X; la imagen inferior tiene un aumento de 20X. La imagen superior izquierda es una tinción con HE; las imágenes superior derecha e inferior son una tinción con DAB.

40 La **FIG. 43** ilustra un tumor de CPNM con tinción citoplasmática débil y débil de la membrana (flecha negra) y solo tinción débil de la membrana (flecha discontinua) con un aumento de 20X. Las imágenes superiores son una tinción con HE; las imágenes inferiores son una tinción con DAB.

45 La **FIG. 44** ilustra un tumor de CPNM con tinción citoplasmática débil y débil de la membrana y tinción de las células inmunitarias (10X izquierda, 20X derecha, las imágenes superiores son una tinción con HE; las imágenes inferiores son una tinción con DAB).

50 La **FIG. 45** ilustra un tumor de CPNM con tinción membranosa de las células inmunitarias (flecha negra) y tinción punteada de las células inmunitarias (flecha discontinua) entremezcladas con una tinción de la membrana de las células tumorales (punta de flecha cerrada) (40X). La imagen superior izquierda es una tinción con HE; las imágenes superior derecha e inferior son una tinción con DAB.

55 La **FIG. 46** ilustra una tinción de la membrana de las células tumorales de CPNM (punta de flecha abierta) entremezclada con una tinción de las células inmunitarias difusa (flecha discontinua) y punteada (punta de flecha cerrada) (20X). Las imágenes superiores son una tinción con HE; las imágenes inferiores son una tinción con DAB.

60 La **FIG. 47** ilustra un caso de CPNM que muestra antracosis (flecha negra, imagen superior izquierda) y reacción de células gigantes de cuerpo extraño (flecha negra, imagen superior derecha) no asociada con la interpretación del caso (fila superior, 20X). Un área diferente del caso contiene un pigmento antracótico (parte inferior, flecha discontinua) que se superpone con una tinción punteada de las células inmunitarias (parte inferior, punta de flecha cerrada), así como una tinción de la membrana de las células tumorales (parte inferior, punta de flecha abierta) (20X).

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

65 Se debe entender que esta divulgación no se limita a los aspectos particulares descritos, ya que, por supuesto,

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

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

15 La práctica de la presente tecnología empleará, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de cultivo hístico, inmunología, biología molecular, microbiología, biología celular y ADN recombinante, que se encuentran dentro del estado de la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook and Russell eds. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3.<sup>a</sup> edición; la serie Ausubel *et al.* eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*; la serie *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson *et al.* (1991) *PCR 1: A Practical Approach* (IRL Press en Oxford University Press); MacPherson *et al.* (1995) *PCR 2: A Practical Approach*; Harlow and Lane eds. (1999) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Freshney (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5.<sup>a</sup> edición; Gait ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; patente de EE. UU. n.º 4.683.195; Hames and Higgins eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Anderson (1999) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins eds. (1984) *Transcription and Translation*; Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press (1986)); Perbal (1984) *A Practical Guide to Molecular Cloning*; Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*; Mayer and Walker eds. (1987) *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, Londres); y Herzenberg *et al.* eds (1996) *Weir's Handbook of Experimental Immunology*.

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

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

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

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

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

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

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

Más en particular, "anticuerpo" se refiere a un ligando polipeptídico que comprende al menos una región variable de inmunoglobulina de la cadena ligera o cadena pesada que reconoce específicamente y se une a un epítipo de un antígeno. Los anticuerpos se componen de una cadena pesada y una ligera, cada una de las cuales tiene una región variable, denominadas la región variable pesada (VH) y la región variable ligera (VL). Conjuntamente, la región VH y la región VL son responsables de la unión al antígeno reconocido por el anticuerpo.

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

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

El término "anticuerpo" pretende además englobar fragmentos de digestión, partes especificadas, derivados y variantes de los mismos, incluyendo miméticos de anticuerpos o comprendiendo partes de anticuerpos que imitan la estructura y/o función de un anticuerpo o fragmento o parte especificada del mismo, incluyendo anticuerpos monocatenarios y fragmentos de los mismos. Los ejemplos de fragmentos de unión englobados dentro del término "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH; un fragmento  $F(ab')_2$ , un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH; un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, un fragmento dAb (Ward *et al.* (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, usando procedimientos recombinantes, por un conector sintético, lo que permite que se formen como una cadena proteínica única en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv)). Bird *et al.* (1988) Science 242:423-426 y Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883. El término "fragmento de un anticuerpo" también pretende englobar los anticuerpos monocatenarios. Cualquiera de los fragmentos de

anticuerpos mencionados anteriormente se obtiene usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se criban para determinar la especificidad de unión y la actividad de neutralización de la misma manera que los anticuerpos intactos.

5 Los "fragmentos de anticuerpos" o "fragmentos de unión a antígeno" incluyen fragmentos de anticuerpos proteolíticos (tales como fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fab', fragmentos Fab'-SH y fragmentos Fab como se conocen en la técnica), fragmentos de anticuerpos recombinantes (tales como fragmentos sFv, fragmentos dsFv, fragmentos sFv biespecíficos, fragmentos dsFv biespecíficos, fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, proteínas Fv monocatenarias ("scFv"), proteínas Fv estabilizadas con disulfuro ("dsFv"), diacuerpos y triacuerpos (como se conocen en la técnica) y anticuerpos de camélido (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 6.015.695; 6.005.079; 10 5.874.541; 5.840.526; 5.800.988; y 5.759.808). Una proteína scFv es una proteína de fusión en la que una región variable de la cadena ligera de una inmunoglobulina y una región variable de la cadena pesada de una inmunoglobulina se unen por un conector, mientras que en dsFv, las cadenas se han mutado para introducir un enlace disulfuro para estabilizar la asociación de las cadenas.

15 Como se usa en el presente documento, el término "antígeno" se refiere a un compuesto, composición o sustancia a la que se pueden unir específicamente los productos de inmunidad humoral o celular específica, tales como una molécula de anticuerpo o un receptor de linfocitos T. Los antígenos pueden ser cualquier tipo de molécula, incluyendo, por ejemplo, haptenos, metabolitos intermedios simples, glúcidos (por ejemplo, oligosacáridos), lípidos y hormonas, así como macromoléculas tales como carbohidratos complejos (por ejemplo, polisacáridos), fosfolípidos y proteínas. Las categorías comunes de antígenos incluyen, pero no se limitan a, antígenos víricos, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos de protozoos y otros parásitos, antígenos tumorales, antígenos implicados en enfermedades autoinmunitarias, alergia y rechazo de injertos, toxinas y otros antígenos diversos.

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

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

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

60 El comportamiento biológico pasado, presente y futuro, o evolución clínica, de una neoplasia se clasifica además como benigno o maligno, una distinción de gran importancia en el diagnóstico, el tratamiento y el pronóstico. Una neoplasia maligna manifiesta un mayor grado de autonomía, es capaz de invasión y diseminación metastásica, puede ser resistente al tratamiento y puede causar la muerte. Una neoplasia benigna tiene un menor grado de

autonomía, normalmente no es invasiva, no metastatiza y, en general, no produce un gran daño si se trata adecuadamente.

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

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

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

20 Como se usa en este contexto, una "célula tumoral" se refiere a una célula neoplásica. Las células neoplásicas se pueden distinguir de otras células histológicamente en base a la morfología, como sería bien conocido por los expertos en la técnica. Dichos procedimientos pueden incluir inspección manual por parte de un anatomopatólogo experto o procedimientos automatizados.

25 Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo quimérico" significa un anticuerpo en el que la región constante Fc de un anticuerpo monoclonal de una especie (por ejemplo, una región constante Fc de ratón) se reemplaza, usando técnicas de ADN recombinante, con una región constante Fc de un anticuerpo de otra especie (por ejemplo, una región constante Fc humana). Véase, en general, Robinson *et al.*, documento PCT/US86/02269; Akira *et al.*, solicitud de patente europea 184.187; Taniguchi, solicitud de patente europea 171.496; Morrison *et al.*, solicitud de patente europea 173.494; Neuberger *et al.*, documento WO 86/01533; Cabilly  
30 *et al.*, patente de EE. UU. n.º 4.816.567; Cabilly *et al.*, solicitud de patente europea 125.023; Better *et al.*, Science 240:1041-1043, 1988; Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443, 1987; Liu *et al.*, J. Immunol. 139: 3521-3526, 1987; Sun *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214-218, 1987; Nishimura *et al.*, Cancer Res 47: 999-1005, 1987; Wood *et al.*, Nature 314: 446-449, 1885; y Shaw *et al.*, J. Natl. Cáncer Inst. 80: 1553-1559, 1988. En determinados aspectos, la región o sitio de unión a la diana será de una fuente no humana (por ejemplo, ratón o  
35 primate) y la región constante es humana.

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

50 Como se usa en el presente documento, el término "marcador detectable" se refiere a una molécula o material que puede producir una señal detectable (tal como visualmente, electrónicamente o de otro modo) que indica la presencia y/o concentración del marcador en una muestra. Cuando se conjuga con una molécula de unión específica, se puede usar el marcador detectable para localizar y/o cuantificar la diana a la que se dirige la molécula de unión específica. De este modo, se puede detectar la presencia y/o concentración de la diana en una muestra detectando la señal producida por el marcador detectable. Un marcador detectable se puede detectar directa o indirectamente, y se pueden usar varios marcadores detectables diferentes conjugados con moléculas de unión  
55 específica diferentes en combinación para detectar una o más dianas. Por ejemplo, un primer marcador detectable conjugado con un anticuerpo específico contra una diana, se puede detectar indirectamente a través del uso de un segundo marcador detectable que se conjuga con una molécula que se une específicamente al primer marcador detectable. Se pueden conjugar múltiples marcadores detectables que se pueden detectar por separado con diferentes moléculas de unión específica que se unen específicamente a diferentes dianas para proporcionar un ensayo múltiple que puede proporcionar detección simultánea de las múltiples dianas en una muestra. Una señal detectable se puede generar por cualquier mecanismo, incluyendo la absorción, emisión y/o dispersión de un fotón (incluyendo fotones de radiofrecuencia, frecuencia de microondas, frecuencia infrarroja, frecuencia visible y frecuencia ultravioleta). Los marcadores detectables incluyen materiales y moléculas con color, fluorescentes, fosforescentes y luminiscentes, catalizadores (tales como enzimas) que convierten una sustancia en otra sustancia para proporcionar una diferencia detectable (tal como convirtiendo una sustancia incolora en una sustancia coloreada o viceversa, o produciendo un precipitado o incrementando la turbidez de la muestra), haptenos que se  
60  
65

pueden detectar a través de interacciones de unión anticuerpo-hapteno usando conjugados de anticuerpos marcados de forma detectable adicionales, y moléculas o materiales paramagnéticos y magnéticos. Los ejemplos particulares de marcadores detectables incluyen enzimas tales como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, glucosa oxidasa,  $\beta$ -galactosidasa o  $\beta$ -glucuronidasa; fluoróforos tales como fluoresceínas, luminóforos, cumarinas, tintes BODIPY, resorufinas y rodaminas (muchos ejemplos adicionales de moléculas fluorescentes se pueden encontrar en *The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, *Molecular Probes*, Eugene, Oreg); nanopartículas tales como puntos cuánticos (obtenidos, por ejemplo, de QuantumDot Corp, Invitrogen Nanocrystal Technologies, Hayward, Calif.; véanse también las patentes de EE. UU. n.ºs 6.815.064, 6.682.596 y 6.649.138); quelatos metálicos, tales como los quelatos DOTA y DPTA de iones metálicos radiactivos o paramagnéticos como  $Gd^{3+}$ ; y liposomas, por ejemplo, liposomas que contienen moléculas fluorescentes atrapadas. Cuando el marcador detectable incluye una enzima, se puede usar un sustrato detectable tal como un cromógeno, un compuesto fluorógeno o un compuesto luminógeno en combinación con la enzima para generar una señal detectable (una amplia variedad de dichos compuestos está disponibles comercialmente, por ejemplo, de Invitrogen Corporation, Eugene Oreg.). Los ejemplos particulares de compuestos cromógenos incluyen diaminobencidina (DAB), fosfato de 4-nitrofenilo (pNPP), Fast Red, fosfato de bromocloroindolilo (BCIP), nitroazul de tetrazolio (NBT), BCIP/NBT, Fast Red, AP Orange, AP Blue, tetrametilbencidina (TMB), 2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolin-sulfonato] (ABTS), o-dianisidina, 4-cloronaftol (4-CN), nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG), o-fenilendiamina (OPD), 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -galactopiranosido (X-Gal), metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactopiranosido (MU-Gal), p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosido (PNP), 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónido (X-Gluc), 3-amino-9-etilcarbazol (AEC), fucsina, yodonitrotetrazolio (INT), azul de tetrazolio y violeta de tetrazolio. De forma alternativa, se puede usar una enzima en un esquema de detección metalográfica. Los procedimientos de detección metalográfica incluyen el uso de una enzima, tal como fosfatasa alcalina, en combinación con un ion metálico soluble en agua y un sustrato inactivo de oxidorreducción de la enzima. El sustrato se convierte en un agente activo de oxidorreducción por la enzima, y el agente activo de oxidorreducción reduce el ion metálico, provocando que forme un precipitado detectable. (Véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE. UU. pendiente de trámite n.º 11/015.646, presentada el 20 de diciembre de 2004, la publicación PCT n.º 2005/003777 y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2004/0265922). Los procedimientos de detección metalográfica también incluyen el uso de una enzima oxidoreductasa (tal como la peroxidasa de rábano picante) junto con un ion metálico soluble en agua, un agente oxidante y un agente reductor, de nuevo para formar un precipitado detectable. (Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.670.113). Los haptenos son moléculas pequeñas a las que se unen específicamente anticuerpos, aunque por sí mismas no provocarán una respuesta inmunitaria en un animal y, en primer lugar, se deben unir a una molécula transportadora más grande tal como una proteína para generar una respuesta inmunitaria. Los ejemplos de haptenos incluyen dinitrofenilo, biotina, digoxigenina y fluoresceína. Se divulgan ejemplos adicionales de haptenos oxazol, pirazol, tiazol, nitroarilo, benzofurano, triperpeno, urea, tiourea, rotenoide, cumarina y ciclolignano en la solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 60/856.133, presentada el 1 de noviembre de 2006.

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

El término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones constantes y variables derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la divulgación pueden incluir residuos aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un conejo, se hayan injertado en secuencias estructurales humanas. Por tanto, como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo en el que sustancialmente cada parte de la proteína (por ejemplo, CDR, dominios estructural, CL, CH (por ejemplo, CH1, CH2, CH3), bisagra, VL, VH) es sustancialmente no inmunógeno en humanos, con solo cambios o variaciones menores de secuencia. De forma similar, los anticuerpos designados de primate (mono, babuino, chimpancé, etc.), roedor (ratón, rata, conejo, conejillo de Indias, hámster y similares) y otros mamíferos designan anticuerpos específicos de dicha especie, subgénero, género, subfamilia, familia. Además, los anticuerpos quiméricos incluyen cualquier combinación de los anteriores. Dichos cambios o variaciones opcional y preferentemente retienen o reducen la inmunogenicidad en seres humanos u otras especies con respecto a los anticuerpos no modificados. Por tanto, un anticuerpo humano es distinto de un anticuerpo quimérico o humanizado. Se señala que un anticuerpo humano se puede producir por un animal no humano o una célula procariota o eucariota que puede expresar genes de inmunoglobulina humana funcionalmente reorganizados (por ejemplo, cadena pesada y/o cadena ligera). Además, cuando un anticuerpo humano es un anticuerpo monocatenario, puede comprender un péptido conector que no se encuentra en los anticuerpos humanos naturales. Por ejemplo,

un Fv puede comprender un péptido conector, tal como de dos a aproximadamente ocho residuos de glicina o de otros aminoácidos, que conecta la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera. Dichos péptidos conectores se consideran de origen humano.

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

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

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

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

40 Como se usa en el presente documento, "PD-1", "PDCD1" (proteína de muerte celular programada 1) o "CD279" es un receptor inhibitor de la superficie celular implicado en la regulación de la función de los linfocitos T durante la inmunidad y la tolerancia. El PD-1 humano codifica una proteína de membrana de la superficie celular de tipo I de un solo pase de 288 aminoácidos (aa) de la superfamilia de inmunoglobulinas con un supuesto péptido señal de 20 aa, un dominio extracelular de 150 aa, una región transmembranaria de 21 aa y un dominio citoplasmático de 97 aa (ID del gen Entrez: 5133; UniProtKB: Q15116).

50 Como se usa en el presente documento, "CD80" (antígeno de activación de linfocitos T CD80), "antígeno de activación B7-1", "BB1", "B7" o (contrarreceptor de CTLA-4 B7.1) está implicado en señales coestimuladoras esenciales para la activación de linfocitos T. El CD80 humano codifica una proteína receptora de la membrana celular de un solo pase de 288 aminoácidos (aa) con un supuesto péptido señal de 34 aa, un dominio extracelular de 208 aa, una región transmembranaria de 21 aa y un dominio citoplasmático de 25 aa (ID del gen Entrez: 941; UniProtKB: P33681).

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

60 Como se usa en el presente documento, "SP263" se refiere a un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al dominio citoplasmático de PD-L1 y tiene secuencias de CDR como se describe en la tabla 1:

	CDR1	CDR2	CDR3
Cadena pesada	NHAIS (SEQ ID NO: 1)	TINSDTHTYYATWPKG (SEQ ID NO: 2)	RIFSSNI (SEQ ID NO: 3)

Cadena ligera	QASQSIYNNWLS (SEQ ID NO: 4)	LASTLAS (SEQ ID NO: 5)	IGGESSNNDGIA (SEQ ID NO: 6)
---------------	--------------------------------	---------------------------	--------------------------------

**Tabla 1**

Las secuencias completas de dominio variable de la cadena pesada y ligera son como sigue:

5

**Secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de HC de SP263:**

QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFSLSNHAIWVRQ  
APGKGLEWIGTINSDHTHTYYATWPKGRFTISKTSSTTV  
DLKMTSPTTEDTATYFCARRIFSSSNIWGPGLVTVSS

10

(SEQ ID NO: 7)

**Secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de LC de SP263 (kappa):**

AIVMTQTSSPVSAVVGGTVAINCQASQSIYNNWLSW  
FQQKPGQPPKLLIYLASTLASGVPSRFKGSQSGTQFTL  
TISDVVCDDAATYYCIGGESSNNDGIAFGGGTEVVVK

15

(SEQ ID NO: 8)

Los procedimientos actuales se refieren a procedimientos para someter a ensayo, evaluar y puntuar histoquímica o inmunohistoquímicamente la expresión de PD-L1 en muestras tumorales. Para este fin, las muestras tumorales se marcan con una entidad que puede teñir específicamente la proteína PD-L1 de una manera que es detectable histológicamente. Una forma de lograr esto es marcando las muestras tumorales con anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a PD-L1 (anti-PD-L1). Se divulgan ejemplos de anti-PD-L1 en, por ejemplo, el documento US 62/069.420.

20

Los anticuerpos anti-PD-L1 y los fragmentos de anticuerpos que son útiles en estos procedimientos: (1) se pueden unir específicamente a PD-L1; (2) pueden generar una fuerte tinción de la membrana en tejido positivo para PDL1; y (3) tienen una tinción de fondo baja o nula (tal como tinción nuclear). Un ejemplo de dicho anticuerpo es SP263, que se divulga en el documento US 62/069.420. SP263 se desarrolló usando una secuencia peptídica que consiste en los residuos aminoácidos 272-290 del PD-L1 humano (CGIQDTNSKKQSDTHLEET (SEQ ID NO: 9)) conjugado covalentemente con una proteína transportadora de hemocianina de lapa californiana (KLH) para inmunizar conejos blancos de Nueva Zelanda. Las secuencias de las CDR de SP263 se divulgan en la tabla 1. Otros ejemplos de anti-PD-L1, tanto existentes actualmente como aún no desarrollados, serán evidentes de inmediato para el experto en la técnica.

25

30

Las muestras tumorales se pueden marcar con el anti-PD-L1 por procedimientos automatizados o manuales. Los dispositivos para el marcado automatizado de muestras de tejido para inmunohistoquímica son bien conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, la serie BENCHMARK de instrumentos de tinción avanzada de IHQ/ISH de Ventana Medical Systems, los instrumentos de tinción avanzados OMNI y AUTOSTAINERLINK de Dako y los sistemas de tinción avanzada BOND de Leica Biosystems.

35

40

La unión del anti-PD-L1 a la muestra tumoral se detecta poniendo en contacto la muestra de tejido con una entidad marcada de forma detectable que se puede unir específicamente al anti-PD-L1. Se conocen en la técnica numerosos esquemas de detección, que incluyen, por ejemplo, esquemas de marcado primario-secundario, en los que el anti-PD-L1 se pone en contacto con un anticuerpo secundario que se puede unir específicamente al anti-PD-L1 (por ejemplo, usando un anticuerpo monoclonal de conejo de IgG como primario y un anticuerpo anti-IgG de conejo marcado de forma detectable como secundario); y esquemas de marcado de pares de unión, en los que el anticuerpo primario contiene un resto unido al mismo que forma un par de unión específico con un segundo resto de unión marcado de forma detectable (por ejemplo, detección de anticuerpos primarios biotinilados usando entidades de unión a biotina marcadas de forma detectable, tal como avidina o estreptavidina).

45

50

En un ejemplo específico, la unión del anti-PDP-L1 humano a la muestra tumoral se logra usando un anticuerpo secundario conjugado con haptenos no endógenos. Un anticuerpo anti-hapteno conjugado con uno o más marcadores detectables (tal como una enzima que puede catalizar una reacción que deposita un cromógeno). Un ejemplo de este tipo de esquema es el kit de detección VENTANA OptiView DAB IHC. Un esquema de este kit de detección se presenta en la FIG. 1. Una muestra de tejido incluido en parafina y fijado con formol (100) se pone

55

en contacto con el anticuerpo anti-PD-L1 humano (**101**) en condiciones que permitan la unión específica del anticuerpo. A continuación, el anticuerpo se pone en contacto con un anticuerpo secundario (**102**) específico para el anticuerpo anti-PD-L1 que se modifica con varios haptenos no endógenos (**103**). A continuación, la muestra se pone en contacto con un anticuerpo anti-hapteno (**104**) que se conjuga con una enzima que puede catalizar una reacción que deposita un cromógeno (**105**).

Las muestras de tumor marcadas se visualizan a continuación microscópicamente y se someten a ensayo para determinar la tinción del PD-L1. La muestra de tumor se puntúa a continuación en base al porcentaje de células tumorales totales que contienen cualquier cantidad de tinción detectable de la membrana de anti-PD-L1 por encima del fondo. Preferentemente, la puntuación no incluye el análisis de la expresión de PD-L1 en las células no tumorales. Un tumor que tiene un porcentaje de células tumorales que contienen tinción detectable de la membrana de anti-PD-L1 que está por encima de un límite predefinido se clasifica como "positivo para PD-L1". El límite preferentemente se determina empíricamente evaluando las respuestas del paciente a un agente terapéutico dirigido al eje de PD-1. El agente terapéutico dirigido al eje de PD-1 incluye agentes que alteran la unión de los ligandos de PD-1 (tal como PD-L1 y PD-L2) a PD-1. Por ejemplo, un agente terapéutico dirigido al eje de PD-1 incluye: anticuerpos monoclonales anti-PD-1 (tal como OPDIVO (nivolumab), KEYTRUDA (pembrolizumab), pidilizumab (CT-011, Cure Tech), BMS 936559 (Bristol Myers Squibb) y MPDL3280A (Roche)); y anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 (tales como MEDI4736, MPDL3280 y avelumab). En un modo de realización, el límite se establece en un 25 %, en el que los tumores que tienen un 25 % o más de células tumorales que contienen cualquier cantidad de tinción detectable de la membrana de anti-PD-L1 se consideran tumores positivos para PD-L1.

Los pacientes que tienen tumores positivos para PD-L1 como se determina de esta manera pueden ser candidatos para el tratamiento con un agente terapéutico que altera la unión de PD-L1 a PD-1 y/o CD80. Los agentes terapéuticos ejemplares incluyen anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen al dominio extracelular de PD-L1, evitando de este modo que el PD-L1 se una a PD-1 y/o CD80. Muchos de dichos anticuerpos se están sometiendo clínicamente a prueba en la actualidad. Uno de dichos ejemplos se denomina MEDI4736, que actualmente es objeto de numerosos ensayos clínicos.

## **EJEMPLOS**

### **I. Procedimiento de tinción**

Se necesita un diagnóstico de alta calidad con fines terapéuticos para pronosticar qué pacientes tienen más probabilidades de responder a un tratamiento basado en anticuerpos contra PD-1/PD-L1 para garantizar el éxito del tratamiento. Aquí describimos una prueba de diagnóstico inmunohistoquímico (IHQ) para la detección de PD-L1 desarrollada por Ventana Medical Systems.

#### **IA. Principio del procedimiento**

VENTANA PD-L1 (SP263) es un anticuerpo primario monoclonal de conejo que se une a PD-L1 en cortes histológicos incluidos en parafina. El anticuerpo específico se puede localizar usando un anticuerpo secundario haptenado seguido de un conjugado multimérico anti-hapteno-HRP (kit de detección OptiView DAB IHC, n.º de cat. 760-700). El complejo anticuerpo específico-enzima se visualiza a continuación con un producto de reacción enzimática precipitante. Cada etapa se incuba durante un tiempo y a una temperatura precisos. Al final de cada etapa de incubación, el instrumento automatizado de tinción de portaobjetos VENTANA BENCHMARK lava los cortes para detener la reacción y eliminar el material no unido que dificultaría la reacción deseada en las etapas posteriores. También aplica LCS (n.º de cat. 650-210/n.º de cat. 650-010), que minimiza la evaporación de los reactivos acuosos del portaobjetos con la muestra. Además de la tinción con VENTANA PD-L1 (SP263), se tiñe un segundo portaobjetos con una Ig de control negativo monoclonal de conejo (n.º de cat. 790-4795) para evaluar la tinción de fondo.

#### **IB. Preparación de la muestra**

Los tejidos procesados de forma rutinaria, fijados con formol e incluidos en parafina son adecuados para su uso con este anticuerpo primario cuando se usan con el kit de detección VENTANA OptiView DAB IHC y los instrumentos automatizados de tinción de portaobjetos VENTANA BenchMark ULTRA, BenchMark XT y BenchMark GX. El fijador de tejido recomendado es formol tamponado neutro (FTN) al 10 % durante un período de al menos 6 horas hasta 48 horas. Los fijadores aceptables para su uso con VENTANA PDL1 (SP263) son los fijadores de formol-cinc y Z-5 cuando se usan con al menos 6 horas de tiempo de fijación. Otros fijadores, incluyendo alcohol al 95 %, AFA y PREFER, son inaceptables para su uso con el VENTANA PD-L1 (SP263). La cantidad usada es de 15 a 20 veces el volumen de tejido. Un corte de tejido de 3 mm o más pequeño se debe fijar no menos de 4 horas y no más de 8 horas. La fijación se puede realizar a temperatura ambiente (15-25 °C).

