

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 810 700**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2016 PCT/US2016/034856**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016 WO16196381**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2016 E 16728525 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 3303619**

54 Título: **Metilación del promotor de PD-L1 en cáncer**

30 Prioridad:

29.05.2015 US 201562168668 P

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

09.03.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KADEL, EDWARD;
KOWANETZ, MARCIN y
WALTER, KIMBERLY**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 810 700 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

Metilación del promotor de PD-L1 en cáncer

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a procedimientos de estratificación de pacientes con cáncer para el tratamiento con un anticuerpo anti-PD-L1 determinando el nivel de metilación en una región en dirección 5' de la región promotora de PD-L1 y/o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del PD-L1 en muestras que contienen células cancerosas de los

10 pacientes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 El PD-L1 se sobreexpresa en muchos tipos de cáncer y a menudo se asocia con un mal pronóstico (Okazaki T *et al.*, Intern. Immun. 2007 19(7):813) (Thompson RH *et al.*, Cancer Res 2006, 66(7):3381). De forma interesante, la mayoría de los linfocitos T infiltrantes de tumores expresan predominantemente PD-1, en contraste con los linfocitos T en tejidos normales y los linfocitos T de sangre periférica, lo que indica que la regulación por incremento de PD-1 en linfocitos T reactivos al tumor puede contribuir al deterioro de las respuestas inmunitarias antitumorales (Blood 2009 114(8): 1537). Esto se puede deber a la explotación de la señalización de PD-L1 mediada por células tumorales que

20 expresan PD-L1 que interactúan con los linfocitos T que expresan PD-1 para dar como resultado la atenuación de la activación de los linfocitos T y la evasión de la vigilancia inmunológica (Sharpe *et al.*, Nat Rev 2002) (Keir ME *et al.*, 2008 Annu. Rev. Immunol. 26:677). Por lo tanto, la inhibición de la interacción PD-L1/PD-1 puede potenciar la destrucción de tumores mediada por linfocitos T CD8+.

25 Se han descrito anticuerpos anti-PD-L1 y sus usos en el tratamiento de neoplasias malignas (véase, por ejemplo, Philips *et al.* (2015) *Int Immunol* 27, 39-461; Herbst *et al.* (2014) *Nature* 515, 563-567). Determinados pacientes tienen resistencia primaria a los inhibidores de punto de control inmunitario (véase, por ejemplo, Taube *et al.* (2012) *Sci Transl Med.* 4, 127; Sznol *et al.* (2014) *Clin Cancer Res.* 19.1021-34; y Gajewski *et al.* (2011) *Curr Opin Immunol.* 23: 286-92). Por tanto, sigue existiendo la necesidad de predecir la reactividad de los pacientes con cáncer al tratamiento con anticuerpos anti-PD-L1. El documento WO2014/151006 divulga un procedimiento para predecir si es probable que un sujeto con cáncer responda al tratamiento con un anticuerpo anti-PD-L1 midiendo el nivel de expresión del gen PD-L1. El documento WO2015/035112 divulga que es más probable que los pacientes con cáncer tratados con el agente desmetilante global AZA (es decir, 5-aza-2'-desoxicitidina) respondan al tratamiento posterior con un anticuerpo anti-PD-L1, que muestra que el tratamiento con AZA regula por incremento la transcripción de PD-L1 y los

35 niveles de proteína, y que la baja expresión de PD-L1 está asociada con la resistencia al tratamiento anti-PD-L1.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

40 En determinados modos de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto siempre que se haya encontrado que el sujeto tiene un nivel medio o bajo de metilación en la coordenada genómica hg19 chr9:5449887-5449891 y/o en uno o más sitios de CpG en la coordenada genómica hg19 chr9:5450934-5451072 en una muestra que contiene células cancerosas del sujeto, (i) en el que el nivel medio de metilación está entre aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 40 % de metilación y en el que el nivel bajo de metilación es menor de aproximadamente un 20 % de metilación, donde el nivel de metilación se determina por secuenciación con bisulfito, (ii) en el que el nivel medio de metilación está entre aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 60 % de metilación y en el que el nivel bajo de metilación es menor de aproximadamente un 5 % de metilación, donde la metilación se determina por secuenciación de próxima generación con bisulfito, o (iii) en el que el nivel medio de metilación es un valor beta de entre aproximadamente 0,2 a 0,3 y en el que el nivel bajo de metilación es un valor beta menor de aproximadamente 0,2, donde el nivel de metilación se determina usando una matriz de chip de metilación.

45 En determinados modos de realización, la invención proporciona un procedimiento para predecir si es probable que un sujeto con cáncer responda al tratamiento con un anticuerpo anti-PD-L1 que comprende medir el nivel de metilación en la coordenada genómica hg19 chr9:5449887-5449891 y/o en uno o más sitios de CpG en la coordenada genómica hg19 chr9: 5450934-5451072 en una muestra que contiene células cancerosas del sujeto, en el que el nivel medio o bajo de metilación en hg19 chr9:5449887-5449891 y/o hg19 chr9: 5450934-5451072 en la muestra indica que es probable que el sujeto responda al tratamiento, (i) en el que el nivel medio de metilación está entre aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 40 % de metilación y en el que el nivel bajo de metilación es menor de aproximadamente un 20 % de metilación, donde el nivel de metilación se determina por secuenciación con bisulfito, (ii) en el que el nivel medio de metilación está entre aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 60 % de metilación y en el que el nivel bajo de metilación es menor de aproximadamente un 5 % de metilación, donde la metilación se determina por secuenciación de próxima generación con bisulfito, o (iii) en el que el nivel medio de metilación es un valor beta de entre aproximadamente 0,2 a 0,3 y en el que el nivel bajo de metilación es un valor beta menor de aproximadamente 0,2, donde el nivel de metilación se determina usando una matriz de chip de metilación.

65 En algunos modos de realización de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de los modos de realización

anteriores, el sujeto tiene un nivel medio o bajo de metilación en CpG1 en la región promotora de PD-L1 y en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1. En algunos modos de realización de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de los modos de realización anteriores, el nivel de metilación se determina mediante secuenciación con bisulfito. En algunos modos de realización de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de los modos de realización anteriores, el nivel de metilación se determina mediante secuenciación de próxima generación con bisulfito. En algunos modos de realización de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de los modos de realización anteriores, el nivel de metilación se determina usando una matriz de chip de metilación. En algunos modos de realización de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de los modos de realización anteriores, la muestra del sujeto muestra pruebas de infiltración de células inmunitarias. En algunos modos de realización de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de los modos de realización anteriores, las pruebas de infiltración de células inmunitarias están indicadas por linfocitos CD8⁺ detectados por medio de inmunoelectrotransferencia, ELISA, citometría de flujo, qPCR, qRT-PCR, perfil de transcriptoma, análisis de micromatriz o secuenciación de próxima generación.

En algunos modos de realización de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de los modos de realización anteriores, un nivel medio de metilación como se determina por secuenciación con bisulfito está entre aproximadamente un 20 % y aproximadamente un 40 % de metilación. En algunos modos de realización de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de los modos de realización anteriores, un nivel bajo de metilación como se determina por secuenciación con bisulfito es menor de aproximadamente un 20 % de metilación.

En algunos modos de realización de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de los modos de realización anteriores, un nivel medio de metilación como se determina por secuenciación de próxima generación con bisulfito está entre aproximadamente un 5 % y aproximadamente un 60 % de metilación. En algunos modos de realización de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de los modos de realización anteriores, un nivel bajo de metilación como se determina por secuenciación de próxima generación con bisulfito es menor de aproximadamente un 5 % de metilación.

En algunos modos de realización de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de los modos de realización anteriores, un nivel medio de metilación como se determina por la matriz de chip de metilación es un valor beta entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 0,3. En algunos modos de realización de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de los modos de realización anteriores, un nivel bajo de metilación como se determina por la matriz de chip de metilación es un valor beta menor de aproximadamente 0,2.

En algunos modos de realización de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de los modos de realización anteriores, el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de vejiga o melanoma. En algunos modos de realización de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de los modos de realización anteriores, el cáncer es cáncer de pulmón, y en los que el cáncer de pulmón es un carcinoma de pulmón no microcítico, carcinoma de pulmón de células escamosas o adenocarcinoma de pulmón.

En algunos modos de realización de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de los modos de realización anteriores, el anticuerpo anti-PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1. En algunos modos de realización de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de los modos de realización anteriores, el anticuerpo anti-PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a B7-1. En algunos modos de realización de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de los modos de realización anteriores, el anticuerpo anti-PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 tanto a PD-1 como a B7-1. En algunos modos de realización de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de los modos de realización anteriores, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal. En algunos modos de realización de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de los modos de realización anteriores, el anticuerpo anti-PD-L1 es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en fragmentos Fab, Fab'-SH, Fv, scFv y (Fab')₂. En algunos modos de realización de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de los modos de realización anteriores, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. En algunos modos de realización de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de los modos de realización anteriores, el anticuerpo anti-PD-L1 se selecciona del grupo que consiste en: YW243.55.S70, MPDL3280A, MDX-1105 y MED14736. En algunos modos de realización de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de los modos de realización anteriores, el anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de HVR-H1 de SEQ ID NO: 15, la secuencia de HVR-H2 de SEQ ID NO: 16 y la secuencia de HVR-H3 de SEQ ID NO: 3; y una cadena ligera que comprende la secuencia de HVR-L1 de SEQ ID NO: 17, la secuencia de HVR-L2 de SEQ ID NO: 18 y la secuencia de HVR-L3 de SEQ ID NO: 19. En algunos modos de realización de acuerdo con (o como se aplica a) cualquiera de los modos de realización anteriores, el anticuerpo anti-PD-L1 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y la región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.

En algunos modos de realización, la divulgación proporciona un artículo de fabricación que comprende, envasados conjuntamente, una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-PD-L1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable y un marcador que indica que el anticuerpo anti-PD-L1 o la composición farmacéutica está indicado para tratar sujetos con cáncer que tienen un nivel medio o bajo de metilación en CpG1 en la región promotora de PD-L1 y/o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 en una muestra que contiene células cancerosas del sujeto.

En algunos modos de realización, la invención proporciona el uso de un kit que comprende reactivos para medir el nivel de metilación en la coordenada genómica hg19 chr9: 5449887-544989 y/o en uno o más sitios de CpG en la coordenada genómica hg19 chr9: 5450934-5451072 en una muestra que contiene células cancerosas del sujeto.