Los portaobjetos se deben teñir de inmediato, ya que la antigenicidad de los cortes histológicos puede disminuir con el tiempo. Sin embargo, la prueba de isquemia fría del anticuerpo SP263 usando un modelo de tejido de

xenoinjerto no estableció ninguna condición desde la hora cero hasta la hora 24 que no fuera favorable con el ensayo.

**IC. Procedimiento de tinción**

Se desarrolló un ensayo ejemplar usando el anticuerpo monoclonal de conejo VENTANA PD-L1 (SP263) para su uso en los instrumentos automatizados de tinción de portaobjetos VENTANA BENCHMARK XT, BENCHMARK GX y BENCHMARK ULTRA en combinación con kits y accesorios de detección VENTANA. La tabla 2 ilustra un protocolo de tinción ejemplar para su uso en instrumentos de tinción BENCHMARK:

Tipo de procedimiento	Procedimiento
Desparafinización	Acondicionamiento
celular seleccionado (con desenmascaramiento del antígeno)	ACONDICIONAMIENTO CELULAR 1 64 minutos, estándar
Inhibidor de la peroxidasa preprimario	Anticuerpo
(primario) seleccionado	Instrumento BENCHMARK GX o XT: 16 minutos, 37 °C Instrumento BENCHMARK ULTRA: 16 minutos, 37 °C
Conector OPTIVIEW HQ	8 min (predeterminado)
Múltimero OPTIVIEW HRP	8 min (predeterminado)
Contratinción	Hematoxilina II, 4 a 8 minutos
Contratinción posterior	Azulado, 4 minutos

**Tabla 2**

Debido a la variación en la fijación y el procesamiento del tejido, así como en el instrumento de laboratorio general y las condiciones ambientales, puede ser necesario incrementar o disminuir la incubación del anticuerpo primario, el acondicionamiento celular o el pretratamiento con proteasa en base a muestras individuales, detección usada y preferencia del lector.

**II. Puntuación del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello**

En las células neoplásicas del CCECC marcadas con el anticuerpo SP263 se evalúa el porcentaje de positividad de las células tumorales con tinción de la membrana a cualquier intensidad de la señal de diaminobencidina (DAB). La tinción inmunohistoquímica en el CCECC es membranosa y/o citoplasmática, y se puede expresar de manera homogénea o heterogénea en toda la neoplasia. La tinción de la membrana puede tener un patrón discontinuo o circunferencial. La tinción citoplasmática es, en general, difusa con algunos casos que muestran una propiedad finamente granular. La figura 2 ilustra diversos casos que demuestran el intervalo de tinción de la membrana y citoplasmática en células tumorales con un aumento de 20X cuando se marcan como se establece anteriormente.

El porcentaje total de intensidades de señal de la membrana se estima visualmente y se usa para generar el porcentaje de puntuación positiva del tumor. Se usa un anticuerpo de control negativo de isotipo compatible para evaluar la presencia de fondo en las muestras de prueba y establecer un valor de referencia de la intensidad de tinción. La figura 3 ilustra un caso positivo ejemplar con un intervalo de tinción de la membrana y citoplasmática de las células tumorales. La esquina inferior izquierda también muestra células inmunitarias más pequeñas con tinción de la membrana (flecha).

**I IA. Controles positivos internos**

Las células inmunitarias pueden servir como controles internos positivos, y presentan un intervalo de intensidad de tinción: señal citoplasmática negativa, difusa débil y/o membranosa de débil a fuerte. Se puede observar un patrón punteado de tinción en asociación con linfocitos. Se ha observado expresión de PD-L1 en linfocitos, macrófagos, células plasmáticas y neutrófilos. En las FIGS. 4-6 se proporcionan como referencia imágenes representativas de células inmunitarias teñidas con el anticuerpo SP263.

**I IB. Requisitos del tejido**

Este ensayo ejemplar usó al menos un corte histológico seriado para cada una de: (1) tinción con hematoxilina y eosina (HE); (2) tinción con anticuerpos de control negativo; y (3) tinción con el anticuerpo SP263. Además, se puede usar tejido de placenta a término humano normal como control para el ensayo de detección de PD-L1 (SP263). Este tejido muestra una tinción uniforme de moderada a fuerte de la membrana y el citoplasma de células

de linaje trofoblástico. Se pueden usar tejido estromal placentario y la vasculatura para evaluar cualquier tinción de fondo. Si la evaluación de HE indica que la muestra del paciente es inadecuada, entonces se debe obtener una nueva muestra. La repetición de la tinción de una muestra se debe llevar a cabo en portaobjetos sin teñir si (1) el portaobjetos de control de realización del ensayo del tejido no presenta una tinción aceptable; (2) el portaobjetos de control negativo no muestra una tinción aceptable; o (3) el portaobjetos teñido con anticuerpo SP263 (el portaobjetos con PD-L1 para IHQ) no es evaluable. Si el último de estos portaobjetos no se puede interpretar debido a artefactos, efectos de borde, necrosis, falta de tejido o cualquier otro motivo, entonces el portaobjetos no se puede usar para evaluación clínica. Si los controles son aceptables y el portaobjetos teñido con anticuerpo SP263 es evaluable, un anatomopatólogo capacitado puede evaluar el portaobjetos como se describe en los criterios de puntuación.

**IIC. Control de tejido positivo**

Se debe realizar el ensayo de un tejido de control positivo conocido fijado y procesado de la misma manera que las muestras de los pacientes para cada conjunto de condiciones de prueba y con cada procedimiento de tinción con anticuerpo SP263 realizado. El tejido de control (un caso de referencia) debe ser de una autopsia recién realizada, una biopsia, una muestra quirúrgica preparada y fijada lo antes posible de manera idéntica a las muestras de los pacientes. Este tejido se puede usar para controlar todas las etapas del procesamiento y tinción de muestras. Un corte histológico fijado o procesado de manera diferente a la muestra de prueba se puede usar como control para reactivos y tinción, pero no para fijación o preparación de tejido. Un caso de CCECC positivo con tinción moderada es más adecuado para el control de calidad que uno con tinción fuerte; se puede usar para detectar niveles menores de degradación de reactivos o problemas fuera de especificación que podrían estar relacionados con el instrumento. La tinción positiva de la membrana de las células neoplásicas en el tejido de control confirma que se aplicó el anticuerpo y que el instrumento funcionó apropiadamente. El control de tejido positivo se debe usar solo para controlar el rendimiento; no se debe usar para ayudar al diagnóstico clínico de muestras de pacientes. Adicionalmente, el ensayo ilustrado en el presente documento se puede utilizar como control positivo de tejido placentario a término humano, que muestra una tinción uniforme de moderada a fuerte de la membrana y el citoplasma de las células de linaje trofoblástico. Se pueden usar tejido estromal placentario y la vasculatura para evaluar cualquier tinción de fondo. En las FIGS. 7A y 7B se encuentran imágenes ejemplares de tejido placentario teñido con el anticuerpo SP263.

**IID. Criterios de puntuación**

Un anatomopatólogo capacitado asigna un estado clínico basado en PD-L1 por IHQ en base a su evaluación del porcentaje de tinción IHQ específica de PD-L1. Se selecciona un límite para la positividad y la negatividad en base a datos clínicos de pacientes con respuesta favorable conocida al agente terapéutico del eje de PD-1 que se está usando. En este modo de realización ejemplar, se seleccionó un límite de un 25 %. Se asigna un estado clínico negativo a los casos con un porcentaje total de células tumorales con tinción de la membrana a cualquier intensidad de menos de un 25 %. Se asigna un estado clínico positivo a casos con un porcentaje total de células tumorales con tinción de la membrana a cualquier intensidad mayor o igual a un 25%. La interpretación clínica de los casos de CCECC teñidos con el anticuerpo SP263 se basó en los criterios indicados en la tabla 3.

Algoritmo de puntuación de PD-L1	
Interpretación	Descripción de la tinción
Positivo para PD-L1	≥25 % de las células tumorales con positividad de la membrana para PD-L1 a cualquier intensidad por encima de la tinción de fondo como se indica en el control negativo de isotipo correspondiente.
Negativo para PD-L1	<25 % de las células tumorales con positividad de la membrana para PD-L1 a cualquier intensidad por encima de la tinción de fondo como se indica en el control negativo de isotipo correspondiente.

**Tabla 3**

En las secciones siguientes se proporcionan imágenes de diversos patrones de tinción negativa y positiva.

**IID(1). Casos negativos**

La intensidad de tinción negativa se caracteriza por la ausencia de cualquier señal detectable o por la tinción membranosa de cualquier intensidad en menos de un 25 % de las células neoplásicas.

El caso negativo 1 se ilustra en la FIG. 8. Un cero por ciento de las células inmunitarias y tumorales tiene una tinción visible de la membrana con un aumento de 10X, por lo que este caso se clasifica como negativo.

El caso negativo 2 se ilustra en la FIG. 9. Se observan tinción de la membrana de las células tumorales de débil a

moderada (puntuación bruta de un 15 %) y tinción de las células inmunitarias con un aumento de 10X, por lo que el caso se clasificó como negativo.

#### **IID(2). Casos positivos**

La intensidad de tinción positiva se caracterizó por la presencia de tinción membranosa de cualquier intensidad en un porcentaje mayor o igual a un 25 % de las células neoplásicas.

El caso positivo 1 se ilustra en la FIG. 10. Se observa tinción de la membrana de las células tumorales en un 70 % de las células tumorales con un aumento de 1X.

El caso positivo 2 se ilustra en la FIG. 11. Se observa tinción de la membrana de las células tumorales en un 100 % de las células tumorales, y se acompaña de tinción de las células inmunitarias tumorales a lo largo de la periferia del tumor con un aumento de 4X.

#### **IID(3). Evaluación de la tinción de células inmunitarias**

Se capturó la tinción de células inmunitarias con fines exploratorios. Una variedad de células inmunitarias muestra tinción e incluyen linfocitos, macrófagos, células reticulares dendríticas, células plasmáticas y neutrófilos. El portaobjetos teñido con HE se examinó inicialmente para determinar el porcentaje total del área tumoral (células tumorales y cualquier estroma desmoplásico) afectada por las células inmunitarias. Las áreas que no se consideran parte del área tumoral incluyen tumor no viable, tal como áreas con artefactos de cauterización o aplastamiento, grupos acelulares de mucina y necrosis extensa. El tejido linfoide normal no afectado por la neoplasia, como se observa en los ganglios linfáticos con tumor metastásico, y cualquier reacción de células gigantes de cuerpo extraño no se evalúa como parte del área tumoral o las células inmunitarias que afectan el tumor. A continuación, en el portaobjetos con PD-L1 para IHQ se puntúa el porcentaje de tinción de las células inmunitarias asociadas a tumores para PD-L1. En los casos en que las células inmunitarias que se tiñen positivamente se mezclan con células tumorales que se tiñen positivamente, puede ser difícil cuantificar la cantidad de tinción para cada componente. Se dan ejemplos de interpretación de células inmunitarias en la FIG. 12, que tiene tinción de células inmunitarias y ninguna tinción tumoral. El total de células inmunitarias en el área del tumor en esta imagen es de un 15 % con tinción de un 35 % de las células inmunitarias con expresión de PD-L1 con un aumento de 5X.

#### **IID(4). Casos problemáticos**

Los casos reciben un estado clínico de acuerdo con el porcentaje de células tumorales con tinción de la membrana. Diversos patrones de tinción y características morfológicas pueden dificultar la interpretación y cuantificación de la tinción de la membrana del tumor. Algunos casos pueden ser problemáticos en particular, debido a los siguientes problemas:

##### **■ Tinción citoplasmática débil**

Algunas muestras pueden presentar una tinción citoplasmática débil de las células tumorales que se puede confundir a baja resolución con una tinción débil de la membrana de las células tumorales. Por esta razón, al evaluar los portaobjetos teñidos, la tinción débil se debe confirmar con un examen a resoluciones mayores para distinguir entre la tinción membranosa y citoplasmática de las células tumorales.

##### **■ Tinción fuerte de células inmunitarias superpuesta con tinción de células tumorales**

Algunos tumores pueden contener un componente inflamatorio extenso que rodea al tumor y se infiltra dentro del tumor. En los casos en que se observa una tinción fuerte para las células tanto tumorales como inmunitarias, puede ser problemático diferenciar y cuantificar la tinción del ensayo entre las dos poblaciones de células. La presencia de células inmunitarias que se infiltran en el tumor se debe confirmar usando el portaobjetos con HE. El patrón de tinción de PD-L1 se utiliza para ayudar a atribuir la expresión a las células inmunitarias (tinción punteada) y las células tumorales (tinción lineal de la membrana).

##### **■ Obstaculización por material endógeno**

A veces, en muestras de CCECC, el material endógeno, tal como el pigmento antracótico, el pigmento de melanina o la hemosiderina, puede obstaculizar e interferir con la interpretación de la tinción del ensayo de las células inmunitarias y tumorales. La comparación del portaobjetos de control negativo de isotipo con el portaobjetos teñido con PD-L1 puede ayudar a diferenciar entre la tinción de biomarcadores y el material endógeno.

Algunos casos problemáticos se muestran en las FIGS. 13-15.

El caso problemático 1 (FIG. 13) implica una tinción débil de la membrana (flecha) del tumor visible con un aumento

de 20X, que puede ser fácil de pasar por alto.

El caso problemático 2 (FIG. 14) implica una tinción membranosa de células inmunitarias (esquina inferior izquierda) con tinción de la membrana de células tumorales. Téngase en cuenta la dificultad para distinguir la tinción de células inmunitarias entremezcladas de la tinción de las células tumorales circundantes con un aumento de 10X.

El caso problemático 3 (FIG. 15) implica un caso de CPNM que muestra antracosis (flecha negra en la imagen superior derecha) y reacción de células gigantes de cuerpo extraño (flecha roja) no asociada con la interpretación del caso. Un área diferente del caso contiene pigmento antracótico (flecha discontinua) que se superpone con la tinción punteada de células inmunitarias (flecha negra en la flecha de la imagen inferior). Todas las imágenes tienen un aumento de 20X.

### III. Carcinoma de pulmón no microcítico

En las células neoplásicas del CPNM marcadas con el anticuerpo SP263 se evalúa el porcentaje de positividad de las células tumorales con tinción de la membrana a cualquier intensidad de la señal de diaminobencidina (DAB). La tinción inmunohistoquímica en el CPNM es membranosa y/o citoplasmática, y se puede expresar de manera homogénea o heterogénea en toda la neoplasia. La tinción de la membrana puede tener un patrón discontinuo, circunferencial o basolateral. La tinción citoplasmática es, en general, difusa con algunos casos que muestran una propiedad finamente granular. Casos infrecuentes han mostrado una tinción perinuclear similar a Golgi con intensidad variable. En las FIGS. 16-19 se ilustran diversos casos que demuestran el intervalo de tinción de la membrana y citoplasmática en las células tumorales. Las células tumorales con patrón basolateral de tinción de la membrana se ilustran con un aumento de 20X en la FIG. 17. Las células tumorales con tinción basal solo (flecha negra) y patrón basolateral (flecha discontinua) de tinción de la membrana se ilustran con un aumento de 20X en la FIG. 18. La figura 19 ilustra un caso inusual con tinción perinuclear similar a Golgi dentro de las células tumorales con un aumento de 40X.

El porcentaje total de intensidades de señal de la membrana se estima visualmente y se usa para generar el porcentaje de puntuación positiva del tumor. Se usa un anticuerpo de control negativo de isotipo compatible para evaluar la presencia de fondo en las muestras de prueba y establecer un valor de referencia de la intensidad de tinción.

#### IIIA. Controles positivos internos

Las células inmunitarias pueden servir como controles internos positivos, y presentan un intervalo de intensidad de tinción: señal citoplasmática negativa, difusa débil y/o membranosa de débil a fuerte. Se puede observar un patrón punteado de tinción en asociación con linfocitos. Se ha observado expresión de PD-L1 en linfocitos, macrófagos, células plasmáticas y neutrófilos. En las FIGS. 20-24 se proporcionan imágenes representativas de células inmunitarias teñidas con el anticuerpo SP263.

La FIG. 20 ilustra células tumorales con macrófagos alveolares (flecha) con un aumento de 20X. La tinción positiva de macrófagos alveolares se puede observar en la imagen teñida con DAB (flecha en la imagen inferior) con tumor adyacente negativo para PD-L1 (tinción de un cero por ciento con un aumento de 20X).

Las imágenes de HE en la FIG. 21 muestran células tumorales con células inmunitarias de células linfocíticas y plasmáticas con un aumento de 20X. En la imagen teñida con DAB se puede ver una tinción de células inmunitarias punteada (flecha continua) y difusa (flecha discontinua) con tumor adyacente negativo para PD-L1 (tinción de un cero por ciento con un aumento de 20X).

La FIG. 22 ilustra células plasmáticas con tinción citoplasmática difusa débil. Las células tumorales circundantes demuestran una tinción heterogénea de la membrana de las células tumorales (10X izquierda, 20X derecha, HE arriba, DAB, abajo).

Como se observa en la FIG. 23, los neutrófilos de la HE muestran expresión de PD-L1 (flecha discontinua). El caso también tiene una tinción moderada de la membrana de las células tumorales (flecha negra) (40X).

#### IIIB. Requisitos del tejido

El ensayo descrito anteriormente requiere un corte histológico seriado para la tinción con hematoxilina y eosina (HE), un segundo corte histológico seriado para la tinción con anticuerpos de control negativo y un tercer corte histológico seriado para la tinción con el anticuerpo SP263. Además, se puede usar tejido de placenta a término humano normal como control para el ensayo. Este tejido muestra una tinción uniforme de moderada a fuerte de la membrana y una tinción uniforme de débil a fuerte del citoplasma de las células de linaje trofoblástico. Se pueden usar tejido estromal placentario y la vasculatura para evaluar cualquier tinción de fondo. Si la evaluación de HE indica que la muestra del paciente es inadecuada, entonces se debe obtener una nueva muestra. La repetición de

la tinción de una muestra se debe llevar a cabo en portaobjetos sin teñir si (1) el portaobjetos de control de realización del ensayo del tejido no presenta una tinción aceptable; (2) el portaobjetos de control negativo no muestra una tinción aceptable; o (3) el portaobjetos teñido con anticuerpo SP263 (el portaobjetos con PD-L1 para IHQ) no es evaluable. Si el último de estos portaobjetos no se puede interpretar debido a artefactos, efectos de borde, necrosis, falta de tejido o cualquier otro motivo, entonces el portaobjetos no se puede usar para evaluación clínica. Si los controles son aceptables y el portaobjetos teñido con anticuerpo SP263 es evaluable, un anatomopatólogo capacitado puede evaluar el portaobjetos como se describe en los criterios de puntuación.

### **IIIC. Control de tejido positivo**

Se debe realizar el ensayo de un tejido de control positivo conocido fijado y procesado de la misma manera que las muestras de los pacientes para cada conjunto de condiciones de prueba y con cada procedimiento de tinción con anticuerpo SP263 realizado. El tejido de control (un caso de referencia) debe ser de una autopsia recién realizada, una biopsia, una muestra quirúrgica preparada y fijada lo antes posible de manera idéntica a las muestras de los pacientes. Este tejido se puede usar para controlar todas las etapas del procesamiento y tinción de muestras. Un corte histológico fijado o procesado de manera diferente a la muestra de prueba se puede usar como control para reactivos y tinción, pero no para fijación o preparación de tejido. Un caso de CPNM positivo con tinción moderada es más adecuado para el control de calidad que uno con tinción fuerte; se puede usar para detectar niveles menores de degradación de reactivos o problemas fuera de especificación que podrían estar relacionados con el instrumento. La tinción positiva de la membrana de las células neoplásicas en el tejido de control confirma que se aplicó el anticuerpo y que el instrumento funcionó apropiadamente. El control de tejido positivo se debe usar solo para controlar el rendimiento; no se debe usar para ayudar al diagnóstico clínico de muestras de pacientes. Adicionalmente, el ensayo ilustrado en el presente documento se puede utilizar como control positivo de tejido placentario a término humano, que muestra una tinción uniforme de moderada a fuerte de la membrana y el citoplasma de las células de linaje trofoblástico. Se pueden usar tejido estromal placentario y la vasculatura para evaluar cualquier tinción de fondo. En las FIGS. 7A y 7B se encuentran imágenes ejemplares de tejido placentario teñido con el anticuerpo SP263.

### **IIID. Criterios de puntuación**

Un anatomopatólogo capacitado asigna un estado clínico basado en PD-L1 por IHQ en base a su evaluación del porcentaje de tinción IHQ específica de PD-L1. Se selecciona un límite para la positividad y la negatividad en base a datos clínicos de pacientes con respuesta favorable conocida al agente terapéutico del eje de PD-1 que se está usando. En este modo de realización ejemplar, se seleccionó un límite de un 25 %. Se asigna un estado clínico negativo a los casos con un porcentaje total de células tumorales con tinción de la membrana a cualquier intensidad de menos de un 25 %. Se asigna un estado clínico positivo a casos con un porcentaje total de células tumorales con tinción de la membrana a cualquier intensidad mayor o igual a un 25%. La interpretación clínica de los casos de CPNM teñidos con el anticuerpo SP263 se basó en los criterios indicados en la tabla 3 anteriormente.

En las secciones siguientes se proporcionan imágenes de diversos patrones de tinción negativa y positiva.

#### **IIID(1). Casos negativos**

La intensidad de tinción negativa se caracteriza por la ausencia de cualquier señal detectable o por la tinción membranosa de cualquier intensidad en menos de un 25 % de las células neoplásicas.

El caso negativo 1 se ilustra en la FIG. 24. Se observa tinción negativa de células tumorales e inmunitarias (cero por ciento) con un aumento de 20X.

El caso negativo 2 se ilustra en la FIG. 25. Membrana de células tumorales con un cero por ciento de tinción. El área tumoral contiene un 30 % de células inmunitarias en una vista de menor resolución con un 35 % de células inmunitarias que muestran la expresión de PD-L1 (10X izquierda, 20X derecha).

El caso negativo 3 se ilustra en la FIG. 26. Tumor con un 5 % de células que demuestran tinción de la membrana (flecha). El área tumoral (que consiste en tumor viable y desmoplasia e inflamación circundantes) contiene un 10 % de células inmunitarias y un 50 % de células inmunitarias con expresión de PD-L1 (4X).

El caso negativo 4 se ilustra en la FIG. 27. Tumor con un 10 % de células que demuestran tinción de la membrana en este campo. El área tumoral contiene un 10 % de células inmunitarias y un 10 % de células inmunitarias con expresión de PD-L1 (10X)

El caso negativo 5 se ilustra en la FIG. 28. Tumor con un 15 % de células que muestran tinción de la membrana (región delineada). También se observa tinción de células inmunitarias asociadas a tumores (2X).

El caso negativo 6 se ilustra en la FIG. 29. Tumor con un 20 % de células que demuestran tinción de la membrana en este campo. El área tumoral contiene un 5 % de células inmunitarias y un 10 % de células inmunitarias con

expresión de PD-L1 (10X)

**IIID(2). Casos positivos**

5 La intensidad de tinción positiva se caracterizó por la presencia de tinción membranosa de cualquier intensidad en un porcentaje mayor o igual a un 25 % de las células neoplásicas.

10 El caso positivo 1 se ilustra en la FIG. 30. Tumor con un 25 % de células que demuestran tinción de la membrana en este campo. El área tumoral contiene un 5 % de células inmunitarias y un 5 % de células inmunitarias con expresión de PD-L1 (4X).

15 El caso positivo 2 se ilustra en la FIG. 31. Tumor con un 35 % de células que demuestran tinción de la membrana en este campo. El área tumoral (que consiste en tumor viable y desmoplasia e inflamación circundantes) contiene un 10 % de células inmunitarias y un 5 % de células inmunitarias con expresión de PD-L1 (4X).

El caso positivo 3 se ilustra en la FIG. 32. Tumor con un 50 % de células que demuestran tinción de la membrana en este campo. El área tumoral (que consiste en tumor viable y desmoplasia e inflamación circundantes) contiene un 10 % de células inmunitarias y un 5 % de células inmunitarias con expresión de PD-L1 (4X).

20 El caso positivo 4 se ilustra en la FIG. 33. Tumor con un 70 % de células que demuestran tinción de la membrana en este campo. El área tumoral contiene un 3 % de células inmunitarias y un 15 % de células inmunitarias con expresión de PD-L1 (4X).

25 El caso positivo 5 se ilustra en la FIG. 34, que presenta la tinción de la membrana de las células tumorales en un 100 % (4X).

El caso positivo 6 se ilustra en la FIG. 35, que presenta tinción positiva de la membrana de las células tumorales con tinción negativa de las células inmunitarias del tumor (20X).

30 **IIID(3). Evaluación de la tinción de células inmunitarias**

Se capturó la tinción de células inmunitarias con fines exploratorios. Una variedad de células inmunitarias muestra tinción e incluyen linfocitos, macrófagos, células reticulares dendríticas, células plasmáticas y neutrófilos. El portaobjetos teñido con HE se examina inicialmente para determinar el porcentaje total del área tumoral (células tumorales y cualquier estroma desmoplásico) afectada por las células inmunitarias. Las áreas que no se consideran parte del área tumoral incluyen tumor no viable, tal como áreas con artefactos de cauterización o aplastamiento y necrosis extensa. El tejido linfóide normal no afectado por la neoplasia, por ejemplo, como se observa en los ganglios linfáticos con tumor metastásico, no se evalúa como parte del área tumoral o las células inmunitarias que afectan el tumor. A continuación, en el portaobjetos con PD-L1 para IHQ se puntúa el porcentaje de tinción de las células inmunitarias asociadas a tumores para PD-L1. En los casos en que las células inmunitarias que se tiñen positivamente se mezclan con células tumorales que se tiñen positivamente, puede ser difícil cuantificar la cantidad de tinción para cada componente. En las FIGS. 36-40 se ilustran ejemplos de interpretación de células inmunitarias.

45 El caso de células inmunitarias 1 (FIG. 36) contiene una tinción de macrófagos alveolares asociada con el tumor (flecha negra) y una tinción de macrófagos alveolares no asociada con el tumor (flecha discontinua) (10X). Solo se enumeran las células inmunitarias asociadas con el tumor.

50 El caso de células inmunitarias 2 se ilustra en la FIG. 37. Con un aumento de 4X, el patrón de tinción parece ser predominantemente una tinción de la membrana de las células tumorales; sin embargo, el examen a mayor resolución (20X) revela que el tumor es negativo para PD-L1 con tinción de las células inmunitarias membranosa (punta de flecha cerrada) y punteada (flecha discontinua). También se observa tinción de las células dendríticas (punta de flecha abierta).

55 El caso de células inmunitarias 3 se ilustra en las FIGS. 38 y 39, que es un caso de tumor negativo con tinción de células inmunitarias. Con un aumento de 4X (FIG. 38), las células inmunitarias en el área tumoral se aprecian mejor en la imagen con tinción del PD-L1 y comprenden un 40 % del área tumoral con un 80 % de tinción de células inmunitarias (4X). Una resolución mayor (FIG. 39) confirma que el PD-L1 se expresa altamente en el componente de células inmunitarias del tumor (20X).

60 El caso de células inmunitarias 4 se ilustra en la FIG. 40, que es un caso de tumor positivo con tinción de células inmunitarias. En esta vista, un 15 % del área tumoral contiene células inmunitarias, expresando PD-L1 un 30 % de las células inmunitarias (4X).

65 **IIID(4). Casos problemáticos**

Los casos reciben un estado clínico de acuerdo con el porcentaje de células tumorales con tinción de la membrana. Diversos patrones de tinción y características morfológicas pueden dificultar la interpretación y cuantificación de la tinción de la membrana del tumor. Algunos casos pueden ser problemáticos en particular, debido a los siguientes problemas:

#### ■ **Tinción citoplasmática débil**

Algunas muestras pueden presentar una tinción citoplasmática débil de las células tumorales que se puede confundir a baja resolución con una tinción débil de la membrana de las células tumorales. Por esta razón, al evaluar los portaobjetos teñidos con el ensayo VENTANA PD-L1 (SP263), la tinción débil se debe confirmar con un examen a resoluciones mayores para distinguir entre la tinción membranosa y citoplasmática de las células tumorales.

#### ■ **Tinción fuerte de células inmunitarias superpuesta con tinción de células tumorales**

Algunos tumores pueden contener un componente inflamatorio extenso que rodea al tumor y se infiltra dentro del tumor. En los casos en que se observa una tinción fuerte para las células tanto tumorales como inmunitarias, puede ser problemático diferenciar y cuantificar la tinción del ensayo VENTANA PD-L1 (SP263) entre las dos poblaciones de células. La presencia de células inmunitarias que se filtran en el tumor se debe confirmar usando el portaobjetos con HE. El patrón de tinción de PD-L1 se utiliza para ayudar a atribuir la expresión a las células inmunitarias (tinción punteada) y las células tumorales (tinción lineal de la membrana).

#### ■ **Obstaculización por material endógeno**

A veces, en muestras de CPNM, el material endógeno, tal como el pigmento antracótico, el pigmento de melanina o la hemosiderina, puede obstaculizar e interferir con la interpretación de la tinción del ensayo VENTANA PD-L1 (SP263) de las células inmunitarias y tumorales. La comparación del portaobjetos de control negativo de isotipo con el portaobjetos teñido con PD-L1 puede ayudar a diferenciar entre la tinción de biomarcadores y el material endógeno.

Algunos casos problemáticos se muestran en las FIGS. 41-47.

El caso problemático 1 (FIG. 41) ilustra la tinción citoplasmática débil (flecha negra) y débil de la membrana (punta de flecha cerrada) del tumor. También se observa tinción de macrófagos alveolares (flecha discontinua) (20X).

El caso problemático 2 (FIG. 42) ilustra la tinción débil de la membrana (flechas negras) con un aumento de 20X.

El caso problemático 3 (FIG. 43) ilustra un tumor con tinción citoplasmática débil y débil de la membrana (flecha negra) y solo tinción débil de la membrana (flecha discontinua) con un aumento de 20X.

El caso problemático 4 (FIG. 44) ilustra un tumor con tinción citoplasmática débil y débil de membrana y tinción de células inmunitarias (10X izquierda, 20X derecha).

El caso problemático 5 (FIG. 45) ilustra tinción membranosa de las células inmunitarias (flecha negra) y tinción punteada de las células inmunitarias (flecha discontinua) entremezcladas con una tinción de la membrana de las células tumorales (punta de flecha cerrada) (40X).

El caso problemático 6 (FIG. 46) ilustra una tinción de la membrana de las células tumorales (punta de flecha abierta) entremezclada con una tinción de las células inmunitarias difusa (flecha discontinua) y punteada (punta de flecha cerrada) (20X).

El caso problemático 7 (FIG. 47) ilustra un caso de CPNM que muestra antracosis (flecha negra, imagen superior izquierda) y reacción de células gigantes de cuerpo extraño (flecha negra, imagen superior derecha) no asociada con la interpretación del caso (fila superior, 20X). Un área diferente del caso contiene un pigmento antracótico (parte inferior, flecha discontinua) que se superpone con una tinción punteada de las células inmunitarias (parte inferior, punta de flecha cerrada), así como una tinción de la membrana de las células tumorales (parte inferior, punta de flecha abierta) (20X).

#### **IV. Aplicación clínica**

El procedimiento de tinción y el algoritmo de puntuación descritos anteriormente se aplicaron a un pequeño conjunto de formación de un estudio de fase 1/2 de MEDI4736 (NCT01693562). MEDI4736 es un mAb IgG1 humano que bloquea la unión de PD-L1 a PD-1 y CD-80 con alta afinidad y selectividad. Las muestras tanto de CPNM como de CCECC se consideran positivas cuando la membrana de  $\geq 25$  % de las células tumorales se tiñe para PD-L1 a cualquier intensidad. La precisión entre lectores para determinar el estado de PD-L1 dio como resultado un porcentaje coincidente general de un 97 % y un 92 % para el CPNM y el CCECC, respectivamente.

Tanto para el CPNM como para el CCECC, los pacientes con PD-L1+ tuvieron una tasa de respuesta más alta que los pacientes con PD-L1-.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Ventana Medical Systems, Inc.

5 <120> ENSAYO HISTOQUÍMICO PARA EVALUAR LA EXPRESIÓN DEL LIGANDO DE MUERTE PROGRAMADA 1 (PD-L1)

<130> 32577-WO

10 <150> US 62/111.352  
<151> 03/02/2015

<160> 9

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1  
<211> 5  
<212> PRT

20 <213> Oryctolagus cuniculus

<400> 1

**Asn His Ala Ile Ser**  
1 5

25 <210> 2  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Oryctolagus cuniculus

30 <400> 2

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

35 <210> 3  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Oryctolagus cuniculus

40 <400> 3

**Arg Ile Phe Ser Ser Ser Asn Ile**  
1 5

45 <210> 4  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 4

50 **Gln Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Asn Asn Asn Trp Leu Ser**  
1 5 10

<210> 5  
<211> 7  
55 <212> PRT  
<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 5

Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser  
 1 5

5 <210> 6  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Oryctolagus cuniculus  
 <400> 6

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

10 <210> 7  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 15 <213> Oryctolagus cuniculus  
 <400> 7

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser

20 <210> 8  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Oryctolagus cuniculus  
 25 <400> 8

ES 2 791 950 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9  
<211> 19  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 9

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

10 Glu Glu Thr

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento histoquímico de clasificación de un tumor en base a la expresión de PD-L1, comprendiendo el procedimiento:
- 5 poner en contacto una muestra de tejido del tumor con un anticuerpo específico contra el PD-L1 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una manera que deposite un colorante en la muestra tumoral cerca de áreas de la muestra tumoral a las que se une el anticuerpo, en el que el anticuerpo comprende una CDR1 de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 1, una CDR2 de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 2, una CDR3 de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 3, una CDR1 de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 4, una CDR2 de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 5, una CDR3 de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 6;
- 10
- cuantificar un porcentaje de células tumorales que tienen tinción de la membrana a cualquier intensidad por encima del fondo; y
- 15
- puntuar la expresión del PD-L1 en el tumor, en el que el tumor se puntúa como positivo para PD-L1 si el porcentaje de células tumorales que tienen tinción de la membrana a cualquier intensidad por encima del fondo excede un límite predeterminado que se correlaciona con una probabilidad de que el tumor responda a un agente terapéutico de unión al eje de PD-1, y en el que el límite es de un 25 % o más de las células tumorales que tienen tinción de la membrana a cualquier intensidad por encima del fondo y la puntuación no incluye la cuantificación de células inmunitarias teñidas con anti-PD-L1.
- 20
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo específico contra el PD-L1 humano comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de dominio variable que comprende la SEQ ID NO: 7.
- 25
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo específico contra el PD-L1 humano comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de dominio variable que comprende la SEQ ID NO: 8.
- 30
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo específico contra el PD-L1 humano comprende:
- 35 una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de dominio variable que comprende la SEQ ID NO: 7; y
- una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de dominio variable que comprende la SEQ ID NO: 8.
- 40
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el colorante se deposita poniendo en contacto la muestra de tejido con un segundo anticuerpo que se puede unir al anticuerpo específico contra el PD-L1 humano, en el que el segundo anticuerpo comprende un marcador detectable que media en el depósito del colorante.
- 45
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el anticuerpo específico contra el PD-L1 humano es un anticuerpo monoclonal de conejo, y el segundo anticuerpo es un anticuerpo anti-Ig de conejo.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el marcador detectable comprende una marca de afinidad, y en el que el depósito del colorante comprende además poner en contacto la muestra con una entidad de unión específica para la marca de afinidad, comprendiendo la entidad de unión una enzima que cataliza el depósito del colorante.
- 50
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la marca de afinidad es un hapteno y la entidad de unión es un tercer anticuerpo que es específico contra el hapteno.
- 55
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el colorante es el resultado de una reacción entre la enzima y un cromógeno.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el cromógeno se selecciona del grupo que consiste en diaminobencidina (DAB), fosfato de 4-nitrofenilo (pNPP), Fast Red, fosfato de bromocloroindolilo (BCIP), nitroazul de tetrazolio (NBT), BCIP/NBT, AP Orange, AP Blue, tetrametilbencidina (TMB), 2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolin-sulfonato] (ABTS), o-dianisidina, 4-cloronaftol (4-CN), nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG), o-fenilendiamina (OPD), 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-galactopiranosido (X-Gal), metilumbeliferil-β-D-galactopiranosido (MU-Gal), p-nitrofenil-α-D-galactopiranosido (PNP), 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurónido (X-Gluc), 3-amino-9-etilcarbazol (AEC), fucsina, yodonitrotetrazolio (INT), azul de tetrazolio y violeta de tetrazolio.
- 60
- 65

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el cromógeno es DAB.
12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la intensidad de fondo se determina tiñendo un corte seriado de la muestra de tejido del tumor con un anticuerpo de control de Ig.
- 5
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que las células tumorales que tienen tinción de la membrana se identifican comparando la muestra de tejido en contacto con el anticuerpo anti-PD-L1 humano con un corte seriado del tumor teñido con hematoxilina y eosina (HE), y regiones coincidentes en la muestra de tejido en contacto con el anticuerpo anti-PD-L1 humano que contiene el colorante por encima del fondo con regiones que
- 10
14. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tumor es un carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM) o un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC).

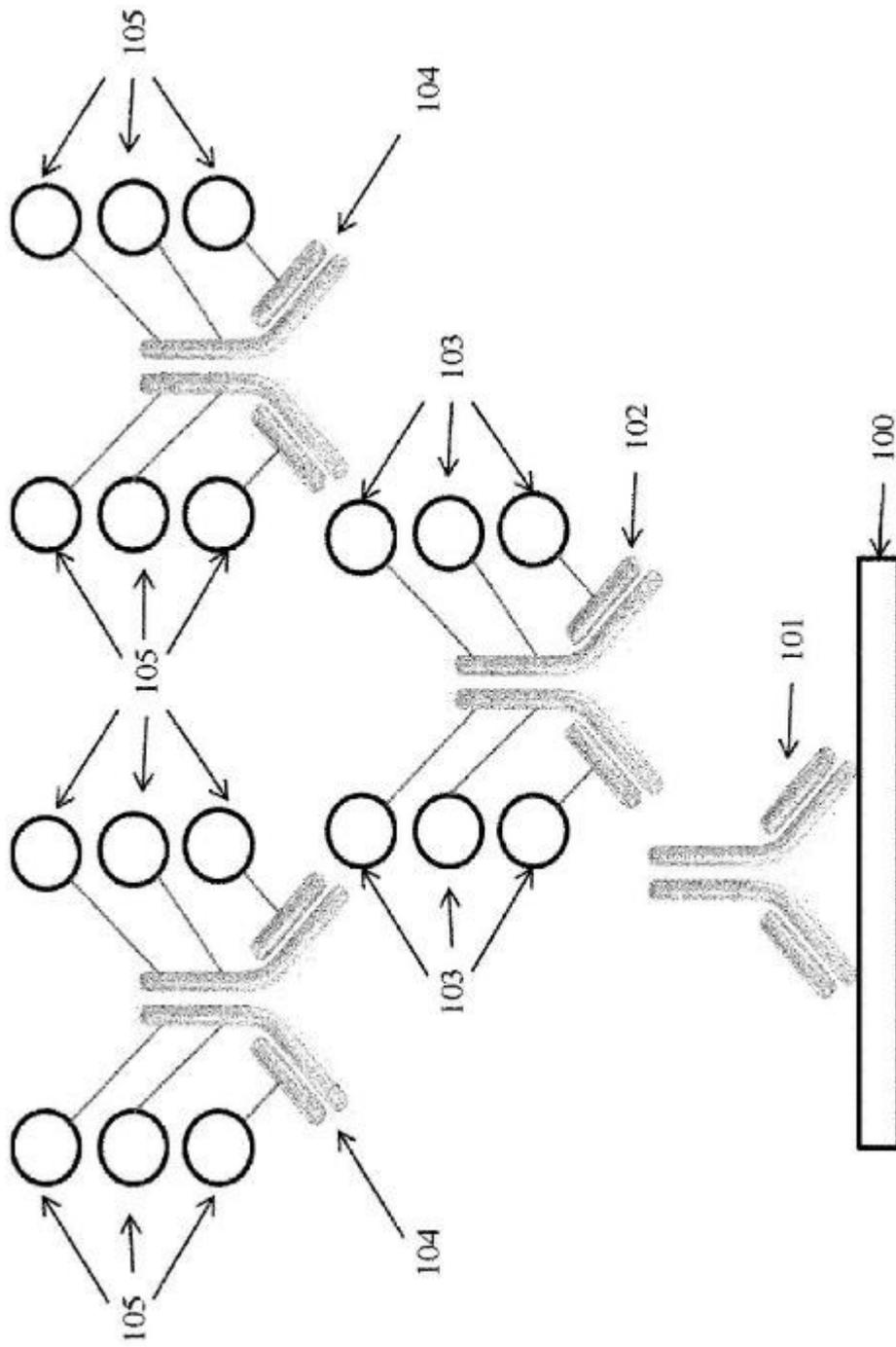


Fig. 1

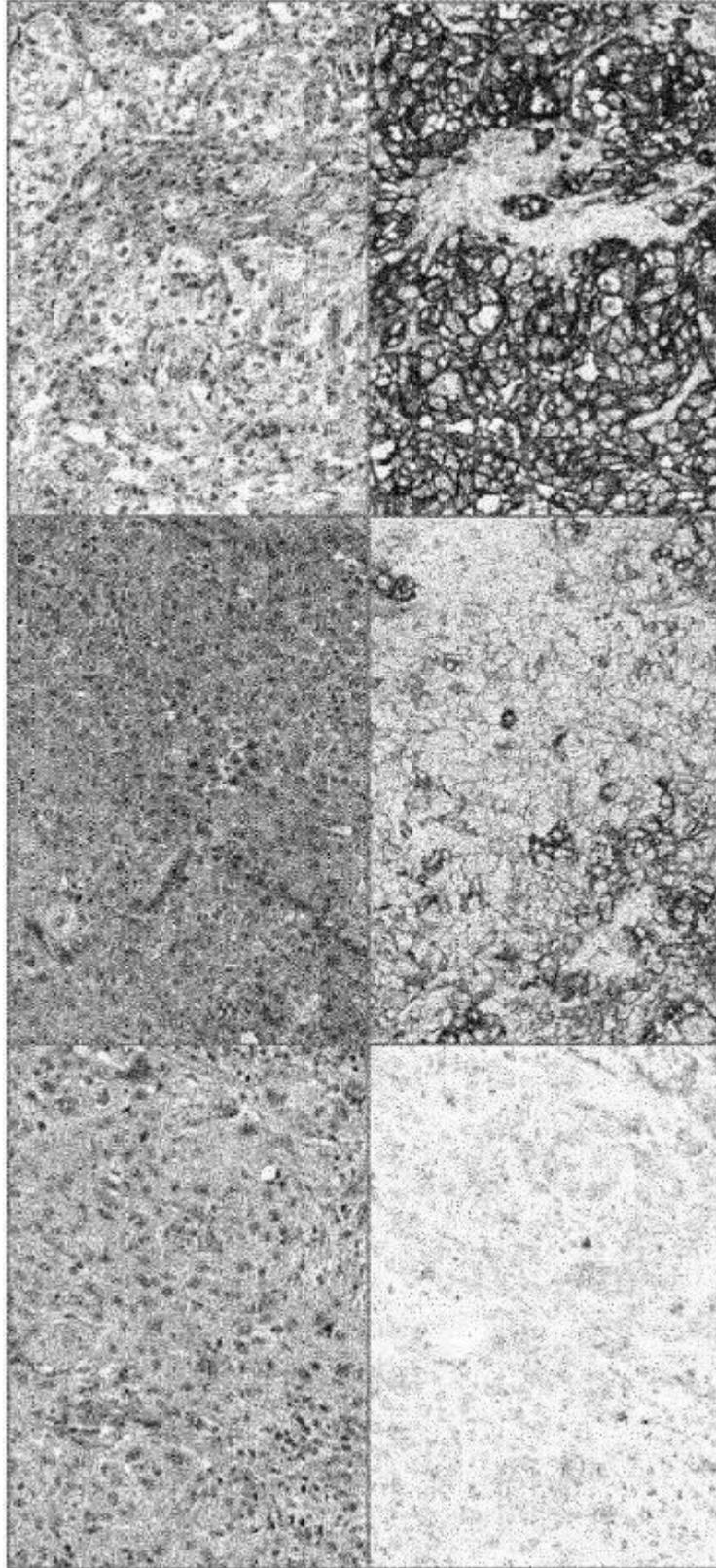


Fig. 2

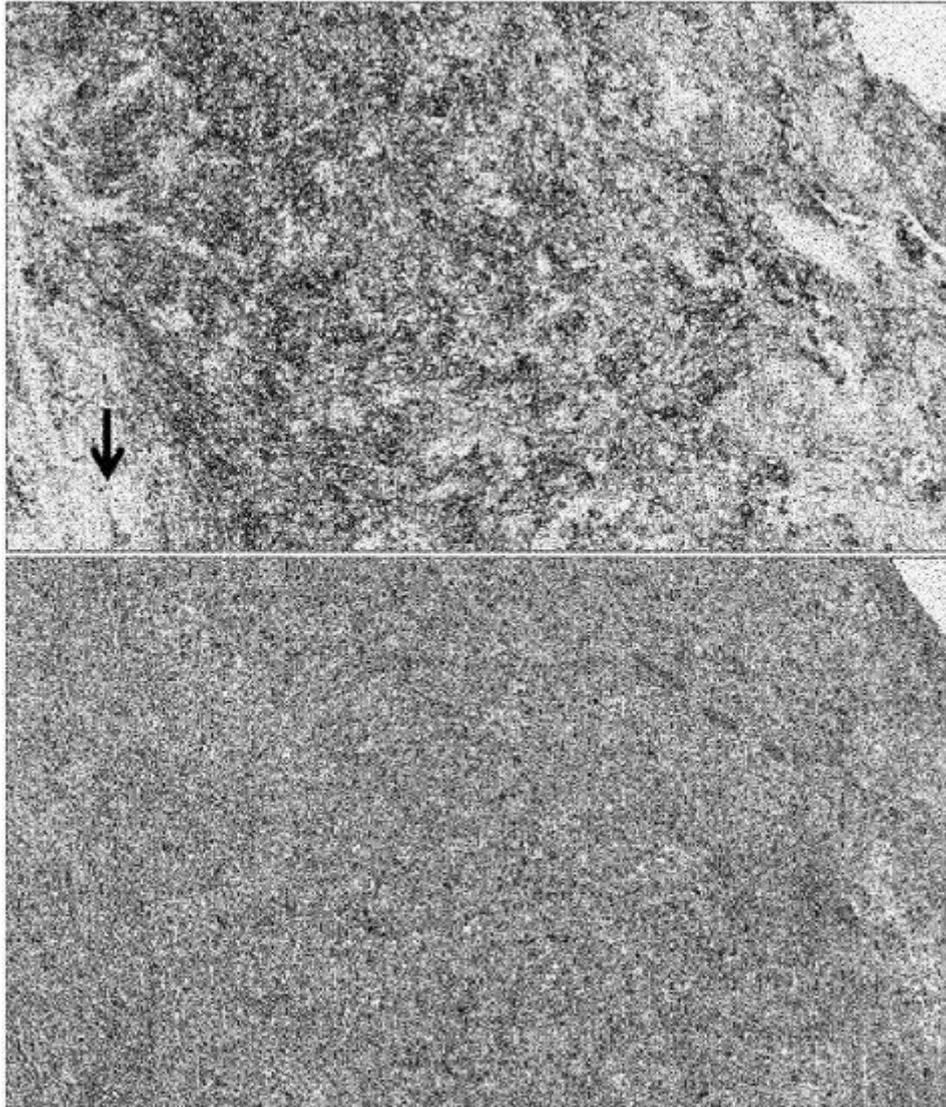


Fig. 3

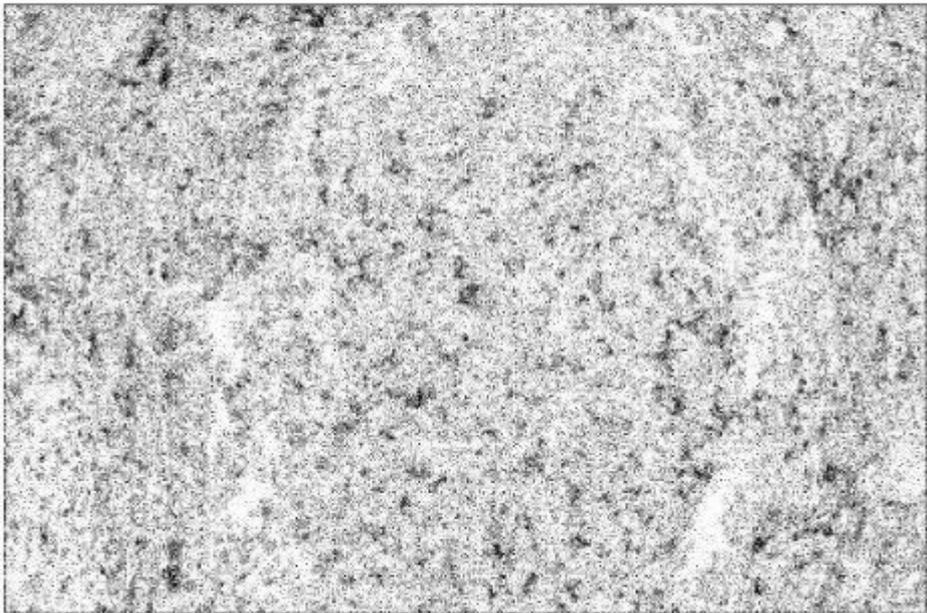
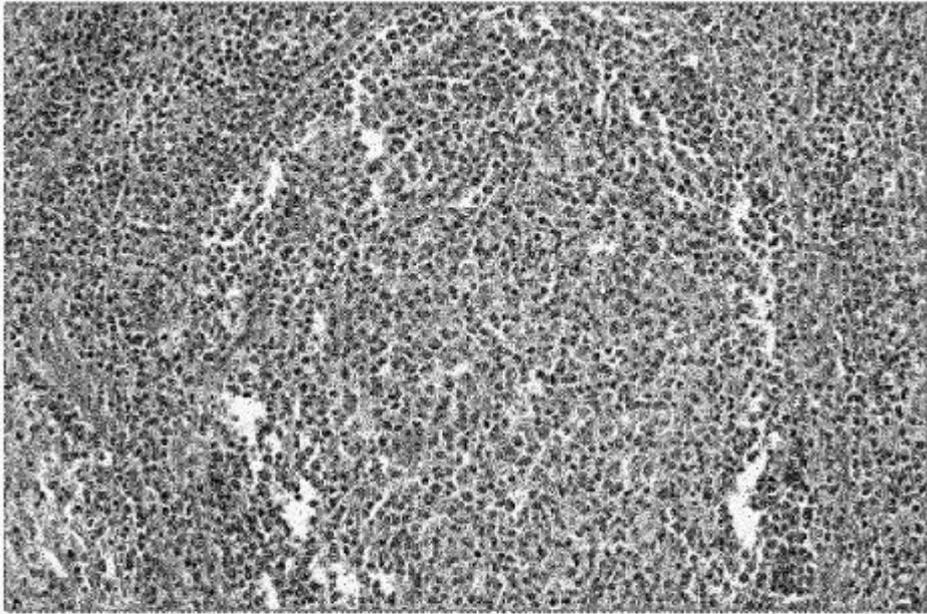