- 5 Breve descripción de los dibujos
- La **FIG. 1** muestra niveles de expresión de PD-L1 y mapas de calor de metilación del promotor de PD-L1 para 91 líneas celulares de carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC).
- 10 La **FIG. 2A** muestra los resultados de un análisis que correlaciona la expresión de ARN de PD-L1 y la metilación del promotor de PD-L1 en una colección de tumores de adenocarcinoma de pulmón del Atlas del genoma del cáncer.
- 15 La **FIG. 2B** muestra los resultados de un análisis que correlaciona la expresión de ARN de PD-L1 y la metilación del promotor de PD-L1 en una colección de tumores de carcinoma de pulmón de células escamosas del Atlas del genoma del cáncer.
- 20 La **FIG. 2C** muestra los resultados de un análisis que correlaciona la expresión de ARN de PD-L1 y la metilación del promotor de PD-L1 en una colección de tumores de cáncer de mama del Atlas del genoma del cáncer.
- La **FIG. 2D** muestra los resultados de un análisis que correlaciona la expresión de ARN de PD-L1 y la metilación del promotor de PD-L1 en una colección de tumores de carcinoma de piel del Atlas del genoma del cáncer.
- 25 La **FIG. 3** muestra los resultados de experimentos realizados para evaluar los efectos del tratamiento con 5aza-dC, TSA, IFNg o 5aza-dC + TSA + IFNg sobre la expresión de ARN de PD-L1 en 5 líneas celulares de cáncer de pulmón (es decir, H661, LXFL529, A427, H2073, H322T y H1993).
- 30 La **FIG. 4A** muestra los resultados de experimentos realizados para evaluar el efecto del tratamiento con IFNg sobre la expresión de ARN y proteína PD-L1 en cuatro líneas celulares diferentes de cáncer de pulmón (A427, H292, H322T y H358).
- La **FIG. 4B** muestra los resultados de experimentos realizados para determinar el efecto del tratamiento con IFNg de 30 minutos y el tratamiento con IFNg de 24 horas en la vía de señalización de IFNg/JAK/STAT en las líneas celulares A427, H292, H322T y H358.
- 35 La **FIG. 4C** muestra los resultados de experimentos realizados para determinar los efectos del tratamiento con IFNg y/o la atenuación de STAT1 y STAT3 sobre la expresión de STAT1, STAT3 y PD-L1 en A427 y H358.
- 40 La **FIG. 5A** muestra una superposición de datos de secuenciación con bisulfito en mapas de posibles sitios de metilación de CpG para subconjuntos de células mononucleares de sangre periférica.
- La **FIG. 5B** muestra una superposición de datos de secuenciación con bisulfito en mapas de posibles sitios de metilación de CpG para líneas celulares de pulmón normales inmortalizadas y líneas celulares de cáncer de pulmón de NSCLC que tienen niveles de metilación altos, medios o bajos en la región promotora de PD-L1.
- 45 La **FIG. 6A** muestra una curva de dispersión que se creó a partir del Proyecto del genoma del cáncer (CGP) de líneas celulares de NSCLC que compara directamente la metilación suavizada de CpG1 y CpG5 (valor M) en el eje X y la expresión de PD-L1 (sec-ARN, recuento log2) en el eje Y.
- 50 La **FIG. 6B** muestra los resultados de los análisis ANOVA realizados para determinar la relevancia estadística de los 3 grupos de niveles de metilación (es decir, "bajo", "medio" y "alto") en los que se clasificaron las líneas celulares de NSCLC de la FIG. 6A.
- La **FIG. 6C** muestra los resultados de los análisis ANOVA que se realizaron para determinar la relevancia estadística del efecto del tratamiento con 5aza-dC sobre la expresión de ARN de PD-L1 en las líneas celulares de NSCLC de la **FIG. 6A**.
- 55 La **FIG. 6D** muestra los resultados de experimentos que se realizaron para determinar el efecto del tratamiento con 5aza-dC sobre la expresión de ARN de PD-L1 en las líneas celulares de NSCLC enlazadas H1993 y H2073.
- 60 La **FIG. 7A** muestra los resultados de los análisis ANOVA realizados para determinar la relevancia estadística de la relación entre la infiltración de linfocitos T, la metilación en CpG5 (mut7) y niveles de proteína PD-L1 en líneas celulares de NSCLC.
- 65 La **FIG. 7B** muestra los resultados de los análisis ANOVA realizados para determinar la relevancia estadística de la relación entre la infiltración de linfocitos T, la metilación en CpG5 (mut7) y niveles de transcrito de PD-L1 en líneas

celulares de NSCLC.

La **FIG. 8** proporciona archivos .bed que se muestran en el IgV Integrated Genomics Viewer (Broad Institute). Los archivos .bed proporcionan los resultados de los experimentos ChIP-Seq realizados para determinar si STAT1 y/o STAT3 se unen a la región promotora de PD-L1 en las líneas celulares A427 y H358.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

I. Técnicas generales

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

II. Definiciones

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

Como se usa en el presente documento, "en base a" incluye (1) evaluar, determinar o medir las características del paciente como se describe en el presente documento (y preferentemente seleccionar un paciente adecuado para recibir tratamiento; y (2) administrar el/los tratamiento(s) como se describe en el presente documento.

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

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

Una "cantidad eficaz" es al menos la cantidad mínima requerida para conseguir una mejora o prevención medibles de un trastorno particular. Una cantidad eficaz en el presente documento puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del paciente, y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del tratamiento se compensa con los efectos terapéuticamente beneficiosos. Para uso profiláctico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados tales como eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retrasar la aparición de la enfermedad, incluyendo los síntomas bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Para uso terapéutico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados clínicos tales como la

disminución de uno o más síntomas que resultan de la enfermedad, el incremento de la calidad de vida de los que padecen la enfermedad, la disminución de la dosis de otros medicamentos requeridos para tratar la enfermedad, la potenciación del efecto de otro medicamento, tal como por medio de la selección como diana, el retraso de la progresión de la enfermedad y/o la prolongación de la supervivencia. En el caso de cáncer o tumor, una cantidad eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y de forma deseable detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y de forma deseable detener) la metástasis tumoral; inhibir en cierta medida el crecimiento tumoral; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. Se puede administrar una cantidad eficaz en una o más administraciones. Para los propósitos de la presente invención, una cantidad eficaz de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para conseguir un tratamiento profiláctico o terapéutico directa o indirectamente. Como se entiende en el contexto clínico, una cantidad eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica se puede lograr o no junto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por tanto, se puede considerar una "cantidad eficaz" en el contexto de la administración de uno o más agentes terapéuticos, y se puede considerar que un único agente se administre en una cantidad eficaz si, junto con uno o más de otros agentes, se puede lograr o se logra un resultado deseable.

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

"Tumor", como se usa en el presente documento, se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sea maligno o benigno, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos "cáncer", "canceroso", "trastorno proliferativo celular", "trastorno proliferativo" y "tumor" no son mutuamente excluyentes como se hace referencia en el presente documento.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección fisiológica en los mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, leucemia o una neoplasia maligna linfática, cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago (tal como cáncer gastrointestinal y cáncer gastrointestinal del estroma), cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de las vías urinarias, hepatoma, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal (CRC), carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peniano, mieloma múltiple y linfoma de linfocitos B (tal como linfoma no hodgkiniano (LNH) folicular/de grado bajo, LNH linfocítico pequeño (LP), LNH folicular/de grado intermedio, LNH difuso de grado intermedio, LNH inmunoblástico de grado alto, LNH linfoblástico de grado alto, LNH de células pequeñas no escindidas de grado alto, LNH voluminoso, linfoma de células de manto, linfoma relacionado con el sida, y macroglobulinemia de Waldenstrom), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia de células pilosas, leucemia mieloblástica crónica y trastorno linfoproliferativo postrasplante (TLPT), así como proliferación vascular anómala asociada con facomatosis, edema (tal como el asociado con tumores cerebrales), el síndrome de Meigs, cáncer cerebral, así como cáncer de cabeza y cuello, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma de Kaposi, carcinoma carcinoide y mesotelioma, glioblastoma, neuroblastomas y metástasis asociadas. Otros ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama (tal como carcinoma de mama), cáncer de pulmón (tal como carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma de células escamosas del pulmón) y cáncer de piel (tal como melanoma, melanoma de propagación superficial, melanoma lentigo maligno, melanomas lentiginosos acrales, melanomas nodulares y carcinoma de piel), incluyendo formas metastásicas de esos cánceres.

"Muestra", como se usa en el presente documento, se refiere a una composición que se obtiene o deriva de un sujeto de interés que contiene una entidad celular y/u otra entidad molecular que se debe caracterizar y/o identificar, por ejemplo, en base a características físicas, bioquímicas, químicas y/o fisiológicas. Por ejemplo, la expresión "muestra de enfermedad" y variaciones de la misma se refiere a cualquier muestra obtenida de un sujeto de interés que se esperaría o se sabe que contiene la entidad celular y/o molecular que se va a caracterizar. Una muestra puede ser una muestra biológica (tal como una muestra biológica *ex vivo*) de tejido o líquido biológico que contiene células cancerosas y/o células tumorales del sujeto del que se pueden aislar ácidos nucleicos (tales como polinucleótidos, por ejemplo, ADN genómico y/o transcritos) y/o polipéptidos. Dichas muestras son típicamente de un sujeto humano, pero incluyen tejidos aislados de otros sujetos (como cualquier animal clasificado como mamífero, como se describe en otra parte del presente documento). Las muestras también pueden incluir secciones de tejidos tales como muestras de biopsias y autopsias, secciones congeladas tomadas con propósitos histológicos. Las muestras pueden incluir muestras recién extraídas del sujeto o muestras de tejido conservadas, tales como muestras incluidas en parafina fijadas con formol (FFPE). Las muestras también incluyen explantes y cultivos celulares primarios y/o transformados derivados de tejidos de pacientes.

Por "muestra tisular o celular" se entiende una colección de células similares obtenidas de un tejido de un sujeto o paciente. La fuente del tejido o la muestra celular puede ser un tejido sólido como de una muestra o biopsia o aspirado de órgano o tejido recién extraído, congelado y/o conservado; sangre o cualquier componente de la sangre; líquidos

corporales tales como el líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, líquido peritoneal o líquido intersticial; células de cualquier época en gestación o desarrollo del sujeto. La muestra tisular también puede ser líneas celulares o células primarias o cultivadas. Opcionalmente, la muestra tisular o celular se obtiene de un tejido/órgano de enfermedad. La muestra tisular puede contener compuestos que no se mezclen de forma natural con el tejido en la naturaleza, tales como conservantes, anticoagulantes, tampones, fijadores, nutrientes, antibióticos o similares.

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

El "agente quimioterápico" se refiere a un compuesto útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen erlotinib (TARCEVA[®], Genentech/OSI Pharm.), bortezomib (VELCADE[®], Millennium Pharm.), disulfiram, galato de epigalocatequina, salinosporamida A, carfilzomib, 17-AAG (geldanamicina), radicol, lactato dehidrogenasa A (LDH-A), fulvestrant (FASLODEX[®], AstraZeneca), sunitib (SUTENT[®], Pfizer/Sugen), letrozol (FEMARA[®], Novartis), mesilato de imatinib (GLEEVEC[®], Novartis), finasunato (VATALANIB[®], Novartis), oxaliplatino (ELOXATIN[®], Sanofi), 5-FU (5-fluorouracilo), ácido folínico, rapamicina (sirólimus, RAPAMUNE[®], Wyeth), lapatinib (TYKERB[®], GSK572016, Glaxo Smith Kline), lonafamib (SCH 66336), sorafenib (NEXAVAR[®] Bayer Labs), gefitinib (IRESSA[®], AstraZeneca), AG1478, agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida CYTOXAN[®]; alquil sulfonatos tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, incluyendo alretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo topotecán e irinotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (en particular criptoficina 1 y criptoficina 8); corticoesteroides (incluyendo prednisona y prednisolona); acetato de ciproterona; 5 α -reductasas incluyendo finasterida y dutasterida; vorinostat, romidepsina, panobinostat, ácido valproico, mocetinostat dolastatina; aldesleucina, talco duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcocistina; espongiatina; mostazas nitrogenadas tales como cloramibucilo, cloramafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, uramustina; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina γ 11 y calicheamicina ω 11 (*Angew Chem. Inti. Ed. Engl.* **1994** 33:183-186); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como el cromóforo neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos enediinos de cromoproteínas relacionados), aclacinomisininas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN[®] (doxorubicina), morfolinodoxorrubicina, cianomorfolinodoxorrubicina, 2-pirrolinodoxorrubicina y desoxidoxorrubicina, epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxiluridina, encitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; antiadrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedor de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfomitina; acetato de eliptinio; una eptilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiaurea; lentinano; lonidamina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguanona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; phenamet, pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidracina; procarbacin; complejo de polisacárido PSK[®] (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxano; rizoxina; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente

toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano, vindesina; dacarbacina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, TAXOL (paclitaxel; Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE® (sin Cremophor), formulaciones de nanopartículas genomanipuladas con albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.) y TAXOTERE® (docetaxel, doxetaxel; Sanofi-Aventis); clorambucilo; GEMZAR® (gemcitabina); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; agentes a base de platino, etopósido (VP-16); ifosfamida; capecitabina; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE® (vinorelbina); novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; capecitabina (XELODA®); ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico; y sales, ácidos y derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

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

El agente quimioterápico también incluye anticuerpos tales como alemtuzumab (Campath), bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); cetuximab (ERBITUX®, Imclone); panitumumab (VECTIBIX®, Amgen), rituximab (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec), pertuzumab (OMNITARG®, 2C4, Genentech), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), tositumomab (Bexxar, Corixia) y el conjugado anticuerpo-fármaco gemtuzumab ozogamicina (MYLOTARG®, Wyeth). Los anticuerpos monoclonales humanizados adicionales con potencial terapéutico como agentes en combinación con los compuestos de la invención incluyen: apolizumab, aselizumab, atlizumab, bapineuzumab, bivatumumab, mertansina, cantuzumab, mertansina, cedelizumab, certolizumab pegol, cidfusituzumab, cidtuzumab, daclizumab, eculizumab, efalizumab, epratuzumab, erlizumab, felvizumab, fontolizumab, gemtuzumab ozogamicina, inotuzumab ozogamicina, ipilimumab, labetuzumab, lintuzumab, matuzumab, mepolizumab, motavizumab, motovizumab, natalizumab, nimotuzumab, nolovizumab, numavizumab, ocrelizumab, omalizumab, palivizumab, pascolizumab, pecfusituzumab, pectuzumab, pexelizumab, ralvizumab, ranibizumab, reslivizumab, reslizumab, resyvizumab, rovelizumab, ruplizumab, sibrotuzumab, siplizumab, sontuzumab, tacatuzumab tetraxetano, tadocizumab, talizumab, tefibazumab, tocilizumab, toralizumab, tucotuzumab celmoleucina, tucosituzumab, umavizumab, urtoxazumab, ustekinumab, visilizumab, y el anti-interleucina 12 (ABT-874/J695, Wyeth Research and Abbott Laboratories), que es un anticuerpo IgG₁ λ de longitud completa de secuencia exclusivamente humana recombinante genéticamente modificado para reconocer la proteína p40 de interleucina 12.

Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, ya sea *in vitro* o *in vivo*. En un modo de realización, el agente inhibidor del crecimiento es un anticuerpo inhibidor del crecimiento que previene o reduce la proliferación de una célula que expresa un antígeno al que se une el anticuerpo. En otro modo de realización, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la interrupción de G1 y la interrupción de la fase M. Los bloqueantes de fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de la topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Estos agentes que interrumpen la G1 también actúan extendiéndose a la interrupción de la fase S, por ejemplo, los agentes alquilantes del ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluoruracilo y Ara-C. Otra información se puede encontrar en Mendelsohn e Israel, eds., *The Molecular Basis of Cancer*, capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs", por Murakami *et al.* (W.B. Saunders, Filadelfia, 1995), por ejemplo, p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos antineoplásicos derivados ambos del árbol del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos previniendo la despolimerización, lo que da como resultado la inhibición de mitosis en células.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente

anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten la actividad biológica deseada.

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

10 Un anticuerpo "de bloqueo" o un anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. En algunos modos de realización, los anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno. Los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención bloquean la señalización a través de PD-1.

15 Como se usa en el presente documento, los términos "se une", "se une específicamente a" o "es específico para" se refieren a interacciones medibles y reproducibles, tales como la unión entre una diana y un anticuerpo, lo que es determinante de la presencia de la diana en presencia de una población heterogénea de moléculas, incluyendo moléculas biológicas. Por ejemplo, un anticuerpo que se une a o se une específicamente a una diana (que puede ser un epítipo) es un anticuerpo que se une a esta diana con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración que con la que se une a otras dianas. En un modo de realización, el grado de unión de un anticuerpo a una diana no relacionada es menor de aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo a la diana medida, por ejemplo, mediante un radioinmunoanálisis (RIA). En determinados modos de realización, un anticuerpo que se une específicamente a una diana tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ o $\leq 0,1 \text{ nM}$. En determinados modos de realización, un anticuerpo se une específicamente a un epítipo en una proteína que se conserva entre la proteína de diferentes especies. En otro modo de realización, la unión específica puede incluir, pero no requiere, una unión exclusiva.

20 Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una parte de un anticuerpo intacto, que comprende preferentemente la región de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena simple; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

25 Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de manera intercambiable para hacer referencia a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no a fragmentos de anticuerpo como se define a continuación. Los términos se refieren en particular a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen una región Fc.

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

35 Los "anticuerpos naturales" son normalmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se enlaza a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de isotipos de inmunoglobulina diferentes. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un

dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos aminoacídicos particulares forman una superficie de contacto entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada.

El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas partes de los dominios variables difieren extensamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente por los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables, tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se llaman regiones estructurales (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectadas mediante tres regiones hipervariables que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de, la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina proporciona un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de unión a antígeno y todavía puede reticular el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento de antígeno y de unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de una cadena pesada y de una cadena ligera en estrecha asociación no covalente. Es en esta configuración en la que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L . Conjuntamente, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un dominio variable único (o la mitad de un Fv que comprenda solo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad más baja que todo el sitio de unión.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxílico del dominio CH1 de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra de anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes tiene(n) al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ se producían originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También son conocidos otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Se pueden asignar las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

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

Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenario" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. En algunos modos de realización, el polipéptido de Fv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que posibilita que scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de los scFv, véase Plückthun, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo los fragmentos un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado con un dominio variable de la cadena ligera (V_L) en la misma cadena de polipéptido ($V_H - V_L$). Usando un conector que sea demasiado corto para

permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a que los dominios se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en el documento EP 404.097; documento WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto las posibles variantes que puedan surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando en general presentes dichas variantes en cantidades menores. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos frente a diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige frente a un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en tanto que no están contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar mediante el procedimiento de hibridoma descrito en primer lugar por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975) o se pueden preparar por procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de colecciones de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico a u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE. UU. n.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del viejo mundo, tal como babuino, macaco de la India o macaco cangrejero) y secuencias de la región constante humanas (patente de EE. UU. n.º 5.693.780).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Se realizan estas modificaciones para refinar además el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana, excepto por la sustitución/sustituciones en FR como se indica anteriormente. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

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

Varias delineaciones de HVR están en uso y se engloban en el presente documento. Las regiones determinantes de

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

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

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

15 Los residuos de la "región estructural" o "FR" son los residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable, como se define en el presente documento.

Un "anticuerpo no marcado" es un anticuerpo (como se define en el presente documento) que no se conjuga a una molécula heteróloga, tal como un resto citotóxico o radiomarcador.

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

25 Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/a", "o" y "el/la" incluyen las referencias plurales a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Se entiende que los aspectos y variaciones de la invención descrita en el presente documento incluyen "que consisten en" y/o "que consisten esencialmente en" aspectos y variaciones.

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

35 **III. Procedimientos**

40 En algunos modos de realización, se proporciona un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-PD-L1, en el que el tratamiento se basa en que el sujeto tiene un nivel medio o bajo de metilación en CpG1 en la región promotora de PD-L1 o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 en una muestra que contiene células cancerosas del sujeto.