Fig. 4

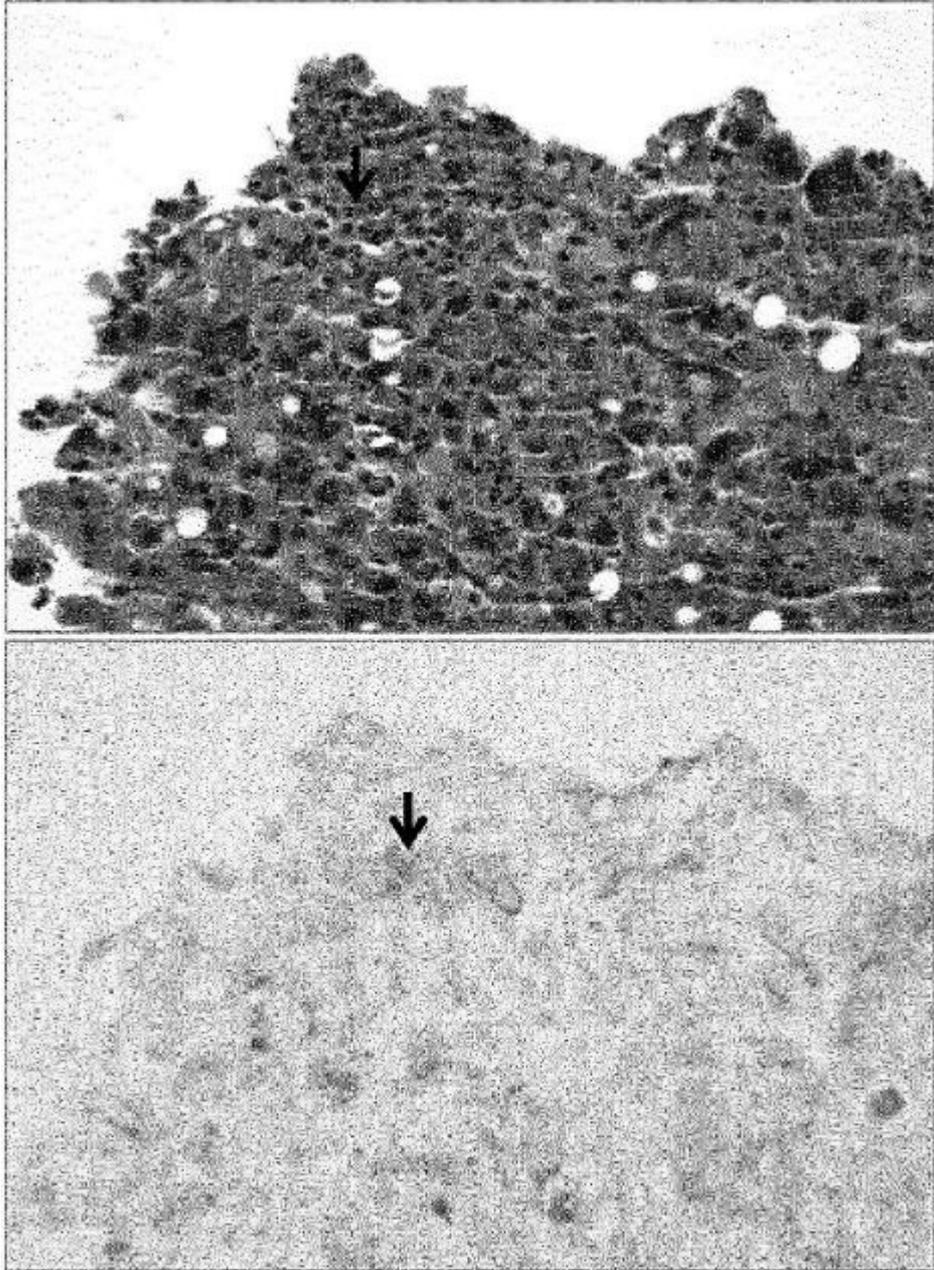


Fig. 5

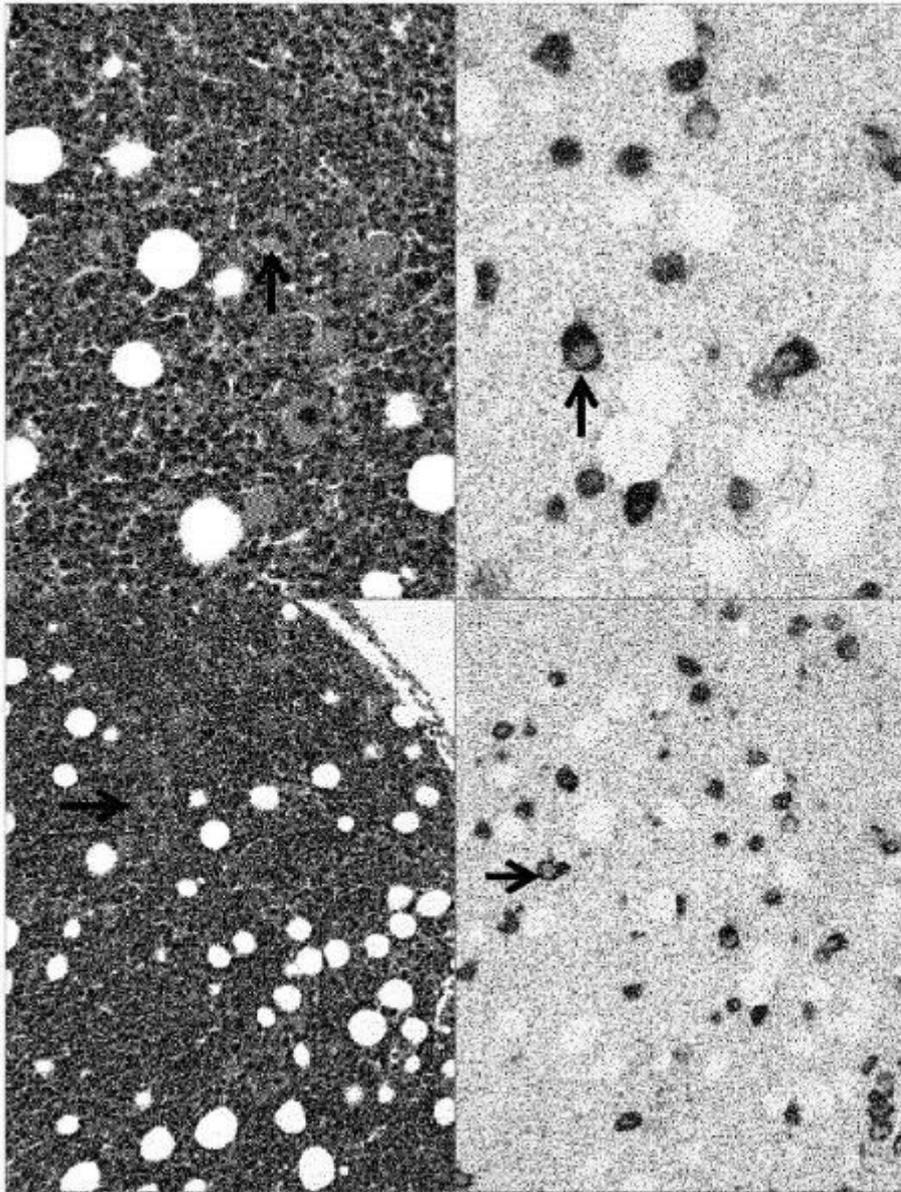


Fig. 6

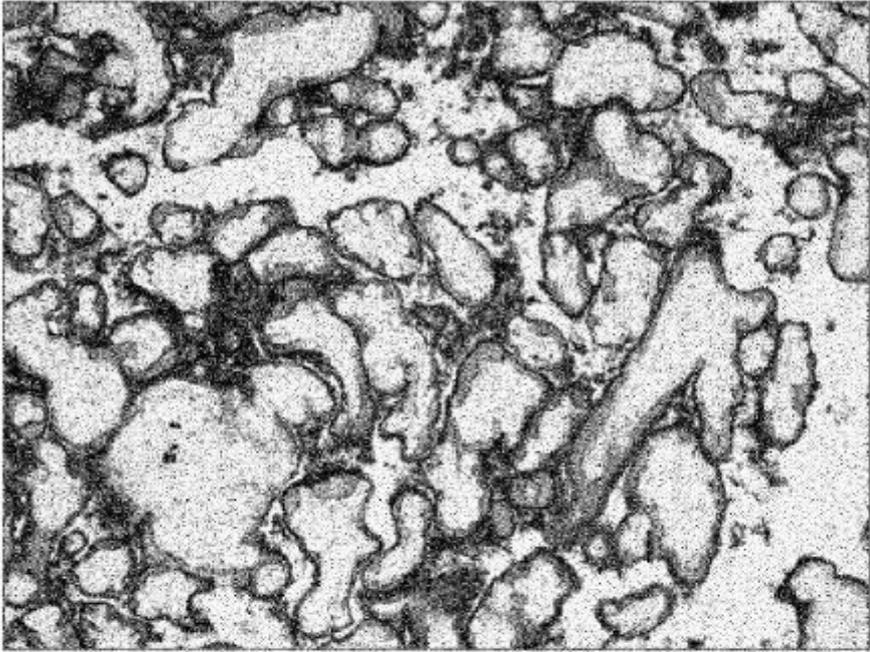


Fig. 7B

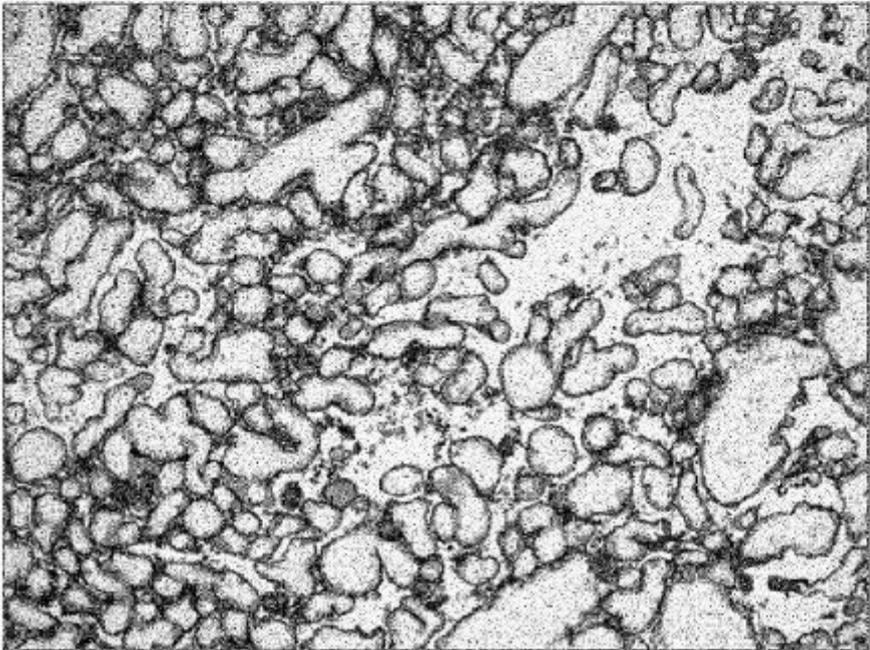


Fig. 7A

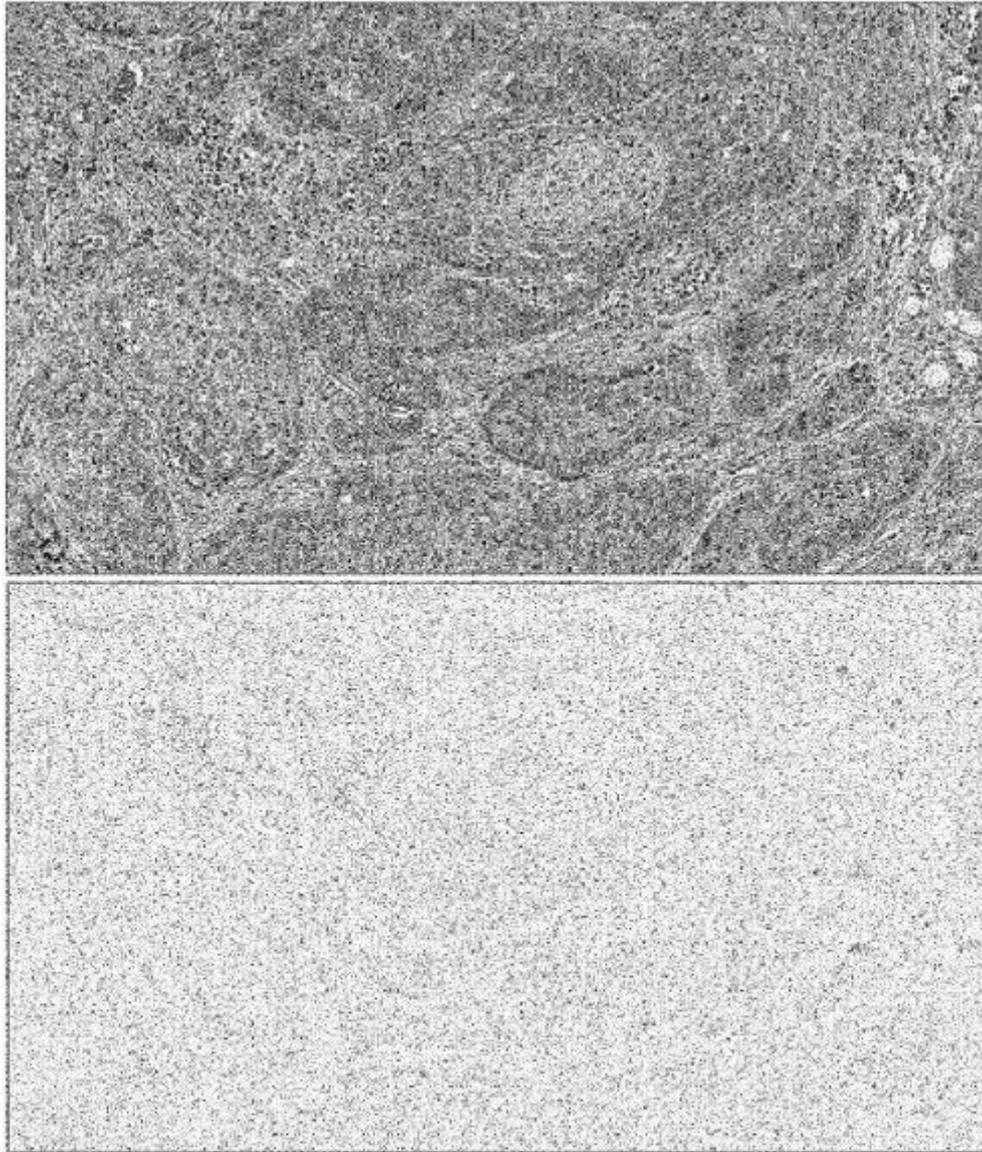


Fig. 8

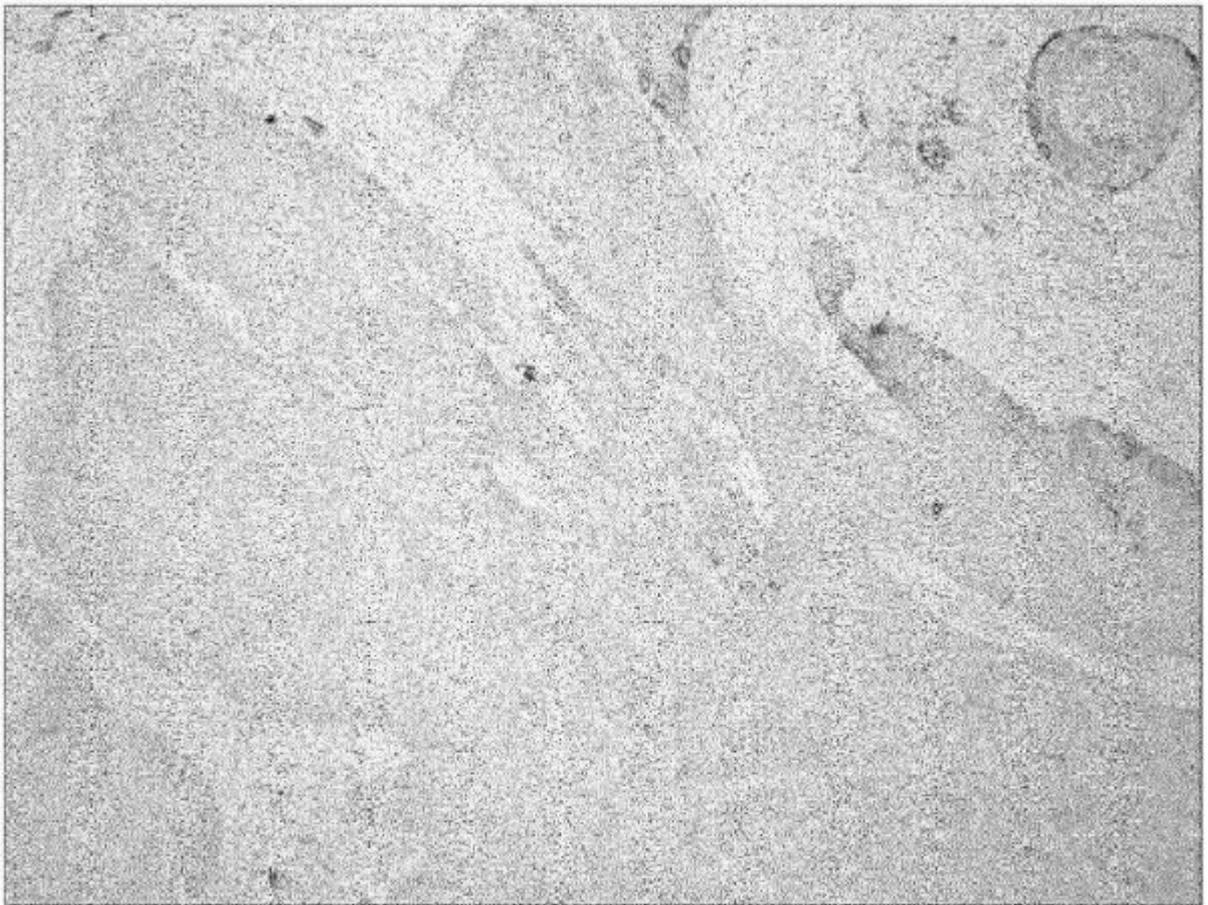


Fig. 9

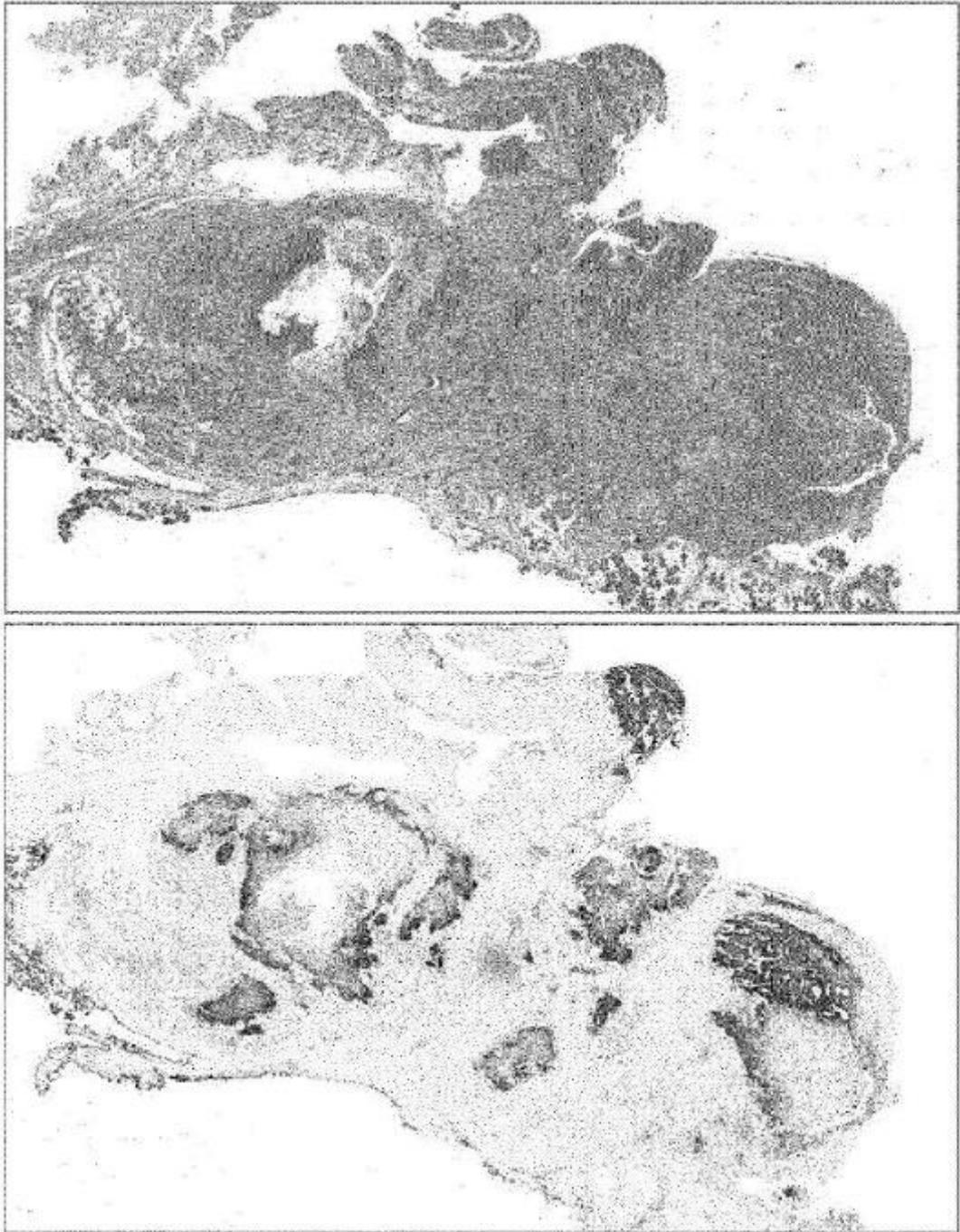


Fig. 10

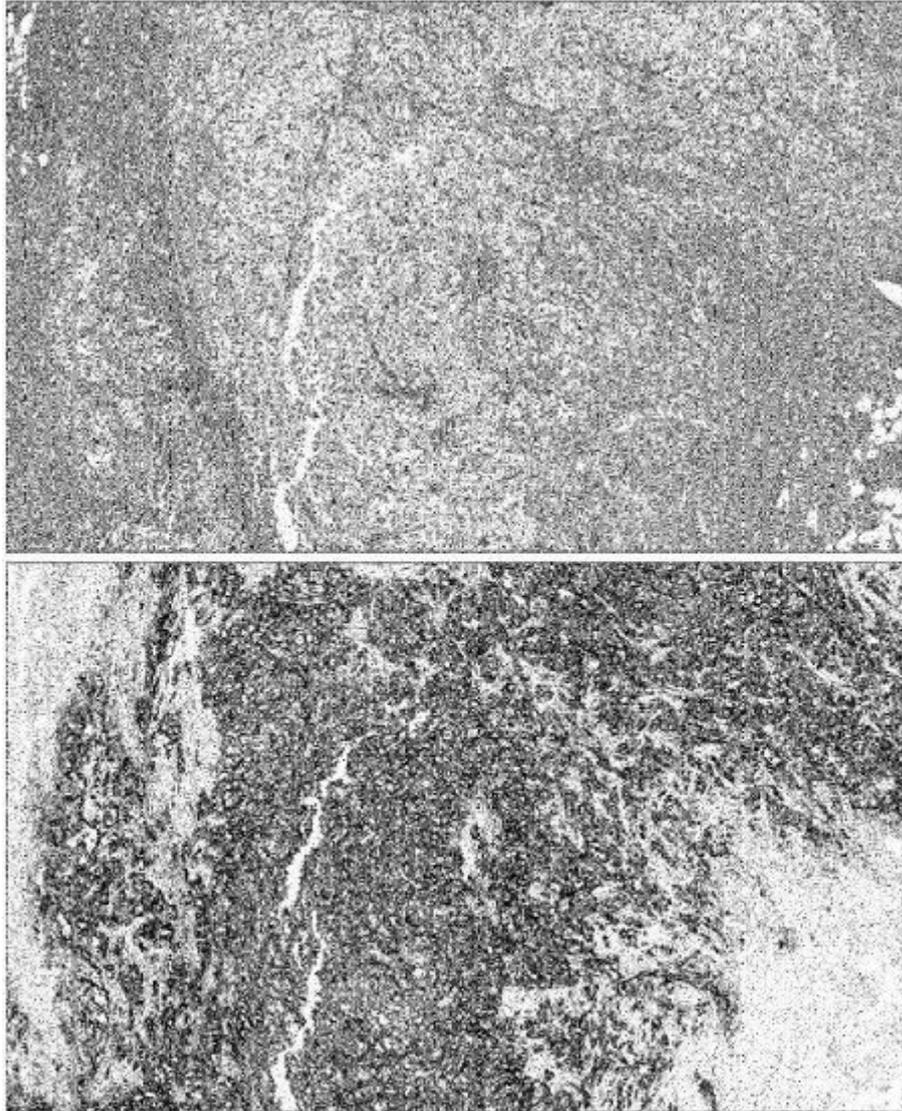


Fig. 11

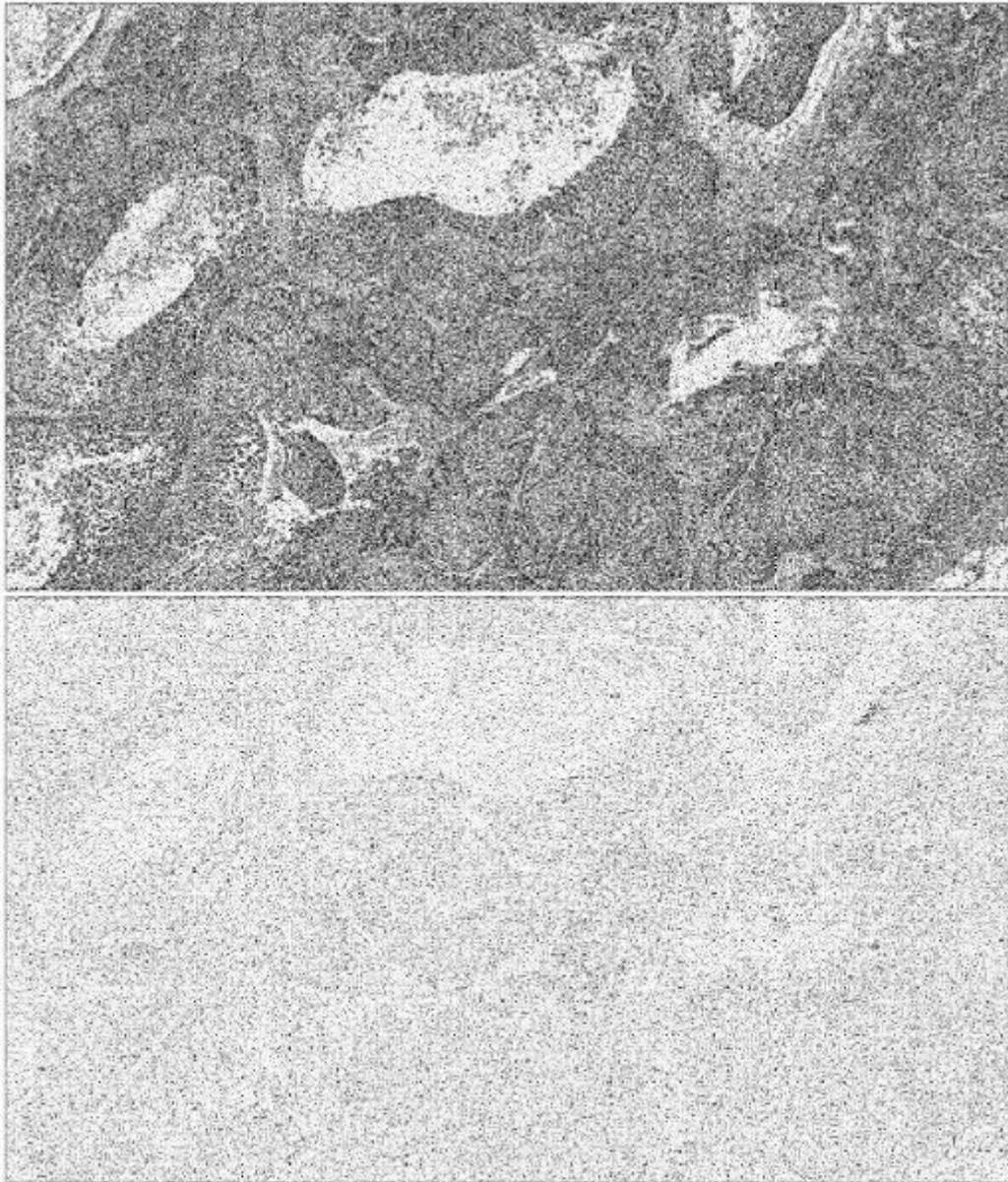


Fig. 12

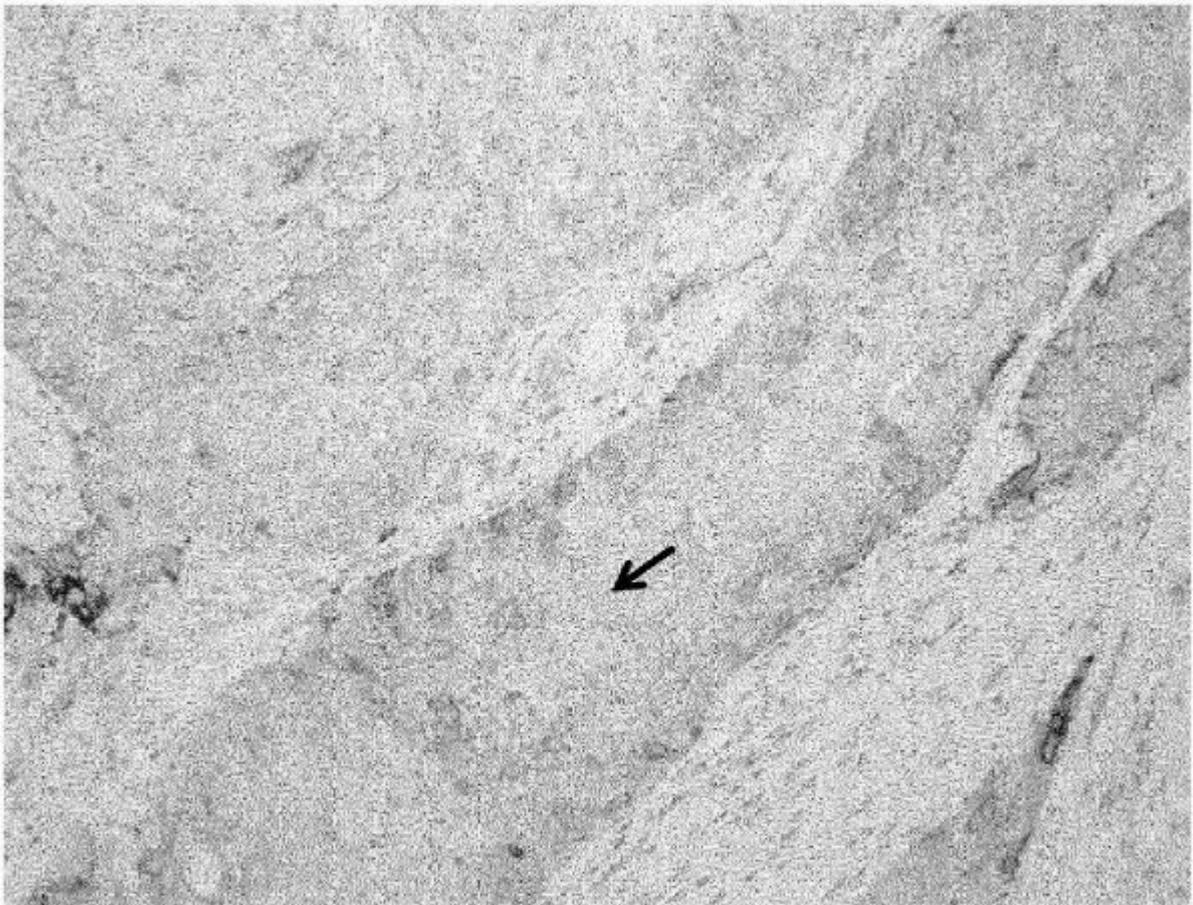


Fig. 13

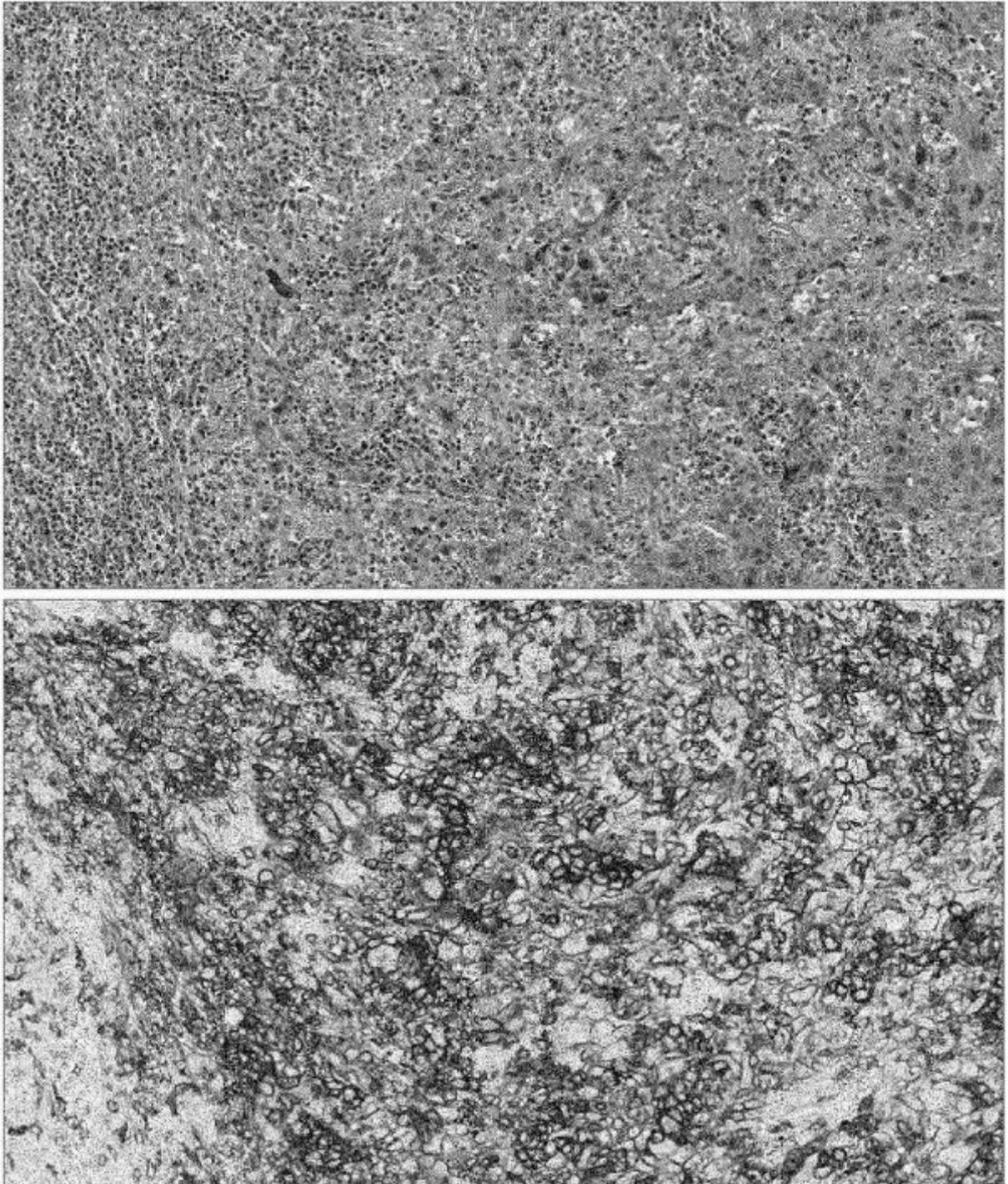


Fig. 14

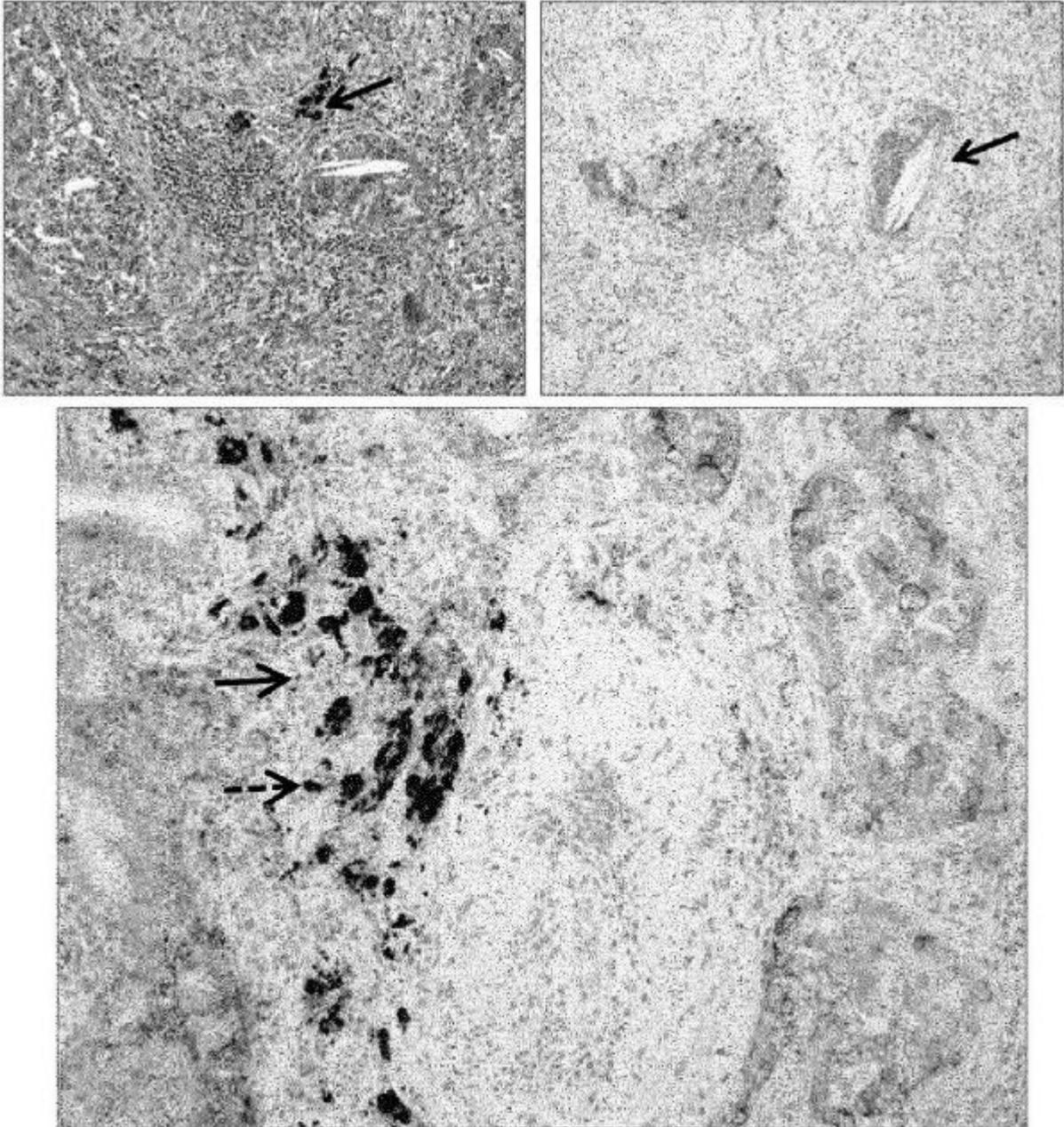


Fig. 15

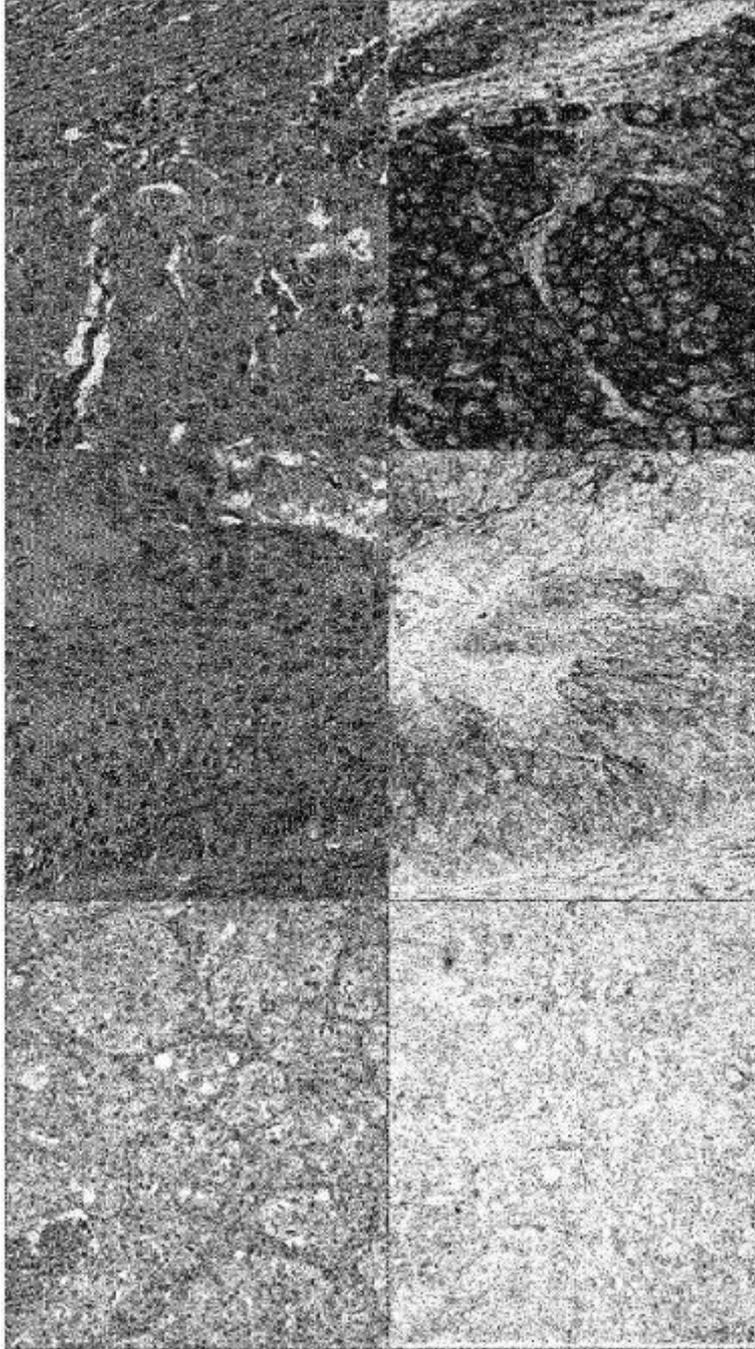


Fig. 16

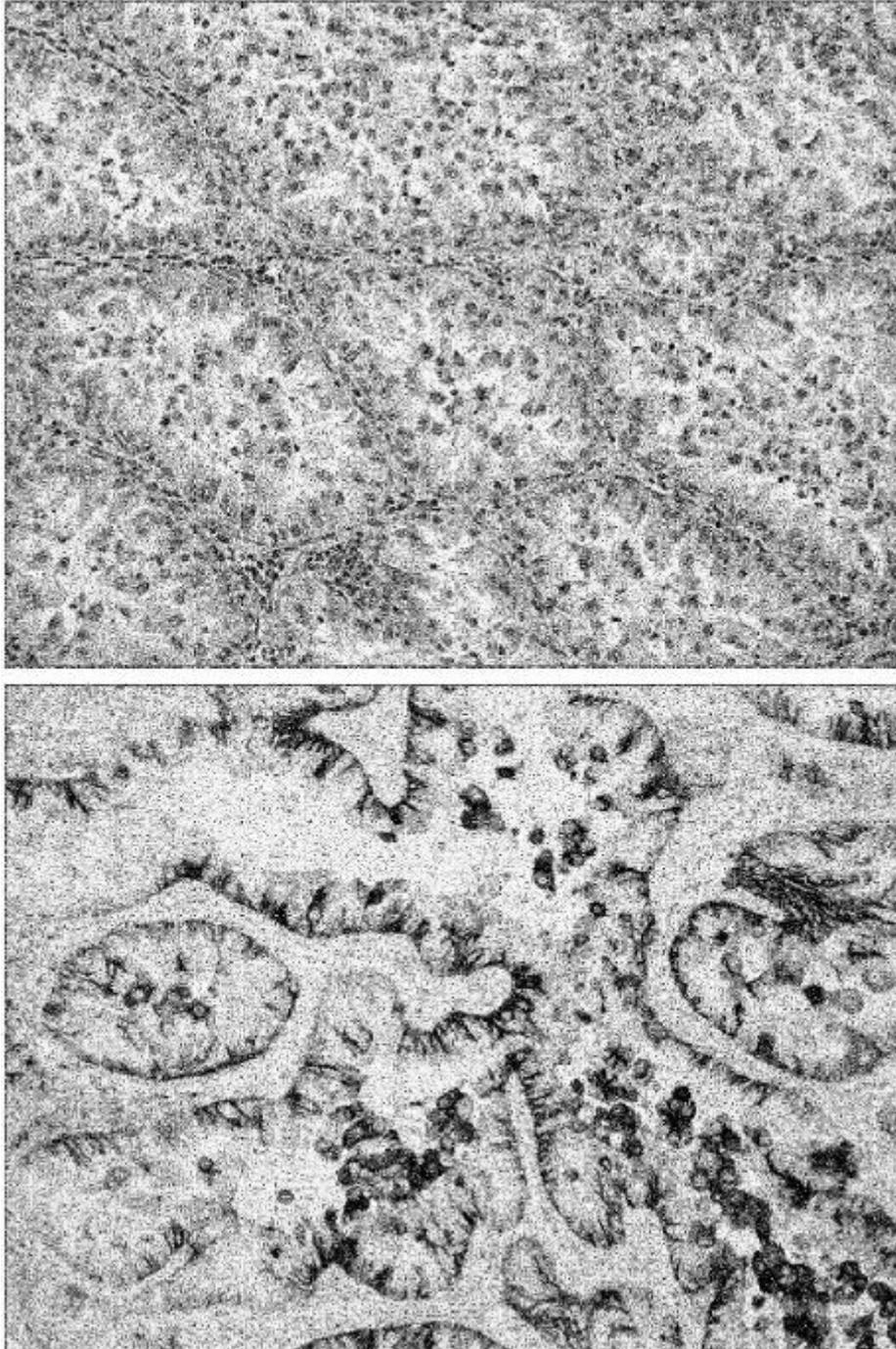


Fig. 17

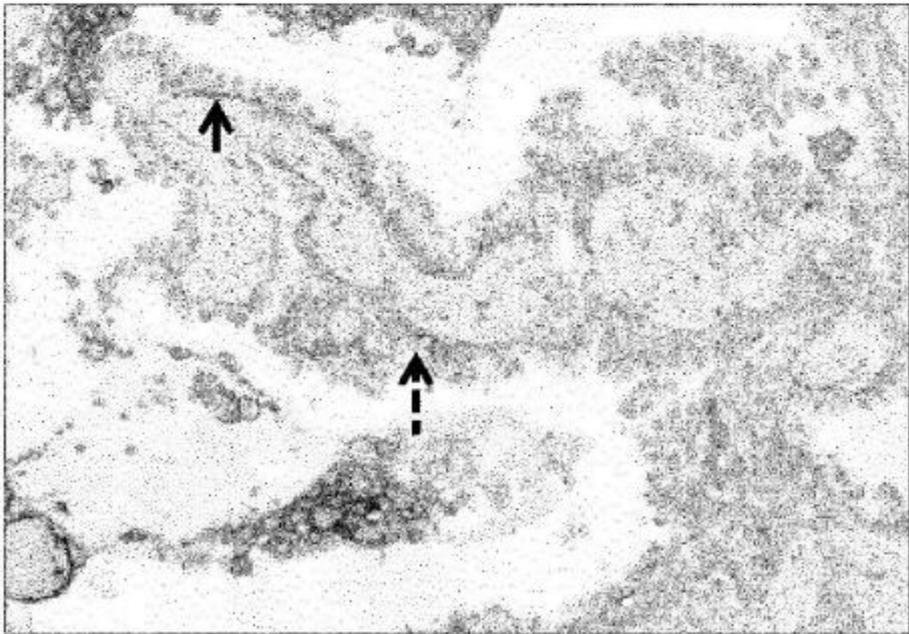
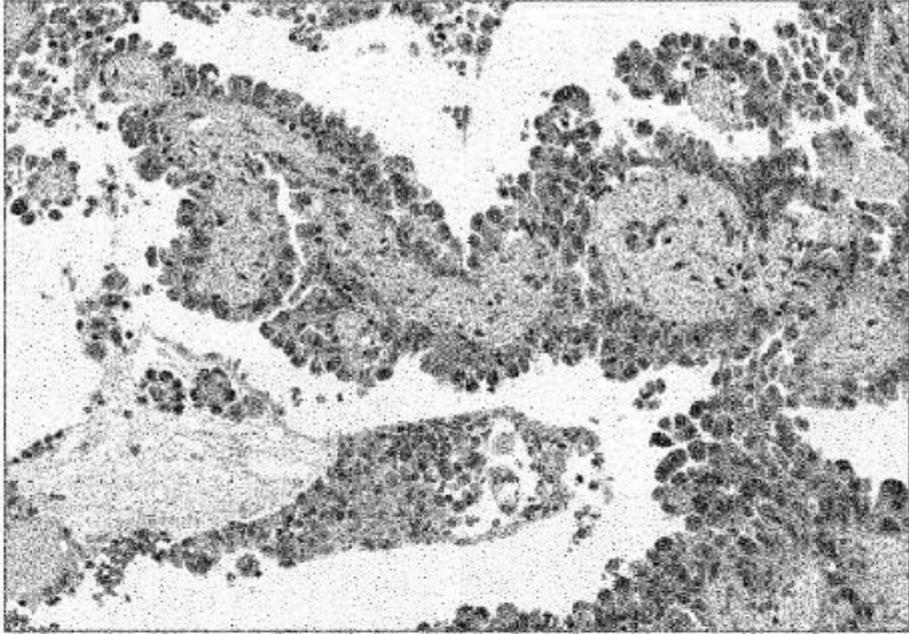