45 En algunos modos de realización, se proporciona un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un sujeto, siempre que se haya encontrado que el sujeto tiene un nivel medio o bajo de metilación en CpG1 en la región promotora de PD-L1 y/o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 en una muestra que contiene células cancerosas del sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-PD-L1 al sujeto.

50 En algunos modos de realización, se proporciona un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer, que comprende: (a) seleccionar un sujeto que tiene cáncer, en el que dicho sujeto tiene un nivel medio o bajo de metilación en CpG1 en la región promotora de PD-L1 y/o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 en una muestra que contiene células cancerosas del sujeto; y (b) administrar al sujeto así seleccionado (por ejemplo, seleccionado en la etapa (a)) una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-PD-L1.

55 En algunos modos de realización, se proporciona un procedimiento para predecir si es probable que un sujeto con

cáncer responda al tratamiento con un anticuerpo anti-PD-L1, que comprende medir el nivel de metilación en CpG1 en la región promotora de PD-L1 y/o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 en una muestra que contiene células cancerosas del sujeto, en el que el nivel medio o bajo de metilación en CpG1 en la región promotora de PD-L1 o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD -L1 en la muestra indica que es probable que el sujeto sea sensible al tratamiento.

En algunos modos de realización, se proporciona un procedimiento para tratar el cáncer en un sujeto que comprende: (a) medir el nivel de metilación en CpG1 en la región promotora de PD-L1 y/o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 en una muestra que contiene células cancerosas del sujeto; y (b) administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-PD-L1 al sujeto que se ha determinado que tiene un nivel medio o bajo de metilación en CpG1 en la región promotora de PD-L1 o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1.

En algunos modos de realización, se proporciona un procedimiento para tratar el cáncer en un sujeto que comprende: (a) medir el nivel de metilación en CpG1 en la región promotora de PD-L1 y/o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 en una muestra que contiene células cancerosas del sujeto; y (b) administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-PD-L1 al sujeto que tiene un nivel medio o bajo de metilación en CpG1 en la región promotora de PD-L1 o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1, como se mide en la etapa (a).

En algunos modos de realización, se proporciona un procedimiento para tratar el cáncer en un sujeto que comprende medir el nivel de metilación en CpG1 en la región promotora de PD-L1 y/o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 en una muestra que contiene células cancerosas del sujeto; y si el sujeto tiene un nivel medio o bajo de metilación en CpG1 en la región promotora de PD-L1 o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1, administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-PD-L1 al sujeto.

En algunos modos de realización, se proporciona un procedimiento para identificar a un sujeto con cáncer que es probable que responda al tratamiento con anticuerpo anti-PD-L1 que comprende: (a) evaluar o medir el nivel de metilación en CpG1 en la región promotora de PD-L1 y/o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 en una muestra que contiene células cancerosas del sujeto; y (b) identificar al sujeto que tiene un nivel medio o bajo de metilación en CpG1 en la región promotora de PD-L1 o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 en una muestra que contiene células cancerosas del sujeto. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-PD-L1 al sujeto.

En determinados modos de realización, los procedimientos proporcionados en el presente documento comprenden evaluar el nivel de metilación en CpG1 en la región promotora de PD-L1 y en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1.

Las coordenadas genómicas de CpG1 (también denominado en el presente documento Mut 2) en la región promotora de PD-L1 son hg19 chr9: 5449887-5449891. Las coordenadas genómicas para uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 (también denominado en el presente documento CpG5 o Mut 7) son hg19 chr9: 5450934-5451072. Las secuencias de estas coordenadas se pueden obtener en bases de datos genómicas públicas en línea, tales como el Navegador de genomas UCSC (genome.ucsc.edu/).

La secuencia de ácido nucleico de CpG1 es GCTCG (SEQ ID NO: 22)

La secuencia de ácido nucleico de CpG5 es CACGGGTCCAAGTCCACCGCCAGCTGCTTGCTAGTAACATGACTTGIGTAAGTTATCCCAGCTGCAGCATCTAAGTAAG TCTCTTCCCTGCGCTAAGCAGGTCCAGGATCCC (SEQ ID NO: 23)

La secuencia de hg19 chr9: 5449887-5451072 se proporciona a continuación (CpG1 y CpG5 están subrayados):

GCTCGGGATGGGAAGTTCTTTTAATGACAAAGCAAATGAAGTTTCATTAT
GTCGAGGAACTTTGAGGAAGTCACAGAATCCACGATTTAAAAATATATTT
 CCTATTATACACCCATACACACACACACACACCTACTTTCTAGAATAAAA
 ACCAAAGCCATATGGGTCTGCTGCTGACTTTTTATATGTTGTAGAGTTAT
 ATCAAGTTATGTCAAGATGTTTCAGTCACCTTGAAGAGGCTTTTATCAGAA
 AGGGGGACGCCTTTCTGATAAAGGTTAAGGGGTAACCTTAAGCTCTTACC
 CCTCTGAAGGTA AAAATCAAGGTGCGTTCAGATGTTGGCTTGTTGTA AATT
 TCTTTTTTTATTAATAACATACTAAATGTGGATTTGCTTTAATCTTCGAA

ACTCTTCCCGGTGAAAATCTCATTTACAAGAAAACCTGGACTGACATGTTT
 CACTTTCTGTTTCATTTCTATACACAGCTTTTATTCCTAGGACACCAACAC
 TAGATACCTAAACTGAAAAGCTTCCGCCGATTTACCCGAAGGTCAGGAAAG
 TCCAACGCCCGGCAAACCTGGATTTGCTGCCTTGGGCAGAGGTGGGCGGGA
 CCCCCTCCGGGCTGGCGCAACGCTGAGCAGCTGGCGCGTCCCCTCGCG
 GCCCCAGTTCTGCGCAGCTTCCCAGGGCTCCGCACCAGCCGCGCTTCTGT
 CCGCTGCAGGTAGGGAGCGTTGTTCTCCGCGGGTGGCCACGGCCAGT
 ATCTCTGGCTAGCTCGCTGGGCACTTTAGGACGGAGGGTCTCTACACCCT
 TTCTTTGGGATGGAGAGAGGAGAAGGGAAAGGGAACGCGATGGTCTAGGG
 GGCAGTAGAGCCAATTACCTGTTGGGGTTAATAAGAACAGGCAATGCATC
 TGGCTTCCTCCAGGCGGATTCAGTTTTGCTCTAAAATAATTTATACC
 TCTAAAATAAATAAGATAGGTAGTATAGGATAGGTAGTCATTCTTATGC
 GACTGTGTGTTTCCAGAATATAGCTCTGATGCTAGGCTGGAGGTCTGGACAC
GGGTCCAAGTCCACCGCCAGCTGCTTGGCTAGTAACATGACTTGTGTAAGT
TATCCAGCTGCAGCATCTAAGTAAGTCTCTTCCCTGCGCTAAGCAGGTCC
AGGATCCCTGAACGGAATTTATTTGCTCTGTCCATT (SEQ ID NO: 30)

5 **Procedimientos para determinar el nivel de metilación**

El grado de metilación en CpG1 en la región promotora de PD-L1 y/o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del PD-L1 se puede medir usando una variedad de procedimientos. En determinados modos de realización, el grado de metilación en CpG1 en la región promotora de PD-L1 o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del PD-L1 se determina mediante secuenciación de ADN con bisulfito. El tratamiento de ADN con bisulfito convierte los residuos de citosina ("C") en uracilo ("U"), pero no afecta a los residuos de 5-metilcitosina. Por tanto, el tratamiento con bisulfito introduce cambios específicos en la secuencia de ADN que dependen del estado de metilación de los residuos de citosina individuales, proporcionando información de resolución de un solo nucleótido sobre el estado de metilación de un segmento de ADN. Se pueden realizar diversos análisis en la secuencia alterada para recuperar esta información. En algunos modos de realización, una secuencia de interés modificada con bisulfito (tal como CpG1 en la región promotora de PD-L1 y/o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del PD-L1) se amplifica a continuación mediante PCR con dos conjuntos de cebadores específicos de cadena para proporcionar un par de fragmentos, uno de cada cadena, en el que todos los residuos de uracilo y timina se amplifican como timina y solo los residuos de 5-metilcitosina se amplifican como citosina. Los productos de PCR se pueden secuenciar directamente o se pueden clonar y secuenciar para proporcionar mapas de metilación de moléculas de ADN individuales (véase, por ejemplo, Frommer, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 1827-1831, 1992).

En algunos modos de realización, un nivel bajo de metilación como se determina por secuenciación con bisulfito es menor de aproximadamente un 20 % de metilación en CpG1 (tal como aproximadamente uno cualquiera de un 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o menor de aproximadamente un 1 % de metilación, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunos modos de realización, un nivel bajo de metilación como se determina por secuenciación con bisulfito es menor de aproximadamente un 20 % de metilación en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 (tal como aproximadamente uno cualquiera de un 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o menor de aproximadamente un 1 % de metilación, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunos modos de realización, un nivel bajo de metilación como se determina por secuenciación con bisulfito es menor de aproximadamente un 20 % de metilación en CpG1 (tal como aproximadamente uno cualquiera de un 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o menor de aproximadamente un 1 % de metilación, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores) e menor de aproximadamente un 20 % de metilación en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 (tal como aproximadamente uno cualquiera de un 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o menor de aproximadamente un 1 % de metilación, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores).

En algunos modos de realización, un nivel medio de metilación como se determina por secuenciación con bisulfito está entre aproximadamente un 20 % y aproximadamente un 40 % de metilación en CpG1 (tal como aproximadamente uno cualquiera de un 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %,

aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 45 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 55 % o menor de aproximadamente un 60 % de metilación, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores), y entre aproximadamente un 5 % y aproximadamente un 60 % de metilación en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 (tal como aproximadamente uno cualquiera de un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 % o menor de aproximadamente un 60 % de metilación, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores).

En algunos modos de realización, un nivel alto de metilación como se determina por secuenciación de próxima generación con bisulfito está entre aproximadamente un 60 % y aproximadamente un 100 % de metilación en CpG1 (tal como uno cualquiera de un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, más de aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 % de metilación, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunos modos de realización, un nivel alto de metilación como se determina por secuenciación de próxima generación con bisulfito está entre aproximadamente un 60 % y aproximadamente un 100 % de metilación en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 (tal como uno cualquiera de un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, más de aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 % de metilación, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunos modos de realización, un nivel alto de metilación como se determina por secuenciación de próxima generación con bisulfito está entre aproximadamente un 60 % y aproximadamente un 100 % de metilación en CpG1 (tal como aproximadamente un 60 %, más de aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 65 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 75 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 99 %, más de aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 % de metilación, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores), y entre aproximadamente un 60 % y aproximadamente un 100 % de metilación en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 (tal como uno cualquiera de un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, más de aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 % de metilación, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores).