Fig. 18

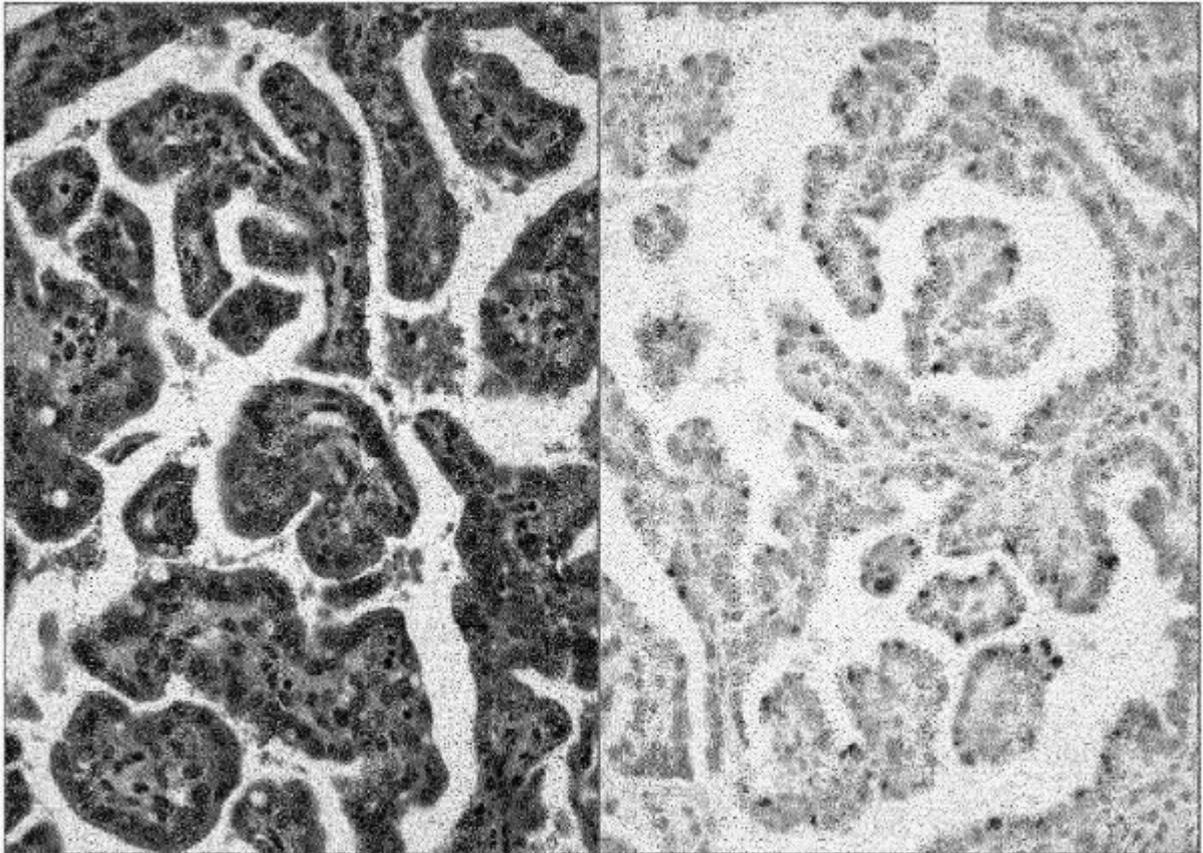


Fig. 19

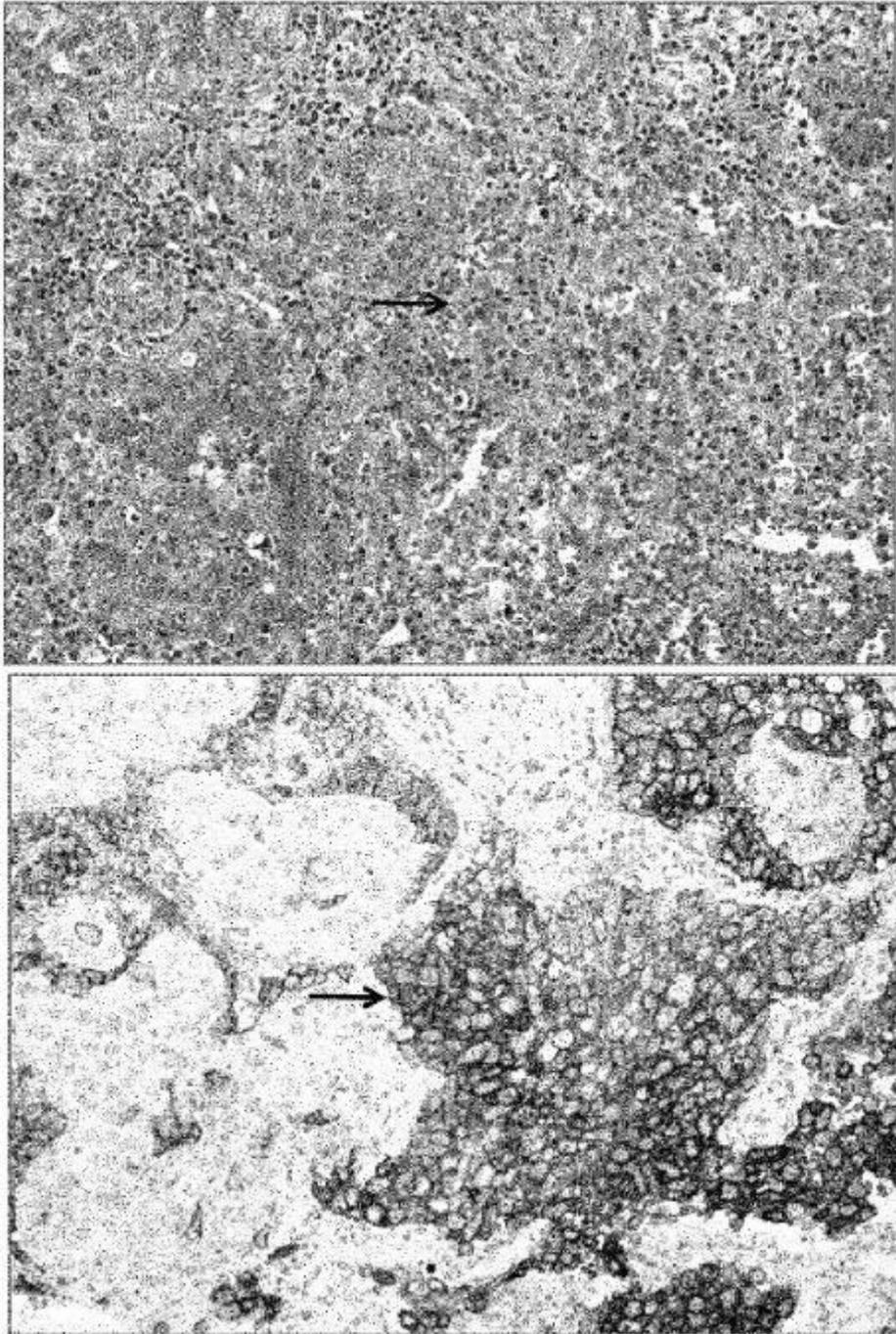


Fig. 20

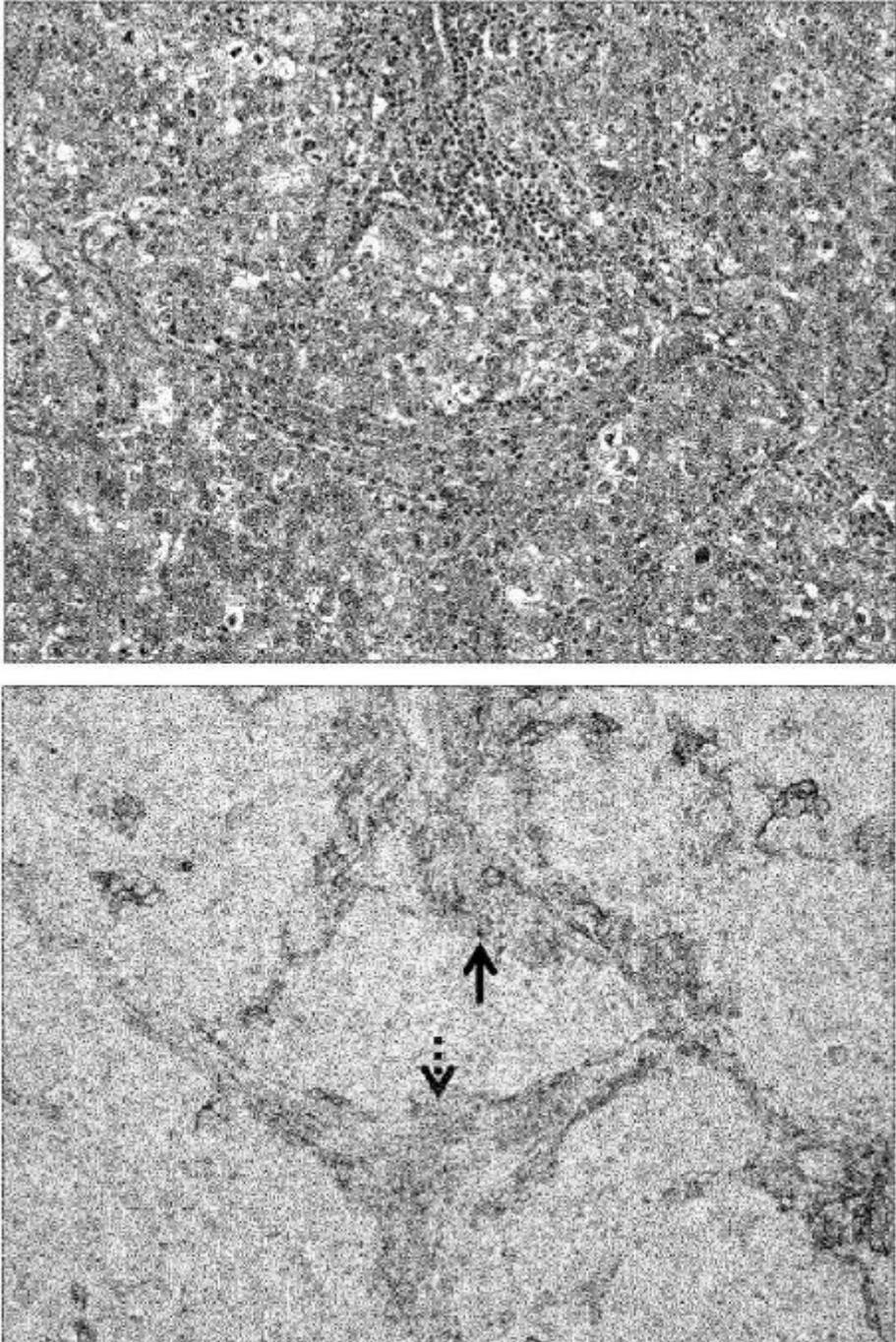


Fig. 21

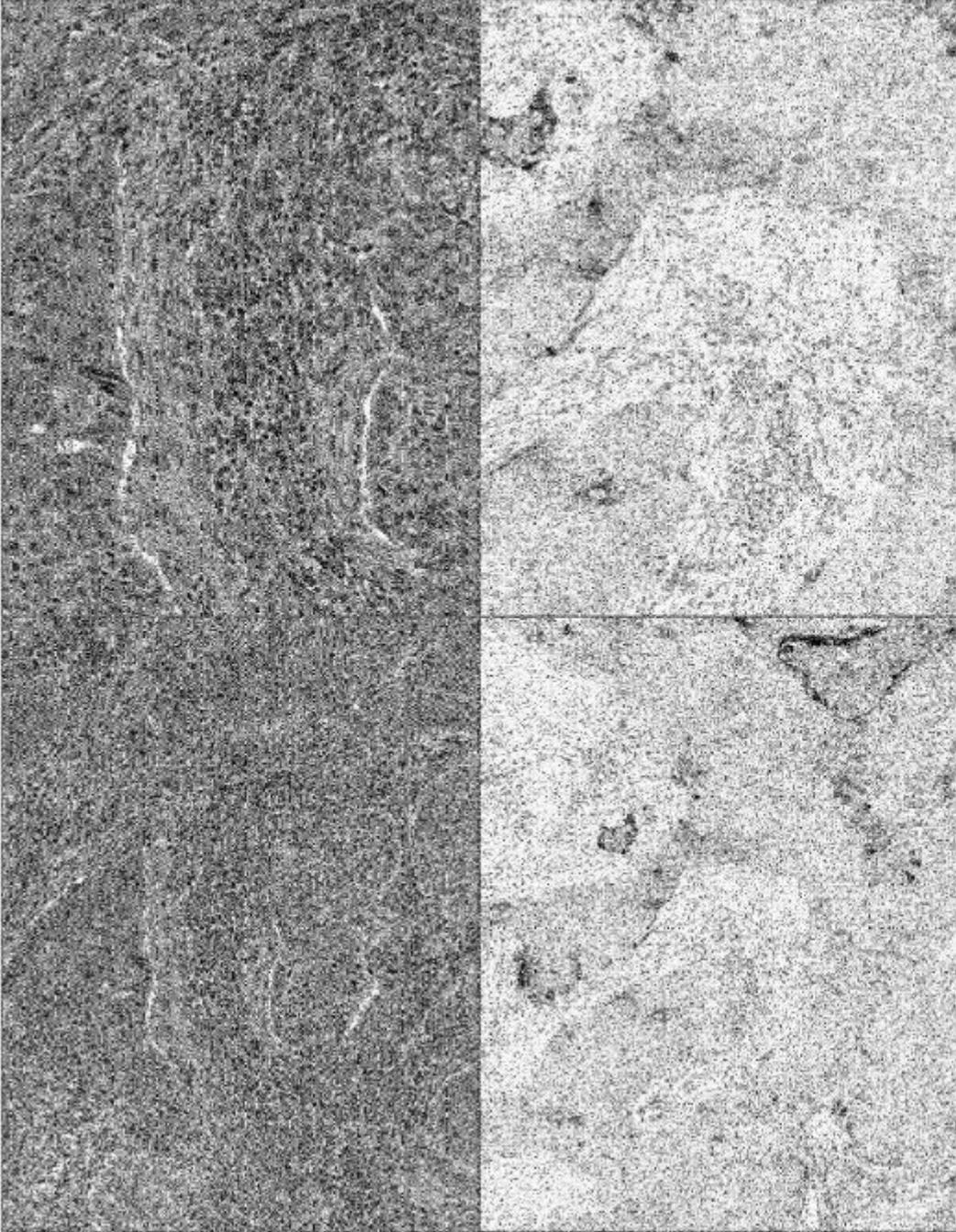


Fig. 22

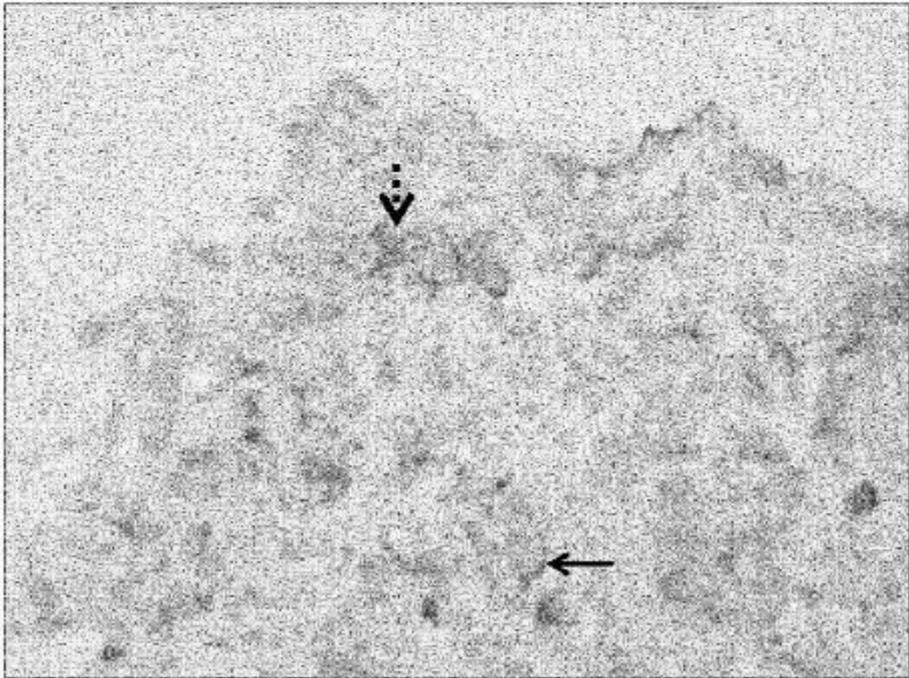
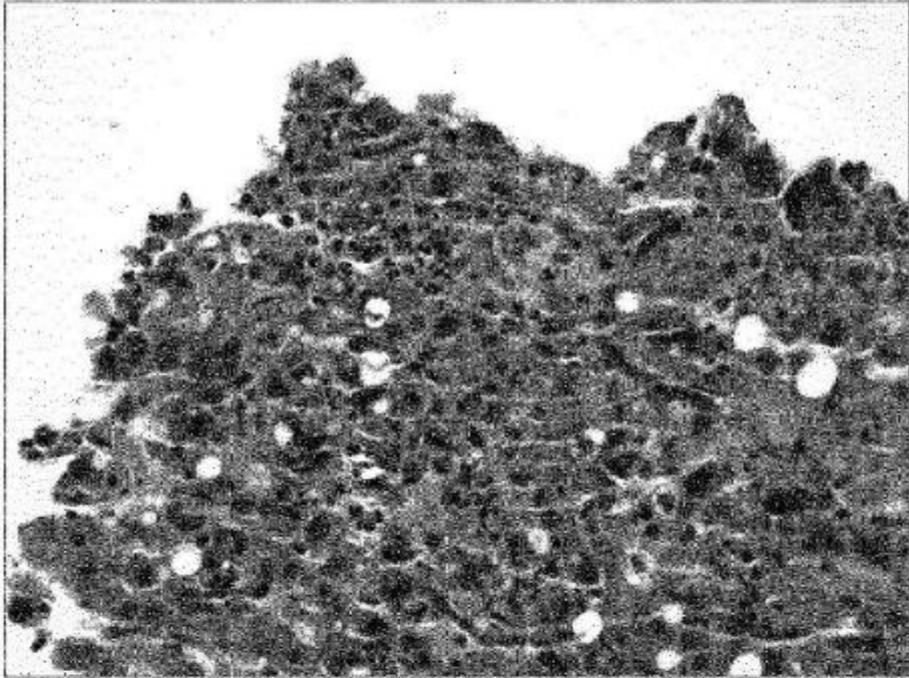


Fig. 23

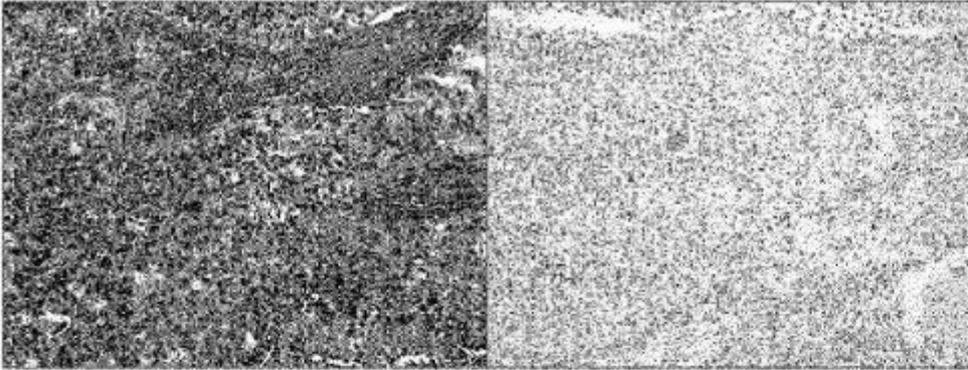


Fig. 24

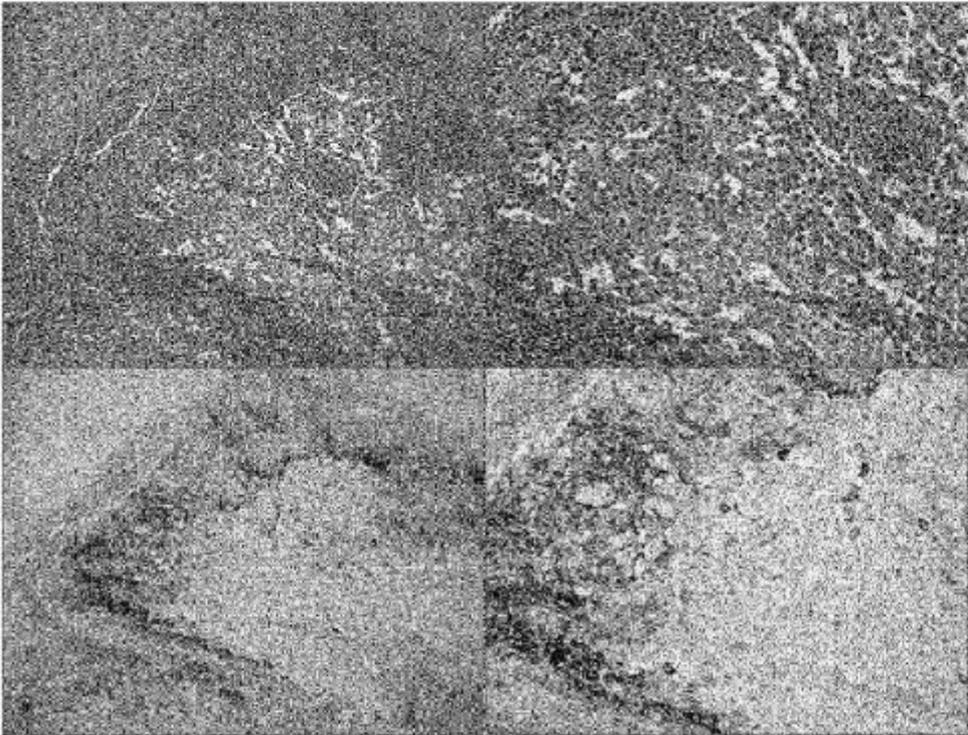


Fig. 25

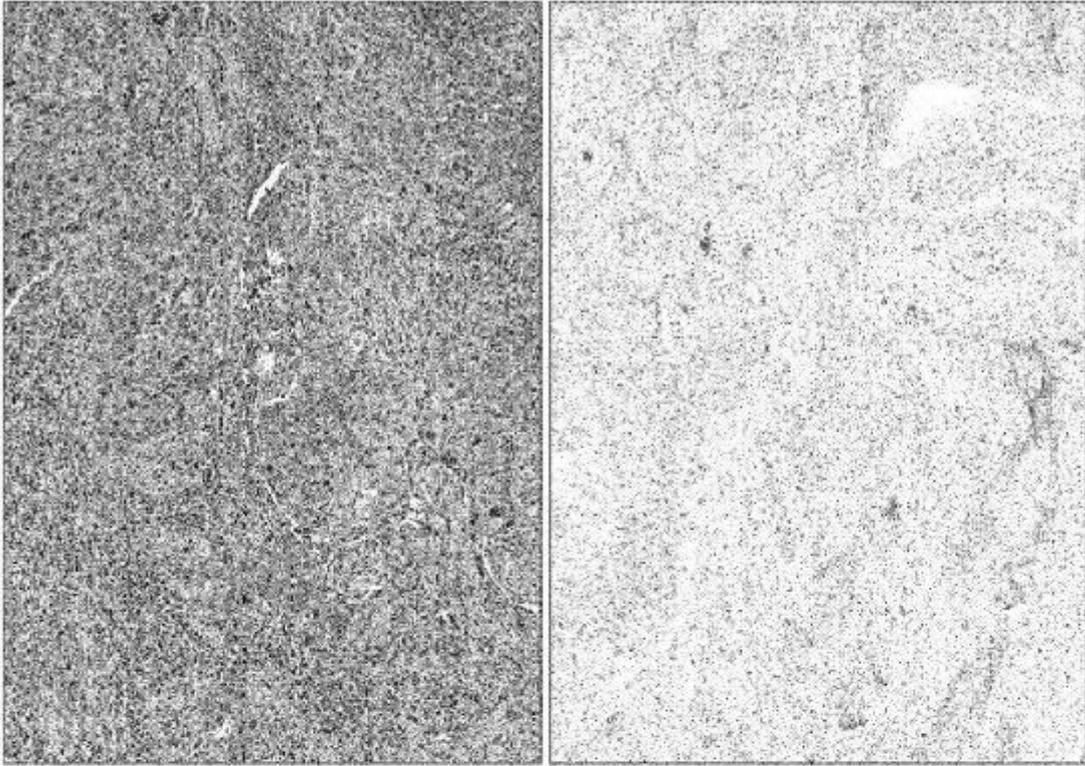


Fig. 27

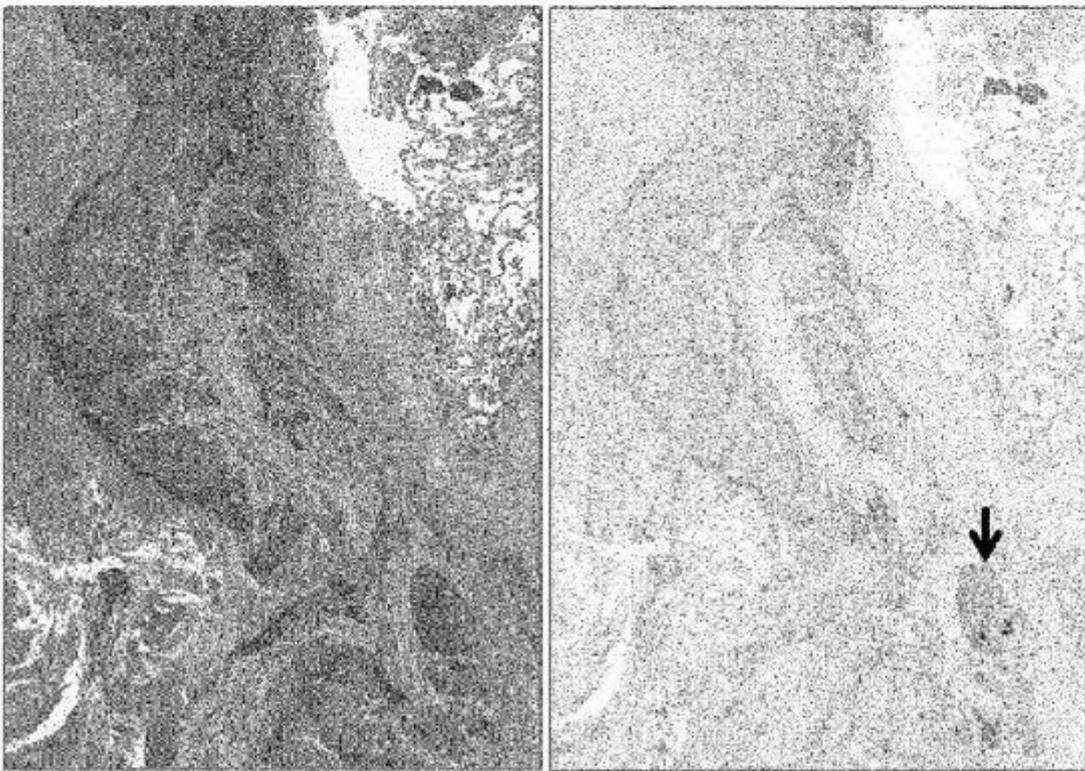


Fig. 26

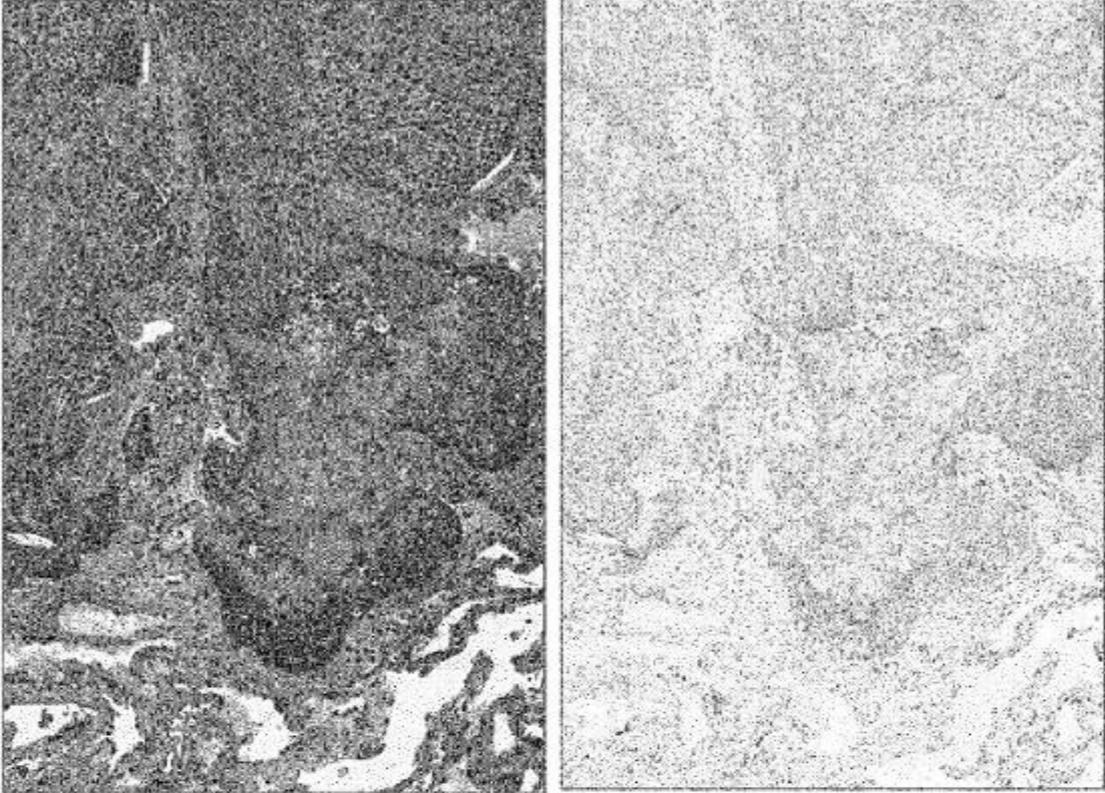


Fig. 29

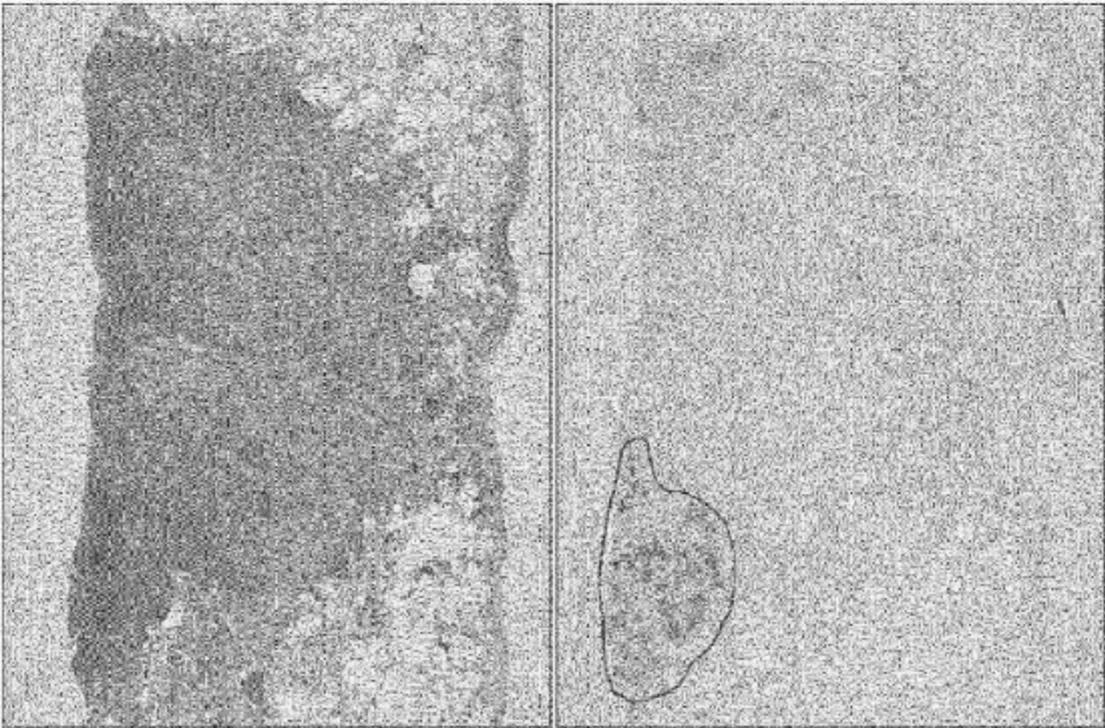


Fig. 28

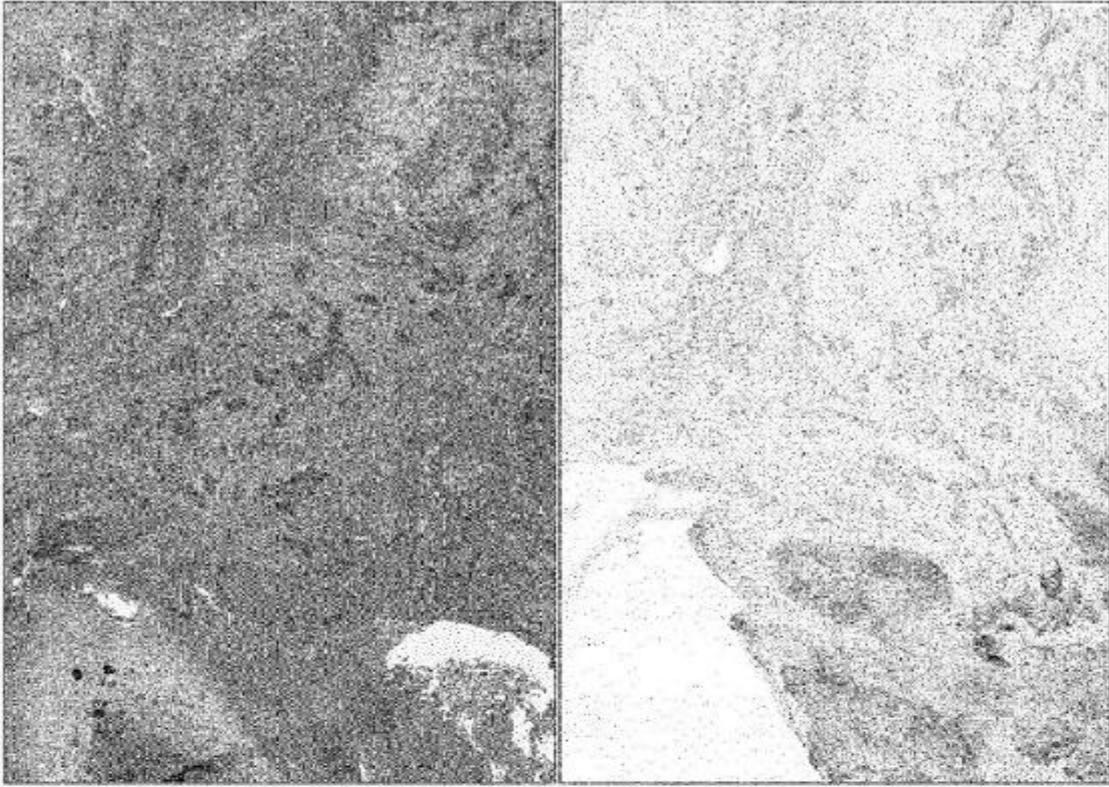


Fig. 31

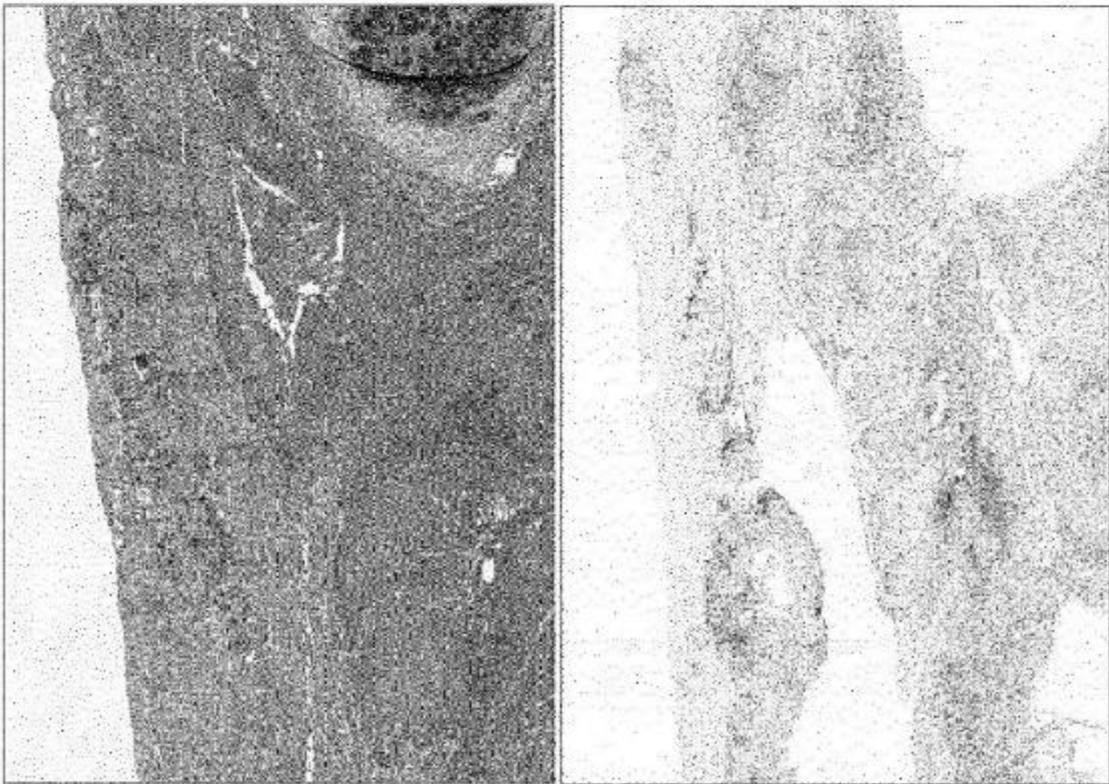


Fig. 30

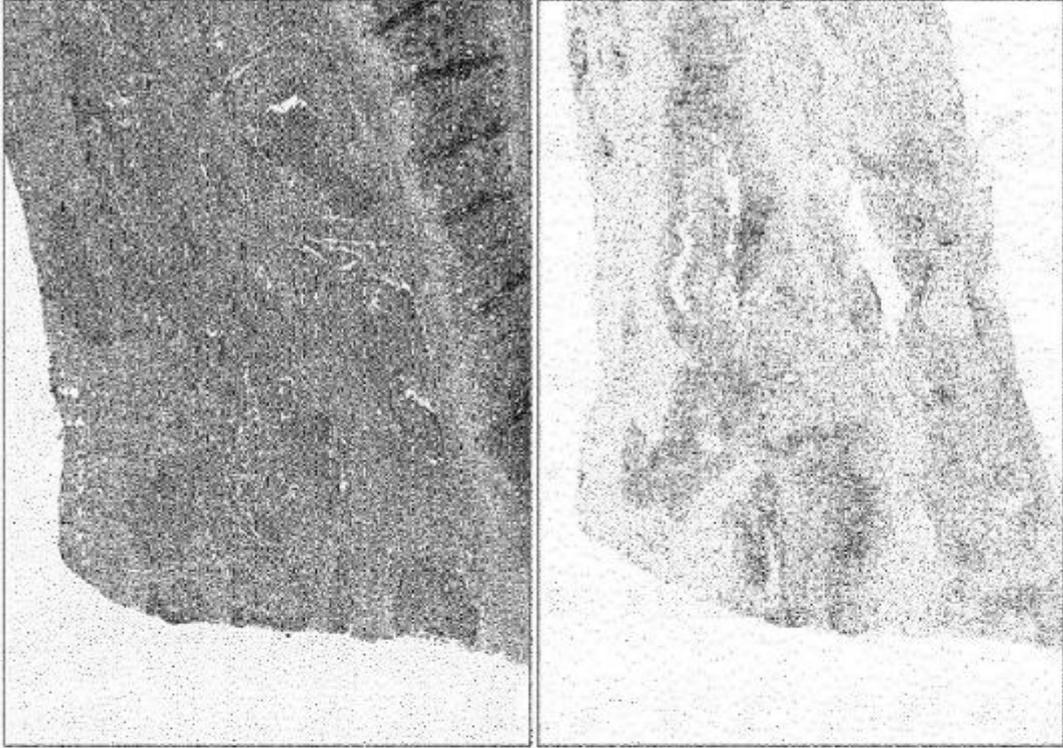


Fig. 33

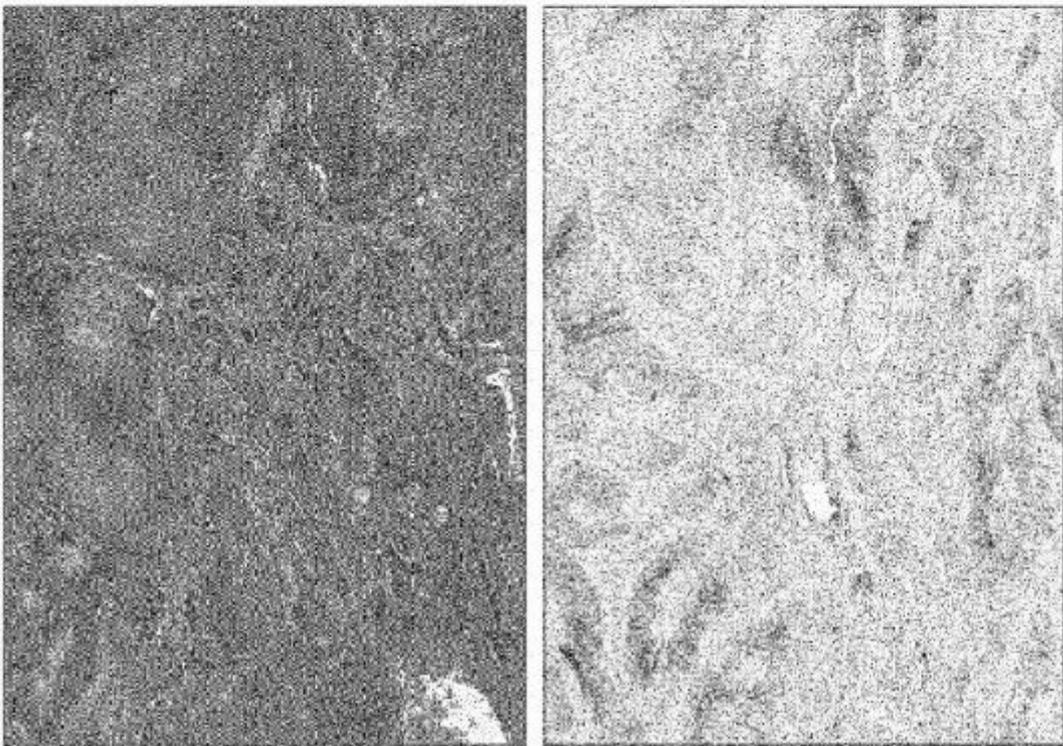


Fig. 32

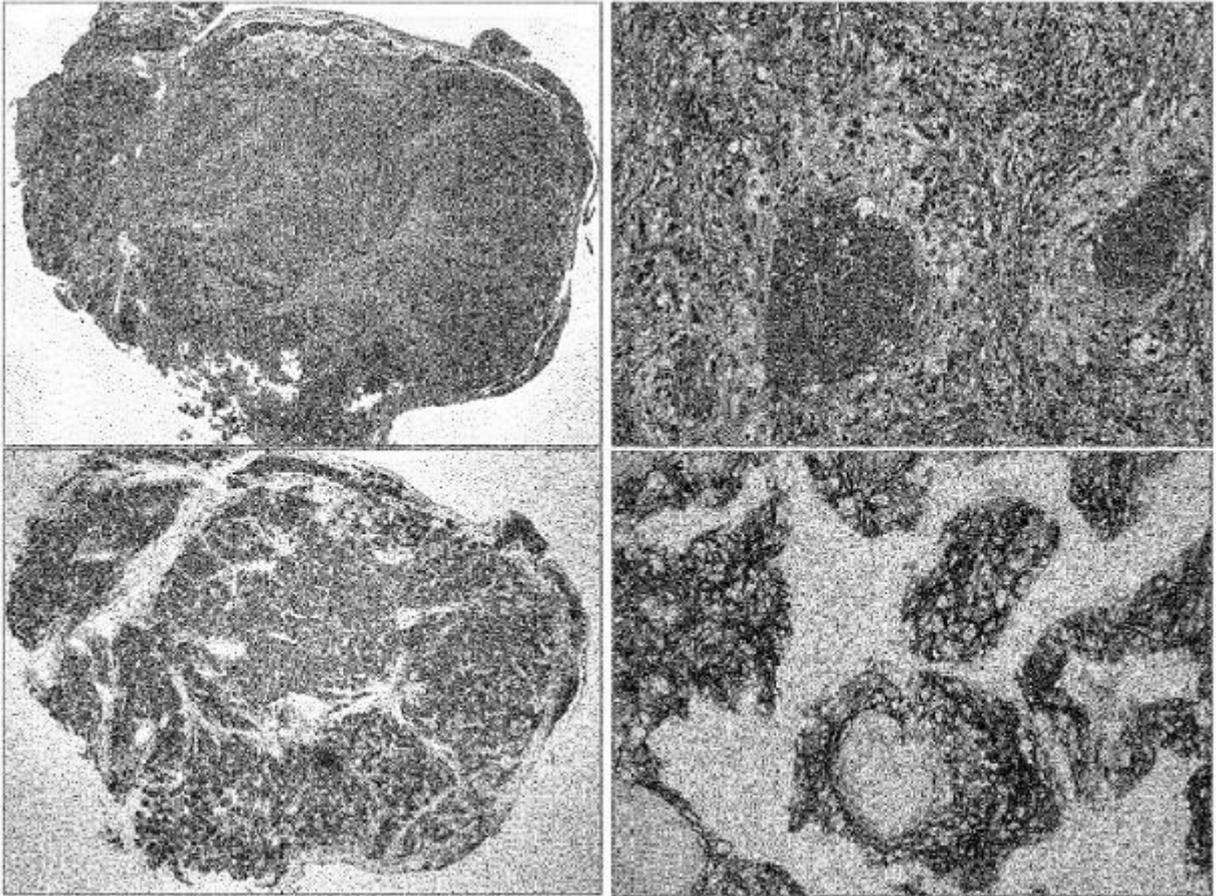


Fig. 34

Fig. 35