En determinados modos de realización, el grado de metilación en CpG1 en la región promotora de PD-L1 y/o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del PD-L1 se determina usando una matriz de chip de metilación, tal como la matriz INFINIUM® HumanMethylation450 BeadChip de ILLUMINA®. En resumen, después del tratamiento con bisulfito, el ADN genómico se amplifica con todo el genoma (WGA), se fragmenta enzimáticamente, se purifica y se añade a HumanMethylation450 BeadChips, que contienen 485.512 sondas que cubren un 99 % de los genes RefSeq. Las sondas interrogan a 19.755 islas de CpG únicas con cobertura adicional en regiones costeras y promotores de miRNA, así como 3091 sondas en sitios distintos de CpG. Durante la hibridación, las moléculas de ADN-WGA tratadas con bisulfito se hibridan con oligómeros de FNA específicos de locus enlazados a tipos de microesferas individuales. Los dos tipos de microesferas corresponden a cada locus de CpG, es decir, una a la ("C") metilada y la otra a la ("T") no metilada indicadas. La hibridación de cebadores específicos de alelo está seguida de la extensión de base única usando ddNTP marcados con DNP y biotina. Ambos tipos de microesferas para el mismo locus de CpG incorporarán el mismo tipo de nucleótido marcado, determinado por la base que precede a la "C" interrogada en el locus de CpG y, por lo tanto, se detectarán en el mismo canal de color. Después de la extensión, la matriz se tiñe con fluorescencia, se escanea y se miden las intensidades de las señales producidas por los tipos de microesferas metiladas y no metiladas. Se usa un programa informático para registrar los valores de metilación del ADN, descritos como "valores beta", para cada locus en cada muestra. Los valores beta de metilación del ADN son variables continuas entre 0 y 1, que representan la proporción de la intensidad del tipo de microesfera metilada con respecto a la intensidad del locus combinado. Se describen otros detalles que describen la matriz INFINIUM® HumanMethylation450 BeadChip y la plataforma de ensayo en, por ejemplo, Morris *et al.* (2015) *Methods* 72, 3-8; Sandoval *et al.* (2011) *Epigenetics* 6, 692-702; de Ruijter *et al.* (2015) *Laboratory Investigation* doi:10.1038/labinvest.2015.53; Lehne *et al.* (2015) *Genome Biology* 16, 37-49; y en otra parte.

En algunos modos de realización, un nivel bajo de metilación como se determina usando una matriz de chip de metilación (tal como la matriz INFINIUM® HumanMethylation450 BeadChip) es un valor beta de entre aproximadamente 0 y menor de aproximadamente 0,2 para CpG1 (tal como aproximadamente uno cualquiera de 0, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18 y 0,19 incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunos modos de realización, un nivel bajo de metilación como se determina usando una matriz de chip de metilación (tal como la matriz INFINIUM® HumanMethylation450 BeadChip) es un valor beta de entre aproximadamente 0 y menor de aproximadamente 0,2 para uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 (tal como aproximadamente uno cualquiera de 0, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18 y 0,19 incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunos modos de realización, un nivel bajo de metilación como se determina usando una matriz de chip de metilación (tal como la matriz INFINIUM® HumanMethylation450 BeadChip) es un valor beta de entre aproximadamente 0 y aproximadamente menor de aproximadamente 0,2 para CpG1 (tal como aproximadamente uno cualquiera de 0, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18 y 0,19 incluyendo cualquier intervalo entre estos valores) y un valor beta de entre aproximadamente 0 y menor de aproximadamente 0,2 para uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 (tal como aproximadamente uno cualquiera de 0, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18 y 0,19 incluyendo cualquier intervalo entre estos valores).

En algunos modos de realización, un nivel medio de metilación como se determina usando una matriz de chip de

metilación (tal como la matriz INFINIUM® HumanMethylation450 BeadChip) es un valor beta de entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 0,3 para CpG1 (tal como aproximadamente uno cualquiera de 0,2, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24, 0,25, 0,26, 0,27, 0,28 o 0,29, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunos modos de realización, un nivel medio de metilación como se determina usando una matriz de chip de metilación (tal como la matriz INFINIUM® HumanMethylation450 BeadChip) es un valor beta de entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 0,3 para uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 (tal como aproximadamente uno cualquiera de 0,2, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24, 0,25, 0,26, 0,27, 0,28 o 0,29, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunos modos de realización, un nivel medio de metilación como se determina usando una matriz de chip de metilación (tal como la matriz INFINIUM® HumanMethylation450 BeadChip) es un valor beta de entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 0,3 para CpG1 (tal como aproximadamente uno cualquiera de 0,2, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24, 0,25, 0,26, 0,27, 0,28 o 0,29, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores) y un valor beta de entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 0,3 para uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 (tal como aproximadamente uno cualquiera de 0,2, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24, 0,25, 0,26, 0,27, 0,28 o 0,29, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores).

En algunos modos de realización, un nivel alto de metilación como se determina usando una matriz de chip de metilación (tal como la matriz INFINIUM® HumanMethylation450 BeadChip) es un valor beta de entre mayor de aproximadamente 0,3 y aproximadamente 1,0 para CpG1 (tal como aproximadamente uno cualquiera de mayor de 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95 o 1,0, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunos modos de realización, un nivel alto de metilación como se determina usando una matriz de chip de metilación (tal como la matriz INFINIUM® HumanMethylation450 BeadChip) es un valor beta de entre mayor de aproximadamente 0,3 y aproximadamente 1,0 para uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 (tal como aproximadamente uno cualquiera de mayor de 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95 o 1,0, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunos modos de realización, un nivel alto de metilación como se determina usando una matriz de chip de metilación (tal como la matriz INFINIUM® HumanMethylation450 BeadChip) es un valor beta de entre mayor de aproximadamente 0,3 y aproximadamente 1,0 para CpG1 (tal como aproximadamente uno cualquiera de mayor de 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95 o 1,0, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores) y un valor beta de entre mayor de aproximadamente 0,3 y aproximadamente 1,0 para uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 (tal como aproximadamente uno cualquiera de mayor de 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95 o 1,0, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores).

En algunos modos de realización, la muestra del sujeto es una muestra biológica (tal como una muestra biológica *ex vivo*) de tejido o líquido biológico que contiene células cancerosas y/o células tumorales del sujeto del que se pueden aislar ácidos nucleicos (tales como polinucleótidos, por ejemplo, ADN genómico y/o transcritos) y/o polipéptidos. En algunos modos de realización, la muestra comprende secciones congeladas de tejido, tales como las tomadas con propósitos histológicos. En algunos modos de realización, la muestra se toma de una biopsia. En algunos modos de realización, la muestra se toma de una autopsia. En algunos modos de realización, la muestra es una muestra tisular congelada. En algunos modos de realización, la muestra es una muestra recién extraída tomada del sujeto. En algunos modos de realización, la muestra es una muestra tisular conservada. En algunos modos de realización, la muestra es una muestra incluida en parafina fijada con formol (FFPE). En algunos modos de realización, la muestra es un explante o un cultivo celular primario y/o transformado derivado del tejido del sujeto.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la muestra que contiene células cancerosas del sujeto muestra además pruebas de infiltración de células inmunitarias. En determinados modos de realización, la presencia de uno cualquiera o más de linfocitos CD16⁺, CD4⁺, CD3⁺, CD56⁺, CD45⁺, CD68⁺, CD20⁺, CD163⁺ o CD8⁺ en una muestra que contiene células cancerosas del sujeto indica la infiltración de células inmunitarias. En determinados modos de realización, la presencia de linfocitos CD8⁺ en una muestra que contiene células cancerosas del sujeto indica infiltración de células inmunitarias. En determinados modos de realización, la presencia de uno o más de linfocitos CD16⁺, CD4⁺, CD3⁺, CD56⁺, CD45⁺, CD68⁺, CD20⁺, CD163⁺ o CD8⁺ en una muestra que contiene células cancerosas del sujeto se detecta usando ensayos inmunohistoquímicos (IHQ) bien conocidos y ampliamente usados por los expertos en la técnica. Dichos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, inmunoelectrotransferencia, ELISA y citometría de flujo. En determinados modos de realización, la presencia de uno o más de linfocitos CD16⁺, CD4⁺, CD3⁺, CD56⁺, CD45⁺, CD68⁺, CD20⁺, CD163⁺ o CD8⁺ en una muestra que contiene células cancerosas del sujeto se detecta usando técnicas de análisis de expresión génica, que incluyen, pero no se limitan a, PCR cuantitativa (qPCR), qRT-PCR, perfil de transcriptoma (tal como *sec-ARN*), análisis de micromatriz, secuenciación de próxima generación, etc. Dichos servicios se proporcionan, por ejemplo, por FLUIDIGM®, NANOSTRING TECHNOLOGIES®, etc.

En determinados modos de realización, el sujeto no se trata con un anticuerpo anti-PD-L1 si la muestra que contiene células cancerosas del sujeto tiene un nivel medio de metilación en CpG1 en la región promotora de PD-L1 y/o uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 y no hay pruebas de infiltración de células inmunitarias. En determinados modos de realización, el sujeto se trata con un anticuerpo anti-PD-L1 si la muestra que contiene células cancerosas del sujeto tiene un nivel medio de metilación en CpG1 en la región promotora de PD-L1 y/o uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 y hay pruebas de infiltración de células inmunitarias.

Cáncer

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el cáncer es carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, leucemia o una neoplasia maligna linfática. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el cáncer es carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, leucemia o una neoplasia maligna linfática. En algunos modos de realización, el cáncer es cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago (tal como cáncer gastrointestinal y cáncer gastrointestinal del estroma), cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de las vías urinarias, hepatoma, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal (CRC), carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peniano, mieloma múltiple y linfoma de linfocitos B (tal como linfoma no hodgkiniano (LNH) folicular/de grado bajo, LNH linfocítico pequeño (LP), LNH folicular/de grado intermedio, LNH difuso de grado intermedio, LNH inmunoblástico de grado alto, LNH linfoblástico de grado alto, LNH de células pequeñas no escindidas de grado alto, LNH voluminoso, linfoma de manto, linfoma relacionado con el sida, y macroglobulinemia de Waldenstrom), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia de células pilosas, leucemia mieloblástica crónica y trastorno linfoproliferativo postrasplante (TLPT), así como proliferación vascular anómala asociada con facomatosis, edema (tal como el asociado con tumores cerebrales), el síndrome de Meigs, cáncer cerebral, así como cáncer de cabeza y cuello, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma de Kaposi, carcinoma carcinoide y mesotelioma, glioblastoma, neuroblastomas y metástasis asociadas.

En determinados modos de realización, los cánceres que son susceptibles de tratamiento mediante los procedimientos de la invención incluyen cáncer de mama, cáncer de pulmón y cáncer de piel, incluyendo las formas metastásicas de esos cánceres. En determinados modos de realización, el cáncer de mama es carcinoma de mama. En algunos modos de realización, el cáncer de pulmón es carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón o carcinoma de células escamosas del pulmón. En determinados modos de realización, el cáncer de piel es melanoma, melanoma de extensión superficial, melanoma lentigo maligno, melanomas lentiginosos acrales, melanomas nodulares, carcinoma de piel o cáncer de vejiga.

Anticuerpos anti-PD-L1

PD-L1 (también conocida como "ligando de muerte programada 1", PDCD1L1, PDCD1LG1, B7-H1, B7-H y CD274) es una proteína transmembranaria tipo 1 de 40 kDa que se une a PD-1, un receptor encontrado en los linfocitos T activados, linfocitos B y células mieloides. El acoplamiento de PD-L1 con PD-1 ofrece una señal que inhibe la activación mediada por TCR de la producción de IL-2 y la proliferación de linfocitos T. La vía PD-L1/PD-1 está implicada como un mecanismo principal mediante el que los tumores evaden la eliminación por el sistema inmunitario (Lipson EJ, *et al.* Cancer Immunol Res 2013; 1 (1): 54-63). Sin estar limitada por la teoría, la inhibición de PD-L1 por un anticuerpo anti-PD-L1 puede permitir la activación de linfocitos T, restaurando por tanto su capacidad para detectar y atacar eficazmente las células cancerosas y las células tumorales.

En determinados modos de realización de uno cualquiera de los procedimientos proporcionados en el presente documento, el anticuerpo anti-PD-L1 (o fragmento de unión a antígeno del mismo) inhibe la unión de PD-L1 a sus compañeros de unión. En un aspecto específico, los compañeros de unión de PD-L1 son PD-1 y/o B7-1. En determinados modos de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 (o fragmento de unión a antígeno del mismo) se selecciona del grupo que consiste en YW243.55.S70, MPDL3280A, MDX-1105, MEDI4736 y MSB0010718C. MDX-1105, también conocido como BMS-936559, es un anticuerpo anti-PD-L1 descrito en el documento WO2007/005874. El anticuerpo YW243.55.S70 (secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera mostradas en SEQ ID NO: 20 y 21, respectivamente) es un anticuerpo anti-PD-L1 descrito en el documento WO2010/077634 A1. MEDI4736 es un anticuerpo anti-PD-L1 descrito en los documentos WO2011/066389 y US2013/034559.

Los ejemplos de anticuerpos anti-PD-L1 (o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) útiles para los procedimientos proporcionados en el presente documento y los procedimientos para preparar los mismos se describen en la solicitud de patente PCT WO 2010/077634 A1 y el documento US 8.217.149.

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

En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20 y la región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21.

En un modo de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 contiene un polipéptido de región variable de la cadena pesada

que comprende una secuencia de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en la que:

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

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

5 En un aspecto específico, X₁ es D; X₂ es S y X₃ es T. En otro aspecto, el polipéptido comprende además secuencias estructurales de la cadena pesada de región variable yuxtapuestas entre las HVR de acuerdo con la fórmula: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4). Aún en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. En otro aspecto, las secuencias estructurales son la secuencia estructural consenso de subgrupo III de VH. Todavía en otro aspecto, al menos una de las secuencias estructurales es la siguiente:

- HC-FR1 es EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 4)
- HC-FR2 es WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 5)
- HC-FR3 es RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 6)
- HC-FR4 es WQQGTLTVSA (SEQ ID NO: 7).

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

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

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

20 Todavía en otro aspecto, X₄ es D; X₅ es V; X₆ es S; X₇ es A; X₈ es V; X₉ es F; X₁₀ es Y; X₁₁ es Y; X₁₂ es L; X₁₃ es Y; X₁₄ es H; X₁₅ es A. Todavía en otro aspecto, la cadena ligera comprende además secuencias estructurales de cadena ligera de región variable yuxtapuestas entre las HVR de acuerdo con la fórmula: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales son una estructura consenso de kappa I de VL. Todavía en otro aspecto, al menos una de las secuencias estructurales es la siguiente:

- LC-FR1 es DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTC (SEQ ID NO: 11)
- LC-FR2 es WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 12)
- LC-FR3 es GVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 13)
- LC-FR4 es FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 14).

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

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

- (i) la secuencia de HVR-H1 es GFTFSX₁SWIH; (SEQ ID NO: 1)
- (ii) la secuencia de HVR-H2 es AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG (SEQ ID NO: 2)
- (iii) la secuencia de HVR-H3 es RHWPGGFDY, y (SEQ ID NO: 3)

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

- (i) la secuencia de HVR-L1 es RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A (SEQ ID NO: 8)
- (ii) la secuencia de HVR-L2 es SASX₉LX₁₀S; y (SEQ ID NO: 9)
- (iii) la secuencia de HVR-L3 es QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T; (SEQ ID NO: 10)

en la que además: X₁ es D o G; X₂ es S o L; X₃ es T o S; X₄ es D o V; X₅ es V o I; X₆ es S o N; X₇ es A o F; X₈ es V o

ES 2 810 700 T3

L; X₉ es F o T; X₁₀ es Y o A; X₁₁ es Y, G, F o S; X₁₂ es L, Y, F o W; X₁₃ es Y, N, A, T, G, F o I; X₁₄ es H, V, P, T o I; X₁₅ es A, W, R, P o T.

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

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

15 Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena pesada es la siguiente:

HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	(SEQ ID NO: 4)
HC-FR2	WVRQAPGKGLEWV	(SEQ ID NO: 5)
HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO: 6)
HC-FR4	WGQGTLVTVSA	(SEQ ID NO: 7).

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

LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	(SEQ ID NO: 11)
LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO: 12)
LC-FR3	GVPSRFGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO: 13)
LC-FR4	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO: 14).

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

30

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

35

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

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

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

50

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

HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 5)
 HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 6)
 HC-FR4 WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 7).

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

LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 11)
 LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 12)
 LC-FR3 GVPSRFGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYC (SEQ ID NO: 13)
 LC-FR4 FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 14).

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

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

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWIS PYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAY
 LQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDY WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 20), o

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

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSA\$FLYSG VPSRFGSGSGTDFLTITSSLPEDFA
 TYYCQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 21)

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

40 HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 4)
 HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 5)
 HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 6)
 HC-FR4 WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 7).

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

LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 11)
 LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 12)

LC-FR3 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 13)
 LC-FR4 FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 14).

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

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

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVWRQAPGKGLEWVA WSPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNT
 20 AYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGF DYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 24), o

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

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQKPKGKAPKLLIYSASFLYSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA
 25 TYCYCQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 21)

Todavía en otro modo de realización se proporciona un anticuerpo anti-PDL1 aislado que comprende una secuencia de región variable de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que:

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVWRQAPGKGLEWVAWI SPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAY
 35 LQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDY WGQGLTVTVSSASTK (SEQ ID NO: 28), o

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

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQKPKGKAPKLLIYSASF LYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
 40 FATYYCQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 29).

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

HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 4)
 HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 5)
 HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 6)
 HC-FR4 WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 25).

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

de la cadena ligera es la siguiente:

LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTC	(SEQ ID NO: 11)
LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO: 12)
LC-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO: 13)
LC-FR4	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO: 14).

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

15 Aún en otro modo de realización, el anticuerpo anti-PD-1 es MPDL3280A (Número de registro CAS: 1422185-06-5). Todavía en otro modo de realización se proporciona un anticuerpo anti-PD-1 aislado que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:24 y/o una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:25. Todavía en otro modo de realización se proporciona un anticuerpo anti-PDL-1 aislado que comprende una secuencia de la cadena pesada y/o cadena ligera, en el que:

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGG
 STYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQG
 TLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFPVAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
 PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 25 KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
 VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:26), o

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

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
 VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSV
 FIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDDST
 YLSSTLTLSKADYEKIKVYACEVTHIQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:27)

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

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

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

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

HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	(SEQ ID NO: 4)
HC-FR2	WVRQAPGKGLEWV	(SEQ ID NO: 5)
HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO: 6)
HC-FR4	WGQGTLVTVSA	(SEQ ID NO: 7).

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

LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTC	(SEQ ID NO: 11)
LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO: 12)
LC-FR3	GVPSRFGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO: 13)
LC-FR4	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO: 14).

Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo anti-PD-L1 descrito en el presente documento comprende además una región constante humana o murina. Todavía en otro aspecto, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Todavía en otro aspecto específico, la región constante humana es IgG1. Todavía en otro aspecto, la región constante murina se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Todavía en otro aspecto, la región constante murina es IgG2A. Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo tiene una función efectora reducida o mínima. Todavía en otro aspecto específico, la función efectora mínima es el resultado de la producción en células procariontas. Todavía en otro aspecto específico, la función efectora mínima es el resultado de una "mutación de Fc sin efector" o aglucosilación. Todavía en otro aspecto, la mutación de Fc menos efectora es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

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

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

IV. Preparación de anticuerpos

Los procedimientos, kits y artículos de fabricación proporcionados en el presente documento usan o incorporan un anticuerpo que se une a PD-L1. Las técnicas ejemplares para generar y producir dichos anticuerpos se describen a continuación.