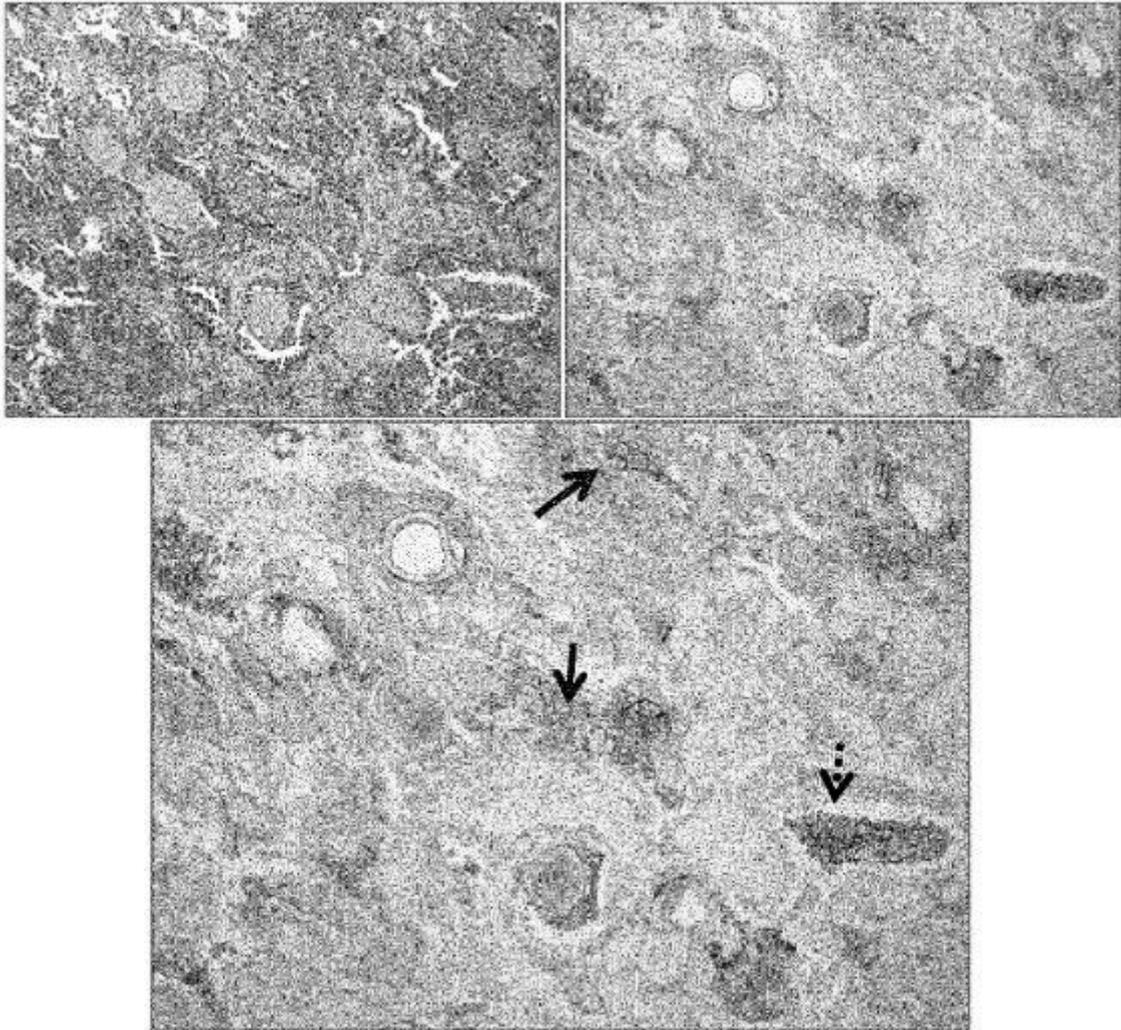


Fig. 36

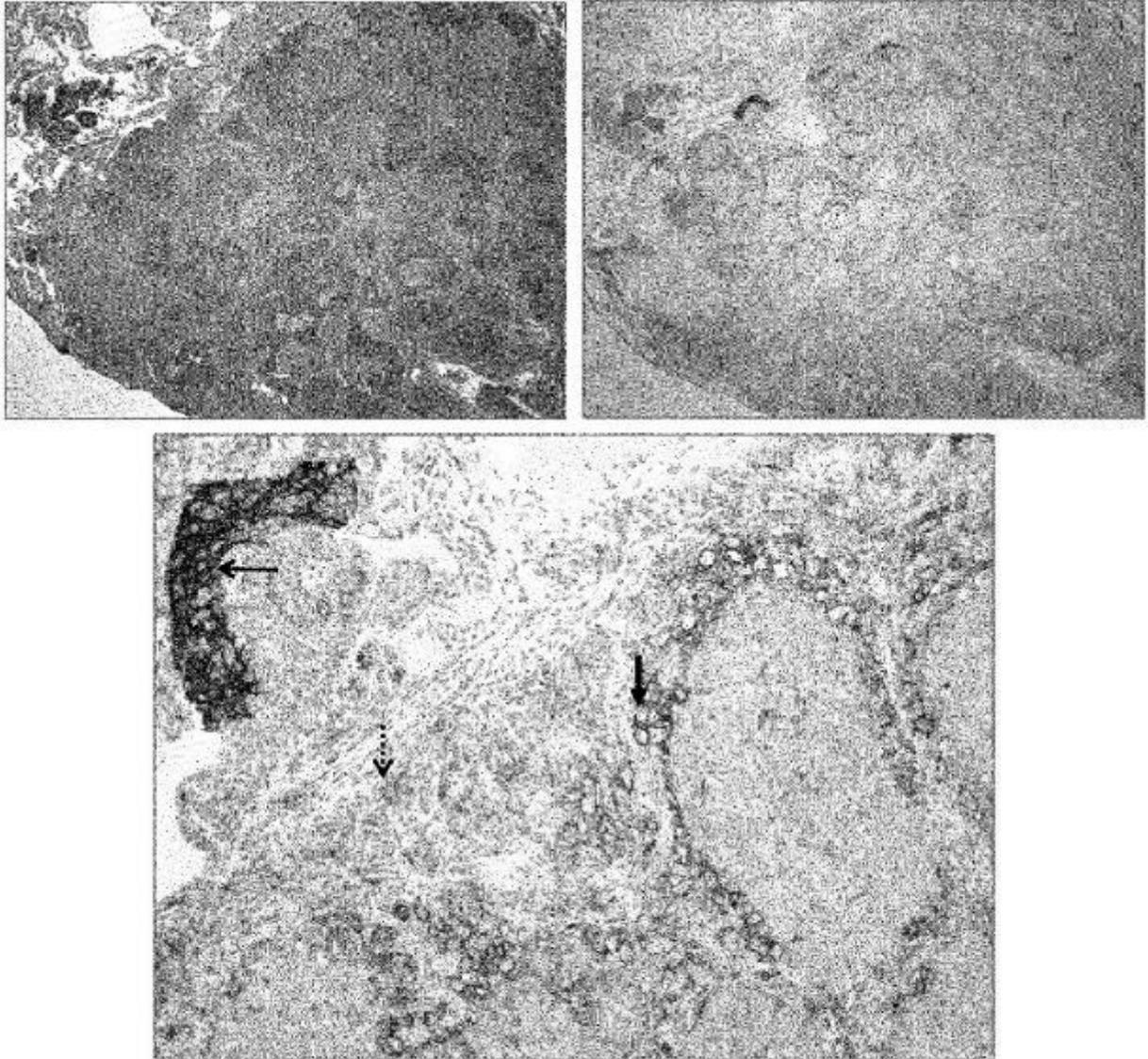


Fig. 37

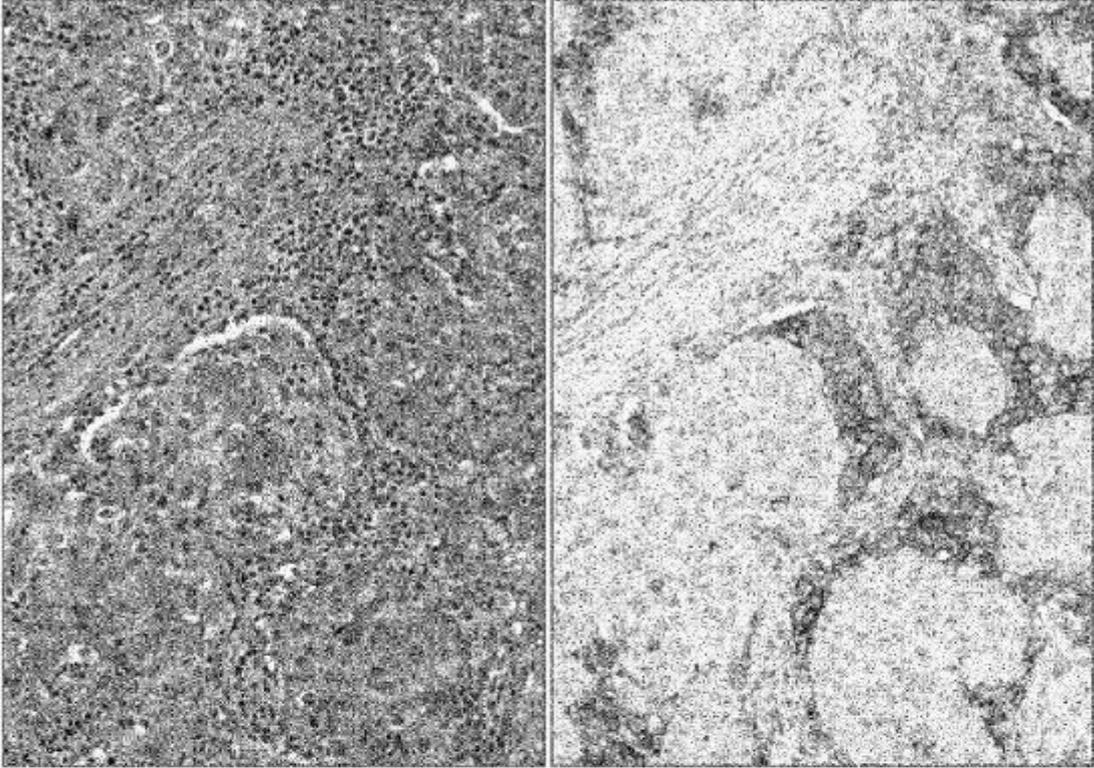


Fig. 39

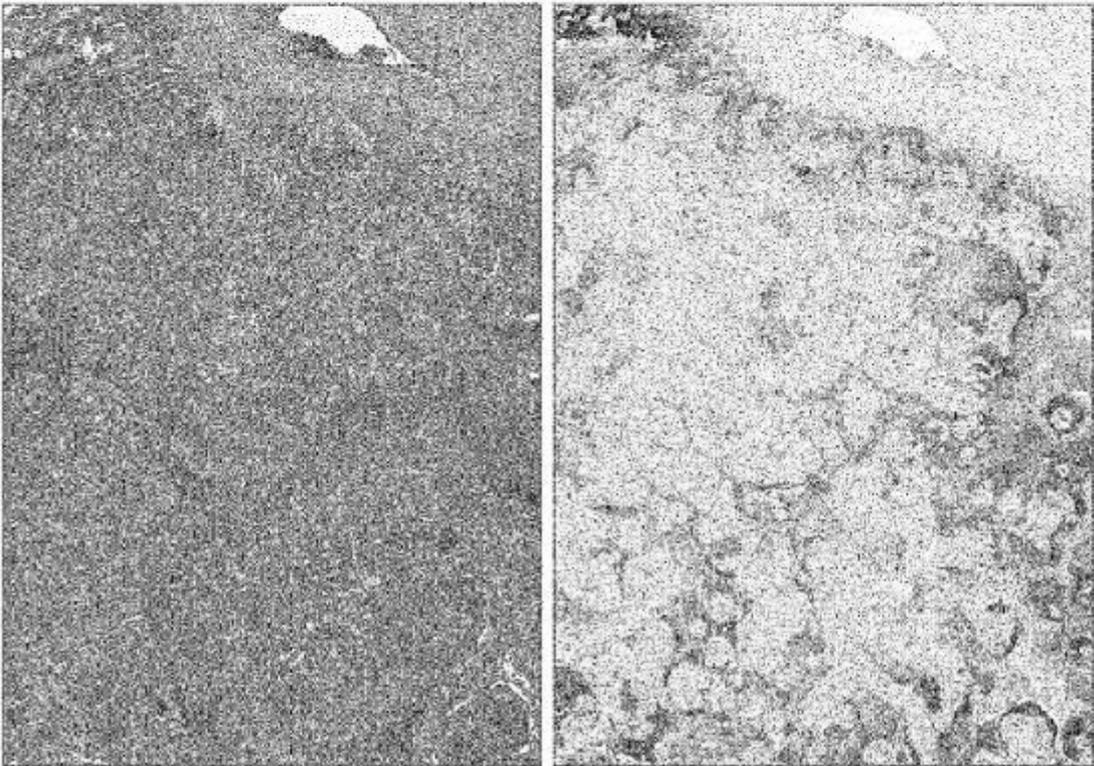


Fig. 38

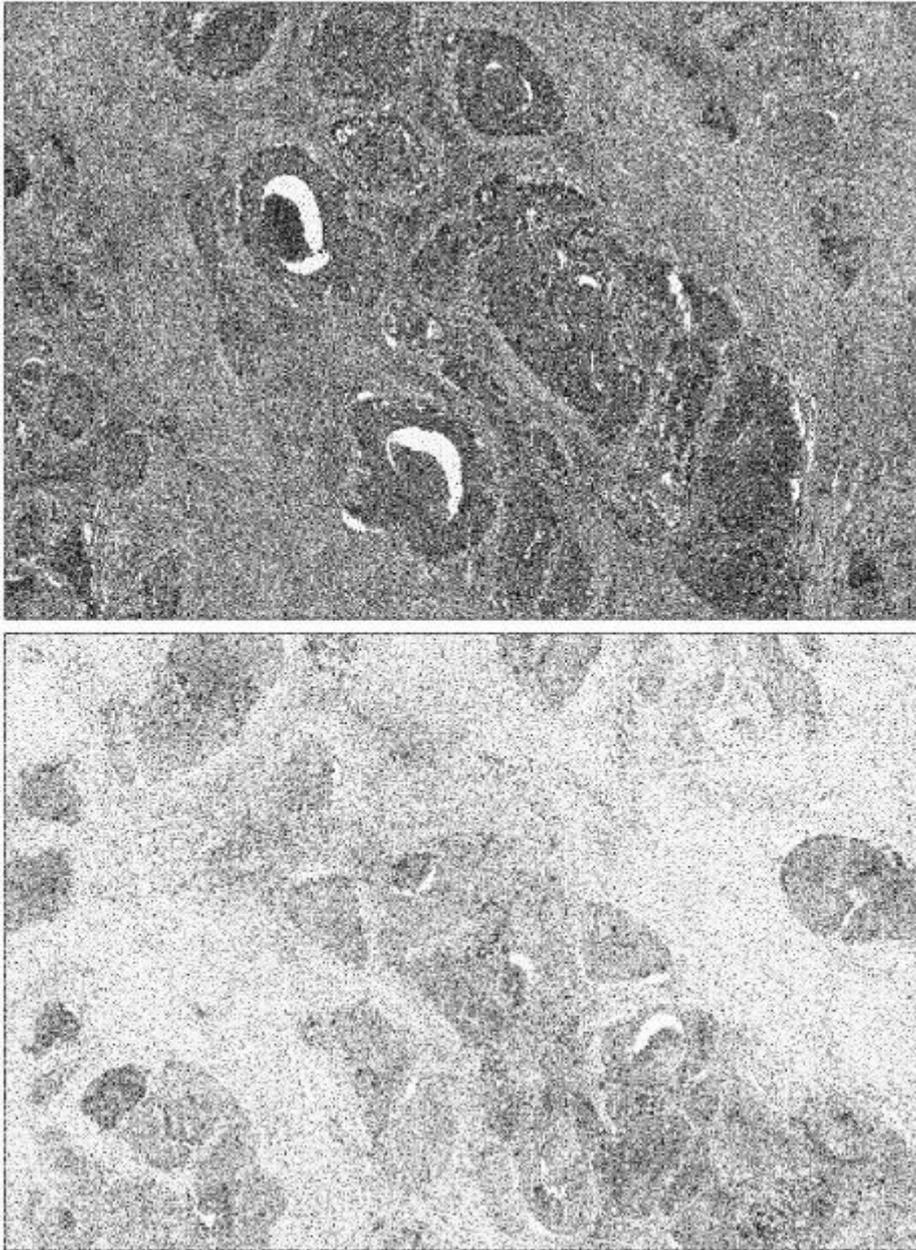


Fig. 40

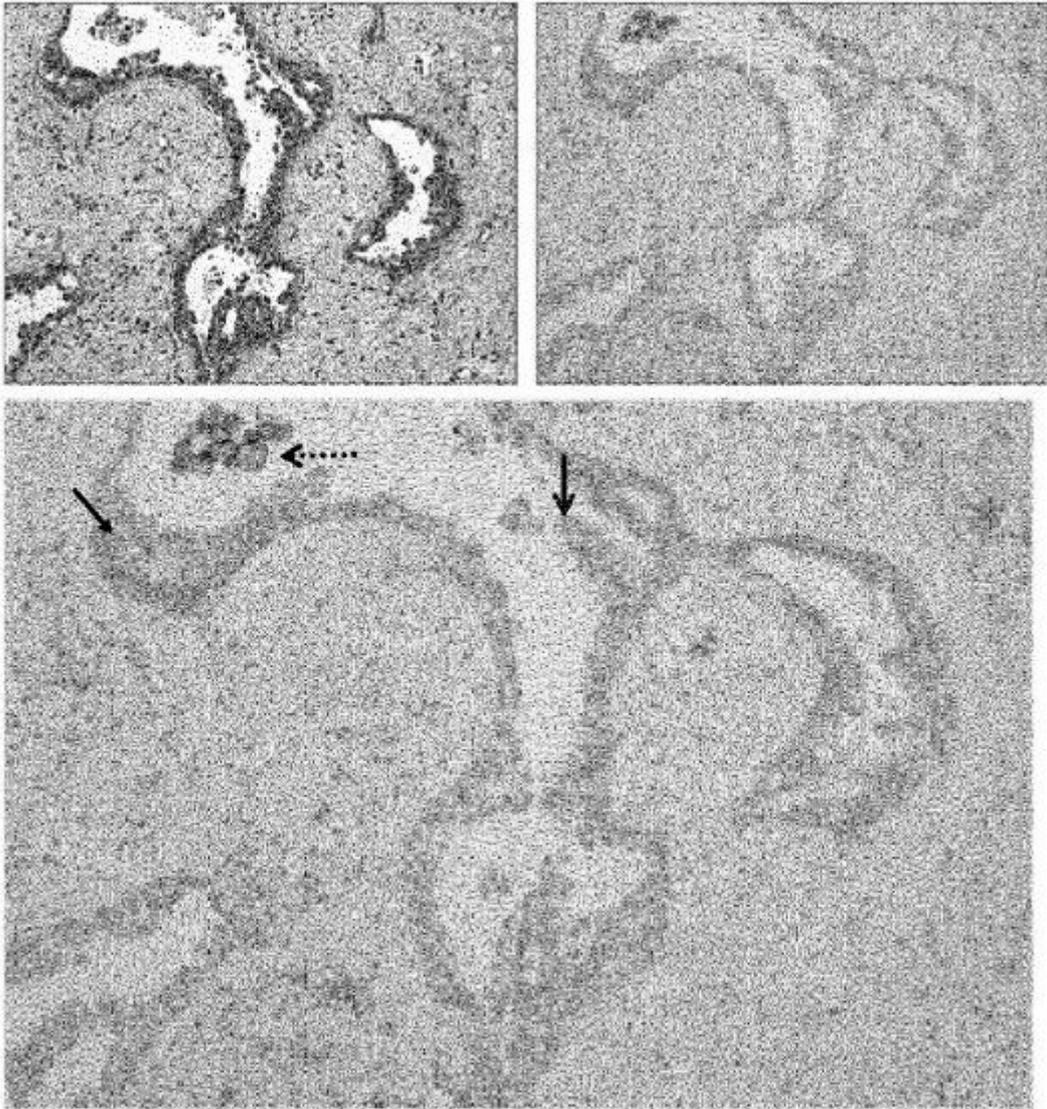


Fig. 41

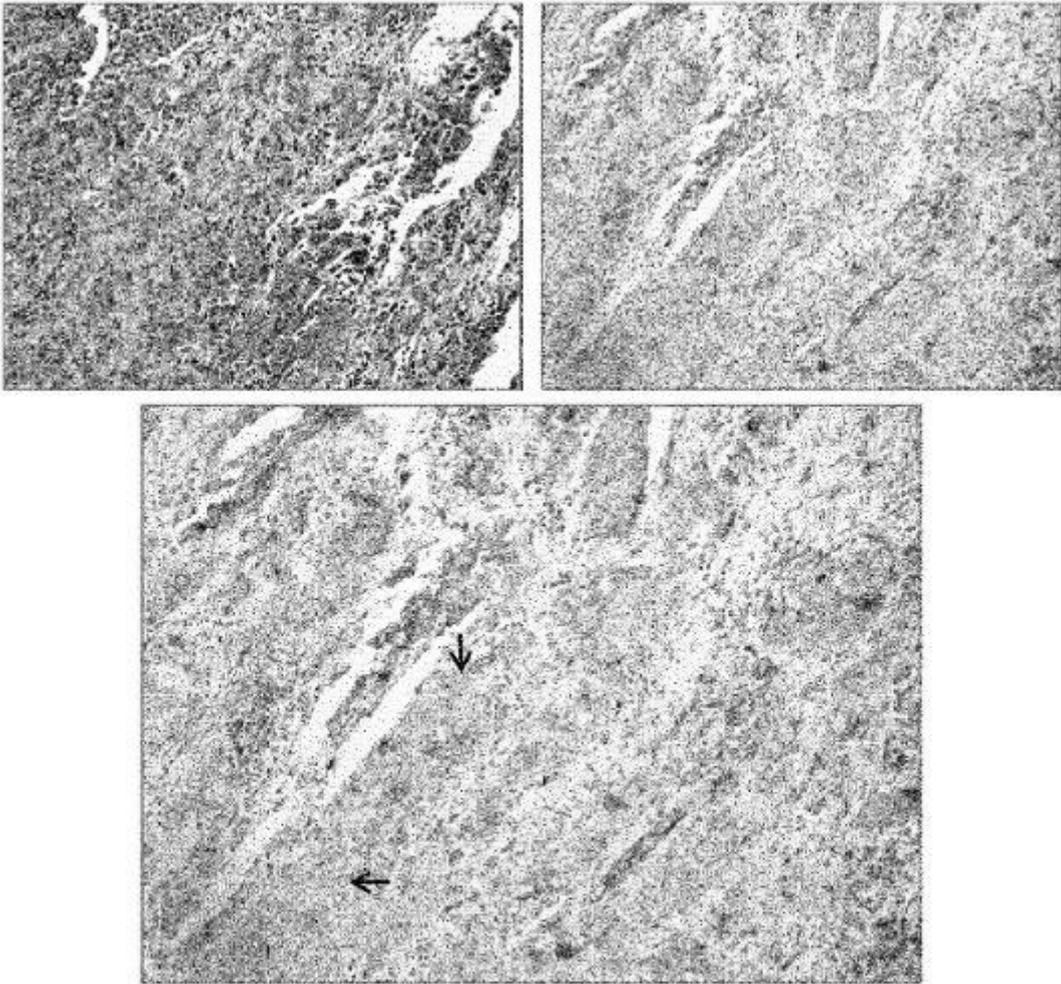


Fig. 42

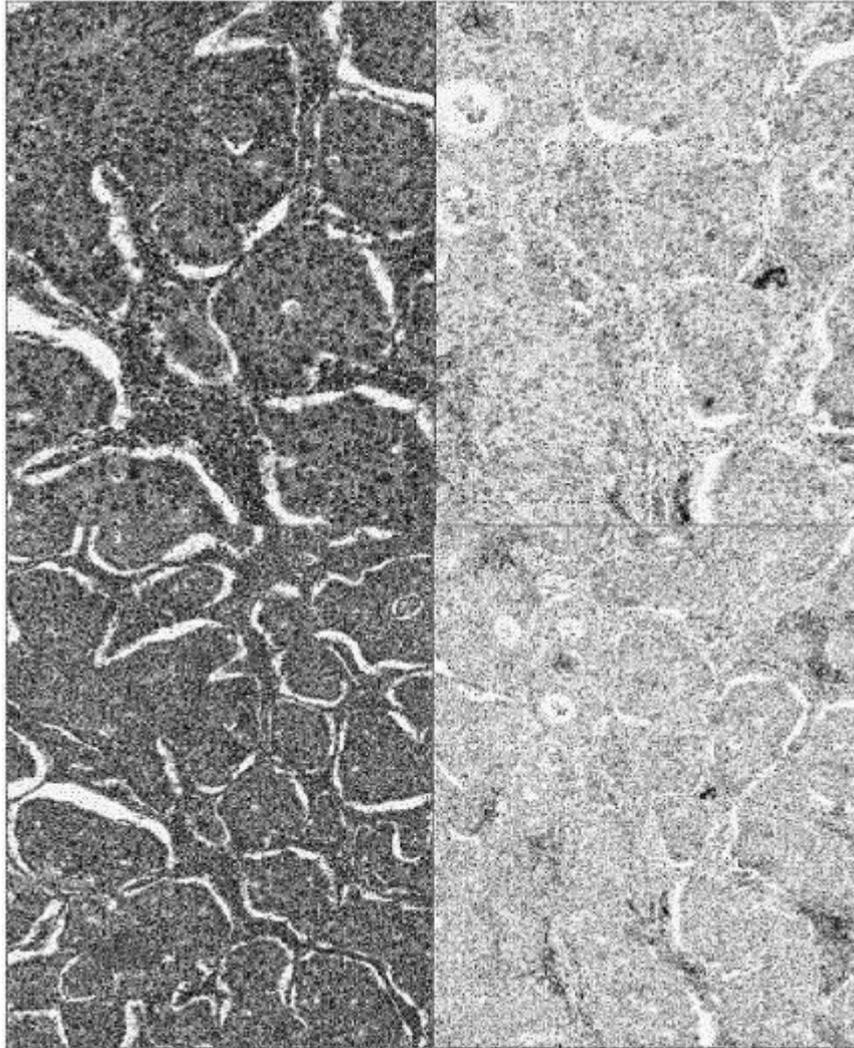


Fig. 44

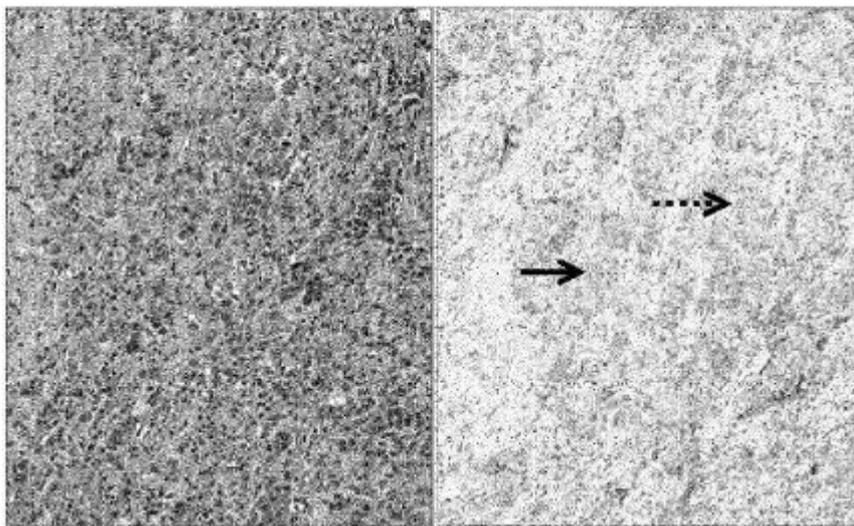


Fig. 43

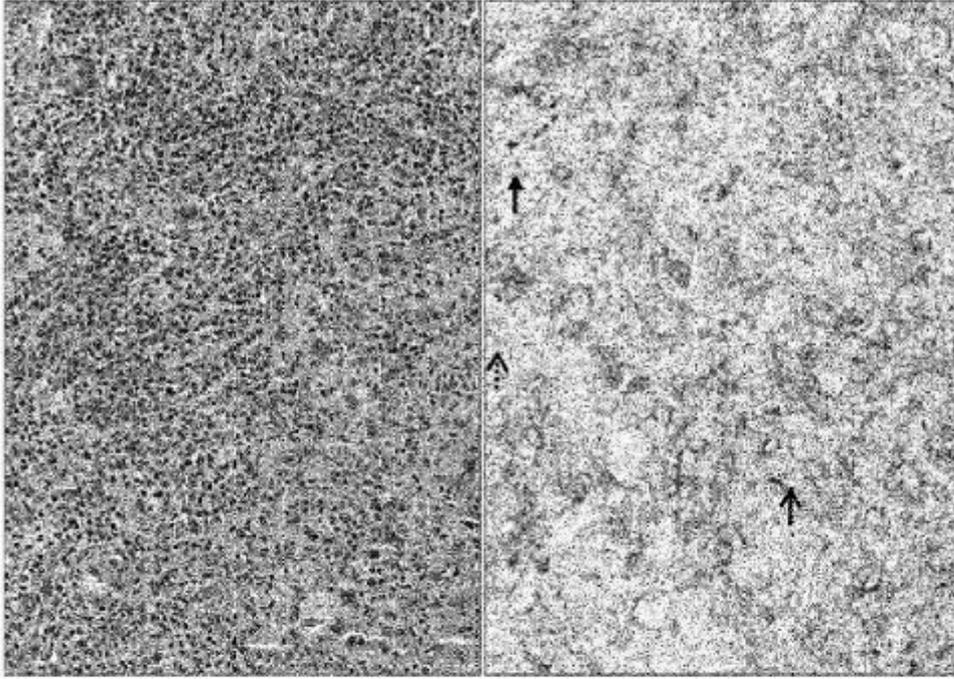


Fig. 46

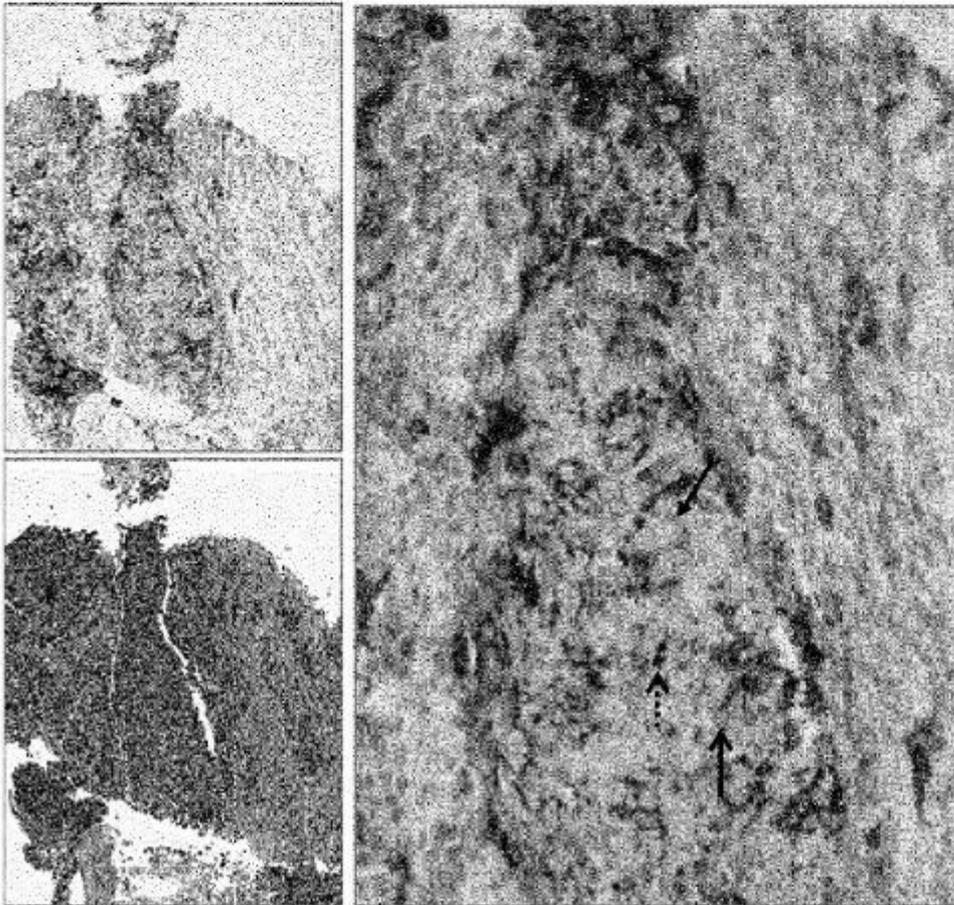


Fig. 45

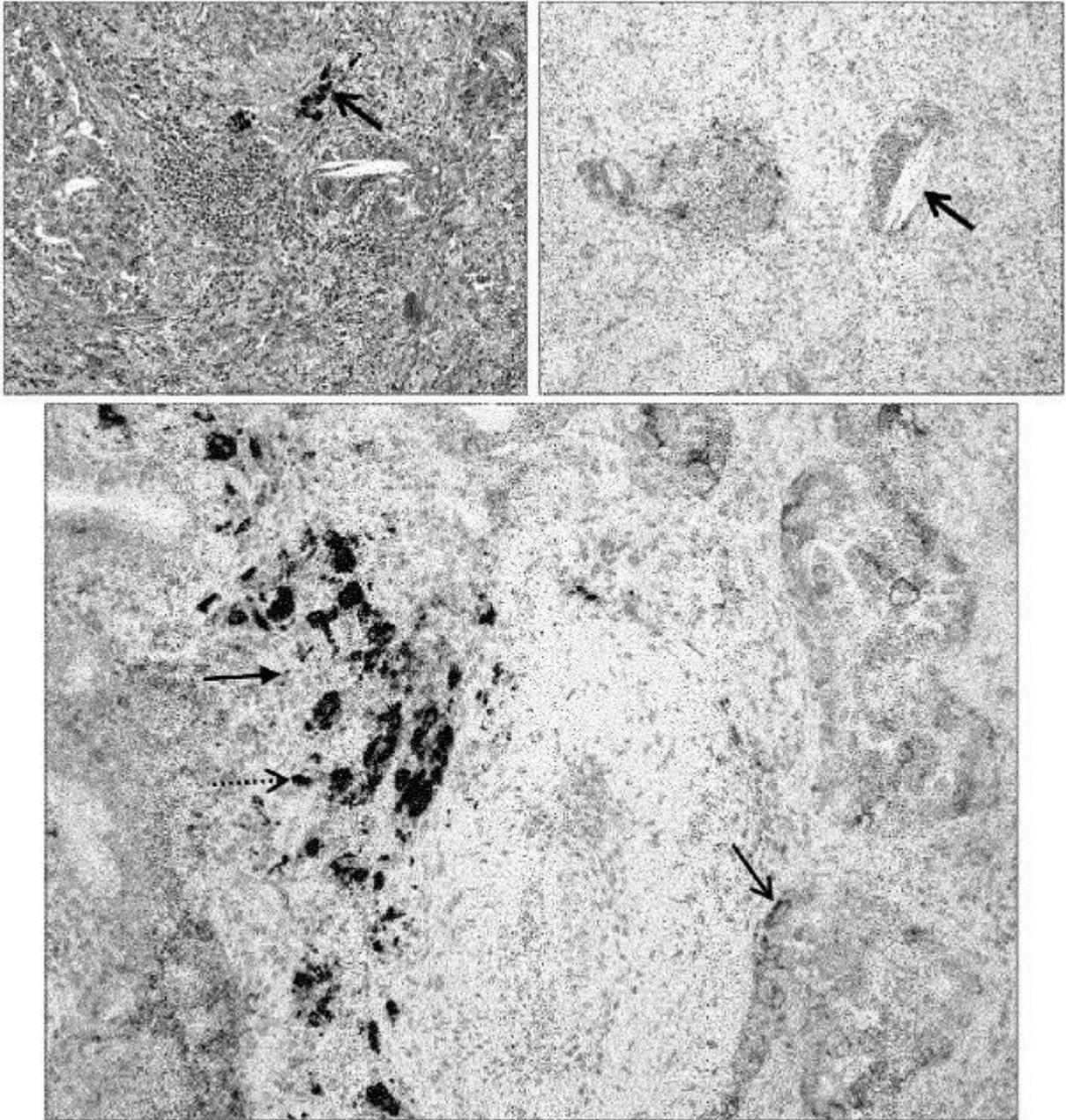


Fig. 47