Preparación de antígenos

La forma soluble de PD-L1 (tal como el dominio extracelular) o fragmentos de la misma, opcionalmente conjugados con otras moléculas, se puede usar como inmunógeno para generar anticuerpos anti-PD-L1 y/o para cribar anticuerpos anti-PD-L1. De forma alternativa, las células que expresan PD-L1 se pueden usar como inmunógeno o para el cribado. Dichas células se pueden derivar de una fuente natural (por ejemplo, líneas celulares de cáncer) o pueden ser células que se han transformado mediante técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembranaria. Otras formas de PD-L1 útiles para preparar y/o cribar anticuerpos anti-PD-L1 serán evidentes para

los expertos en la técnica.

Anticuerpos policlonales

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

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

Anticuerpos monoclonales

30 Se obtienen anticuerpos monoclonales de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles variantes que puedan surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando presentes, en general, dichas variantes en cantidades escasas. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos o policlonales.

35 Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975) o se pueden preparar por procedimientos de ADN recombinante (patente de EE. UU. n.º 4.816.567).

40 En el procedimiento de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, se inmuniza como se describe en el presente documento para inducir linfocitos que producen o pueden producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. De forma alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. A continuación, se fusionan los linfocitos con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)).

45 Las células de hibridoma así preparadas se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo, que contenga preferentemente una o más sustancias que inhiban el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma originales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma originales están desprovistas de la enzima hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), evitando dichas sustancias el crecimiento de células carentes de HGPRT.

50 En algunos modos de realización, las células de mieloma son aquellas que se fusionan eficazmente, soportan una producción estable de alto nivel de anticuerpo mediante las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre estas, en algunos modos de realización, las líneas celulares de mieloma son líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California EE. UU., y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE. UU. También se han descrito líneas celulares de heteromieloma ratón-humano y mieloma humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

60 El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se somete a ensayo para determinar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos frente al antígeno. En algunos modos de realización, se determina la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoanálisis (RIA) o ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA).

65

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard de Munson *et al.*, *Anal. Biochem.* 107:220 (1980).

5 Después de que se identifican las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar por procedimientos de dilución limitante y cultivar por procedimientos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

10 Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, líquido ascítico o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-sefariosa, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

15 El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que se pueden unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). En algunos modos de realización, las células de hibridoma sirven como una fuente de dicho ADN. Una vez aislado, se puede disponer el ADN en vectores de expresión, que, a continuación, se transfectan en células huésped, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma, que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.* 5:256-262 (1993) y Plükhun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

25 **Anticuerpos derivados de colecciones**

Se pueden aislar anticuerpos o fragmentos de anticuerpo a partir de colecciones de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando colecciones de fagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) por barajado de cadenas (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como una estrategia para construir colecciones de fagos muy grandes (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Por tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

También se puede modificar el ADN, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de la cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de EE. UU. n.º 4.816.567; Morrison, *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o uniendo de forma covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido distinto a inmunoglobulina.

Típicamente, dichos polipéptidos distintos a inmunoglobulina se sustituyen con los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen con los dominios variables de un sitio de combinación con antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprenda un sitio de combinación con antígeno que tenga especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación con antígeno que tenga especificidad por un antígeno diferente.

Se pueden aislar los anticuerpos de la invención cribando colecciones combinatorias para determinar anticuerpos con la actividad o actividades deseada(s). Por ejemplo, una variedad de procedimientos son conocidos en la técnica para generar colecciones de presentación en fagos y cribar dichas colecciones para seleccionar los anticuerpos que poseen las características de unión deseadas, tales como los procedimientos descritos en el ejemplo 3. Los procedimientos adicionales se revisan, por ejemplo, en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen además, por ejemplo, en McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554; Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks y Bradbury, en *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004).

En determinados procedimientos de presentación en fagos, los repertorios de genes de VH y VL se clonan por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en colecciones de fagos, que, a continuación, se pueden cribar para determinar el fago de unión a antígeno como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Típicamente, los fagos presentan fragmentos de anticuerpo, como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o bien como fragmentos Fab. Las colecciones de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad para el inmunógeno sin el requisito de construir hibridomas. De forma alternativa, se puede clonar el repertorio sin exposición previa (por ejemplo, de un ser humano) para proporcionar una única fuente de anticuerpos para una amplia gama de antígenos propios y también no propios sin ninguna inmunización como se describe por Griffiths *et al.*, *EMBO J*, 12: 725-734 (1993). Finalmente, también se pueden

preparar sintéticamente colecciones sin exposición previa clonando segmentos génicos V no reordenados a partir de células madre y usando cebadores de PCR que contienen secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 altamente variables y conseguir el reordenamiento *in vitro*, como se describe por Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patente que describen colecciones de fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: la patente de EE. UU. n.º 5.750.373 y las publicaciones de patente de EE. UU. n.ºs 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.

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

Anticuerpos quiméricos y humanizados

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

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

Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos se han descrito en la técnica. En algunos modos de realización, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos aminoacídicos introducidos en el mismo desde una fuente que es no humana. Estos residuos aminoacídicos no humanos se denominan a menudo residuos de "importación", que se toman típicamente de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986), Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-327 (1988), Verhoeyen *et al.*, *Science* 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las secuencias de la región hipervariable por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE. UU. n.º 4.816.567) en los que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR están sustituidos con residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se van a usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado procedimiento de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a toda la colección de secuencias conocidas de dominio variable humano. A continuación, se acepta la secuencia humana que es la más próxima a la del roedor como la región estructural (FR) humana para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.* 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987)). Otro procedimiento usa una región estructural particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de la cadena ligera o pesada. Se puede usar la misma región estructural para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

Es importante además que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, en algunos modos de realización de los procedimientos, se preparan los anticuerpos humanizados mediante un procedimiento de análisis de las secuencias originales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias originales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están disponibles comúnmente y son conocidos por los expertos en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del probable papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De esta forma, se pueden seleccionar y combinar residuos de FR a partir de las secuencias receptoras y de importación de modo que se logre la característica de anticuerpo deseada,

tal como una afinidad incrementada por el/los antígeno(s) diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y más sustancialmente implicados en la influencia en la unión a antígeno.

Las secuencias de CDR anteriores están en general presentes dentro de secuencias estructurales pesada variable y ligera variable humana, tales como sustancialmente los residuos FR consenso humanos del subgrupo I kappa de la cadena ligera humana (VL6I), y sustancialmente los residuos FR consenso humanos del subgrupo de la cadena pesada humana III (VHIII). Véase también el documento WO 2004/056312 (Lowman *et al.*).

En algunos modos de realización, la región pesada variable se puede unir a una región constante de la cadena de IgG humana, en la que la región puede ser, por ejemplo, IgG1 o IgG3, incluyendo la secuencia natural y regiones constantes variantes.

En algunos modos de realización, el anticuerpo en el presente documento puede comprender además al menos una sustitución aminoacídica en la región Fc que mejora la actividad ADCC, tal como una en la que las sustituciones aminoacídicas están en las posiciones 298, 333 y 334, preferentemente S298A, E333A y K334A, usando la numeración EU de residuos de la cadena pesada. Véase también la patente de EE. UU. n.º 6.737.056B1, Presta. Cualquiera de estos anticuerpos puede comprender al menos una sustitución en la región Fc que mejora la unión a FcRn o la semivida en suero, por ejemplo, una sustitución en la posición 434 de la cadena pesada, tal como N434W. Véase también la patente de EE. UU. n.º 6.737.056B1, Presta. Cualquiera de estos anticuerpos puede comprender además al menos una sustitución aminoacídica en la región Fc que aumenta la actividad CDC, por ejemplo, que comprende al menos una sustitución en la posición 326, preferentemente K326A o K326W. Véase también la patente de EE. UU. n.º 6.528.624B1 (Idusogie *et al.*).

Anticuerpos humanos

De forma alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que, después de la inmunización, pueden producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulina. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada de anticuerpo (JH) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de línea germinal humana a dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véanse, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immuno.* 7:33 (1993); y las patentes de EE. UU. n.ºs 5.591.669; 5.589.369 y 5.545.807.

De forma alternativa, se puede usar la tecnología de presentación en fagos (McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo *in vitro* a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes de dominio V de anticuerpo se clonan sin cambio de pauta de lectura en un gen de proteína de la cápside mayor o bien menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcional en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades del linfocito B. La presentación en fagos se puede realizar en una variedad de formatos; para su revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Se pueden usar varias fuentes de segmentos de genes V para la presentación en fagos. Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) aislaron una matriz diversa de anticuerpos antioxazolona a partir de una pequeña colección combinatoria aleatoria de genes V derivados de los bazos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos con respecto a una matriz diversa de antígenos (incluyendo autoantígenos) siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991) o Griffith *et al.*, *EMBO J.* 12:725-734 (1993). Véanse también las patentes de EE. UU. n.ºs 5.565.332 y 5.573.905.

Los anticuerpos humanos también se pueden generar por linfocitos B activados *in vitro* (véanse las patentes de EE. UU. 5.567.610 y 5.229.275).

Fragmentos de anticuerpo

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron por medio de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véanse, por ejemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir ahora directamente mediante células huésped recombinantes. Por ejemplo, se pueden aislar los fragmentos de anticuerpo de las colecciones de fagos de anticuerpos analizadas anteriormente. De forma alternativa, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplar químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro

enfoque, se pueden aislar directamente fragmentos $F(ab')_2$ del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el experto en la técnica. En otros modos de realización, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véanse el documento WO 93/16185; la patente de EE. UU. n.º 5.571.894 y la patente de EE. UU. n.º 5.587.458. El fragmento de anticuerpo puede ser también un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. 5.641.870. Dichos fragmentos de anticuerpo lineal pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

Anticuerpos multiespecíficos

Los "anticuerpos multiespecíficos" tienen especificidades de unión a al menos dos epítomos diferentes, donde los epítomos son normalmente de diferentes antígenos. Si bien dichas moléculas normalmente solo se unirán a dos epítomos diferentes (es decir, anticuerpos biespecíficos, BsAb), los anticuerpos con especificidades adicionales tales como anticuerpos trispecíficos se engloban en esta expresión cuando se usan en el presente documento. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$).

En la técnica son conocidos procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein *et al.*, *Nature* 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las que solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza normalmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa y los rendimientos de producto son bajos. Se divulgan procedimientos similares en el documento WO 93/08829 y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

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

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

TABLA 1: PROPIEDADES DE RESIDUOS AMINOACÍDICOS

Aminoácido	Abreviatura de una letra	Masa ^a (dalton)	Volumen ^b (Å ³)	Área de superficie accesible ^c (Å ²)
Alanina (Ala)	A	71,08	88,6	115
Arginina (Arg)	R	156,20	173,4	225
Asparagina (Asn)	N	114,11	117,7	160

Aminoácido	Abreviatura de una letra	Masa ^a (dalton)	Volumen ^b (Å ³)	Área de superficie accesible ^c (Å ²)
Ácido aspártico (Asp)	D	115,09	111,1	150
Cisteína (Cys)	C	103,14	108,5	135
Glutamina (Gln)	Q	128,14	143,9	180
Ácido glutámico (Glu)	E	129,12	138,4	190
Glicina (Gly)	G	57,06	60,1	75
Histidina (His)	H	137,15	153,2	195
Isoleucina (Ile)	I	113,17	166,7	175
Leucina (Leu)	L	113,17	166,7	170
Lisina (Lys)	K	128,18	168,6	200
Metionina (Met)	M	131,21	162,9	185
Fenilalanina (Phe)	F	147,18	189,9	210
Prolina (Pro)	P	97,12	122,7	145
Serina (Ser)	S	87,08	89,0	115
Treonina (Thr)	T	101,11	116,1	140
Triptófano (Trp)	W	186,21	227,8	255
Tirosina (Tyr)	Y	163,18	193,6	230
Valina (Val)	V	99,14	140,0	155

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

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

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

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

15

20

TABLA 2: CONJUNTOS EJEMPLARES DE MUTACIONES QUE FORMAN LOS BOTONES Y OJALES CORRESPONDIENTES

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

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

En algunos modos de realización, un polipéptido de inmunoglobulina comprende un dominio CH3 que comprende una

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

Después de la mutación del ADN como se analiza anteriormente, los polinucleótidos que codifican polipéptidos de inmunoglobulina modificada con una o más mutaciones que forman los botones u ojales correspondientes se pueden expresar y purificar usando técnicas recombinantes estándar y sistemas celulares conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 5.731.168; 5.807.706; 5.821.333; 7.642.228; 7.695.936; 8.216.805; la publicación de EE. UU. n.º 2013/0089553; y Spiess *et al.*, *Nature Biotechnology* 31: 753-758, 2013. Se pueden producir polipéptidos de inmunoglobulina modificada usando células huésped procariontas, tal como *E. coli*, o células huésped eucariotas, tales como células CHO. Los polipéptidos de inmunoglobulina que portan los botones y ojales correspondientes se pueden expresar en células huésped en cocultivo y purificar conjuntamente como un heteromultímero, o se pueden expresar en cultivos individuales, purificar por separado y ensamblar *in vitro*. En algunos modos de realización, dos cepas de células huésped bacterianas (una que expresa un polipéptido de inmunoglobulina con un botón y la otra que expresa un polipéptido de inmunoglobulina con un ojal) se cocultivan usando técnicas de cultivo bacteriano estándar conocidas en la técnica. En algunos modos de realización, las dos cepas se pueden mezclar en una proporción específica, por ejemplo, para lograr niveles de expresión iguales en cultivo. En algunos modos de realización, las dos cepas se pueden mezclar en una proporción de 50:50, 60:40 o 70:30. Después de la expresión del polipéptido, las células se pueden lisar conjuntamente y se pueden extraer las proteínas. Las técnicas estándar conocidas en la técnica que permiten medir la abundancia de especies homomultiméricas frente a heteromultiméricas pueden incluir cromatografía de exclusión por tamaño. En algunos modos de realización, cada polipéptido de inmunoglobulina modificada se expresa por separado usando técnicas recombinantes estándar, y se pueden ensamblar conjuntamente *in vitro*. El ensamblaje se puede lograr, por ejemplo, purificando cada polipéptido de inmunoglobulina modificada, mezclándolos e incubándolos conjuntamente en igual masa, reduciendo los disulfuros (por ejemplo, mediante tratamiento con ditiotretitol), concentrando y reoxidando los polipéptidos. Los anticuerpos biespecíficos formados se pueden purificar usando técnicas estándar que incluyen cromatografía de intercambio catiónico y medir usando técnicas estándar que incluyen cromatografía de exclusión por tamaño. Para una descripción más detallada de estos procedimientos, véase Spiess *et al.*, *Nat. Biotechnol* 31:753-8, 2013. En algunos modos de realización, los polipéptidos de inmunoglobulina modificada se pueden expresar por separado en células CHO y ensamblar *in vitro* usando los procedimientos descritos anteriormente.

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Es típico que la primera región constante de la cadena pesada (CH1) contenga el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones con la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad al ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en modos de realización en los que proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las proporciones no son de particular importancia.

En un modo de realización de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones indeseadas de cadenas de inmunoglobulina, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera fácil de separación. Este enfoque se divulga en el documento WO 94/04690. Para más detalles de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en el documento WO96/27011, se puede genomanipular la interfase entre un par de moléculas de anticuerpo para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. Una interfase comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo las cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, se puede acoplar uno de los anticuerpos en el heteroconjugado a avidina, el otro a biotina. Por ejemplo, se han propuesto dichos anticuerpos para dirigir células del sistema inmunitario a células indeseadas (patente de EE. UU. n.º 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por el VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Se pueden preparar anticuerpos heteroconjugados usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se divulgan en la patente de EE. UU. n.º 4.676.980, junto con varias técnicas de reticulación.

En la literatura también se han descrito técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando un enlace químico. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente que forma complejos con ditioi arsenito de sodio para estabilizar los ditioles vecinos y evitar la formación de disulfuro intermolecular. A continuación, los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). A continuación, uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte en Fab'-tioi mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

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

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

Otra técnica para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico es el "acoplador de linfocitos T biespecífico" o enfoque BiTE® (véanse, por ejemplo, los documentos WO2004/106381, WO2005/061547, WO2007/042261 y WO2008/119567). Este enfoque utiliza dos dominios variables de anticuerpos dispuestos en un único polipéptido. Por ejemplo, una cadena polipeptídica única incluye dos fragmentos Fv monocatenarios (scFv), teniendo cada uno de ellos un dominio de la cadena pesada variable (V_H) y uno de la cadena ligera variable (V_L) separados por un conector polipeptídico de una longitud suficiente para permitir la asociación intramolecular entre los dos dominios. Este polipéptido único incluye además una secuencia espaciadora polipeptídica entre los dos fragmentos scFv. Cada scFv reconoce un epítipo diferente, y estos epítipos pueden ser específicos para diferentes tipos de células, de modo que las células de dos tipos de células diferentes se acercan o anclan cuando cada scFv se acopla con su epítipo afín. Un modo de realización particular de este enfoque incluye un scFv que reconoce un antígeno de la superficie celular expresado por una célula inmunitaria, por ejemplo, un polipéptido CD3 en un linfocito T, enlazado a otro scFv que reconoce un antígeno de la superficie celular expresado por una célula diana, tal como una célula cancerosa o tumoral.

Como es un polipéptido único, el acoplador de linfocitos T biespecífico se puede expresar usando cualquier sistema de expresión de células procariotas o eucariotas conocido en la técnica, por ejemplo, una línea celular CHO. Sin embargo, pueden ser necesarias técnicas de purificación específicas (véase, por ejemplo, el documento EP1691833) para separar acopladores de linfocitos T biespecíficos monoméricos de otras especies multiméricas, que pueden tener actividades biológicas distintas de la actividad prevista del monómero. En un esquema de purificación ejemplar, una solución que contiene polipéptidos secretados se somete en primer lugar a una cromatografía de afinidad por metales, y los polipéptidos se eluyen con un gradiente de concentraciones de imidazol. Este eluido se purifica además usando cromatografía de intercambio aniónico, y los polipéptidos se eluyen usando un gradiente de concentraciones de cloruro de sodio. Finalmente, este eluido se somete a cromatografía de exclusión por tamaño para separar monómeros de especies multiméricas.

La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V_L)

mediante un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, se obliga a que los dominios V_H y V_L de un fragmento se emparejen con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha informado de otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico mediante el uso de dímeros de Fv monocatenario (sFv). Véase, Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

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

10 **Anticuerpos conjugados o modificados de otro modo**

El anticuerpo usado en los procedimientos o incluido en los artículos de fabricación en el presente documento se conjuga opcionalmente con un agente citotóxico. Por ejemplo, el anticuerpo se puede conjugar con un fármaco como se describe en el documento WO2004/032828.

Los agentes quimioterápicos útiles en la generación de dichos conjugados anticuerpo-agente citotóxico se han descrito anteriormente.

Los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas, tales como una calicheamicina, una maytansina (patente de EE. UU. n.º 5.208.020), un tricoteno y CC1065 también se contemplan en el presente documento. En un modo de realización de la invención, el anticuerpo se conjuga con una o más moléculas de maytansina (por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 moléculas de maytansina por molécula de anticuerpo). La maytansina se puede convertir, por ejemplo, en May-SS-Me, que se puede reducir a May-SH3 y reaccionar con anticuerpo modificado (Chari *et al.*, *Cancer Research* 52: 127-131 (1992)) para generar un conjugado maytansinoide-anticuerpo.

De forma alternativa, el anticuerpo se conjuga con una o más moléculas de calicheamicina. Los antibióticos de la familia de calicheamicina pueden producir roturas en el ADN bicatenario en concentraciones subpicomolares. Los análogos estructurales de calicheamicina que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ_1 (Hinman *et al.*, *Cancer Research* 53: 3336-3342 (1993) y Lode *et al.*, *Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998)).

Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que se pueden usar incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos de no unión de la toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

La presente invención contempla además anticuerpos conjugados con un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa tal como una desoxirribonucleasa; DNasa).

Está disponible una variedad de isótopos radioactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radioactivos de Lu.

Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se pueden preparar usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como 3-(2-piridilditiol)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina, como se describe en Vitetta *et al.*, *Science* 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionúclido al anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El conector puede ser un "conector escindible" que facilite la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede usar un conector lábil en ácido, un conector sensible a peptidasa, un conector de dimetilo o un conector que contiene disulfuro (Chari *et al.*, *Cancer Research* 52: 127-131 (1992)).

De forma alternativa, se puede hacer una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y el agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos.

Aún en otro modo de realización, el anticuerpo se puede conjugar con un "receptor" (tal como estreptavidina) para su utilización en la preselección tumoral en el que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la retirada del conjugado no unido de la circulación usando un agente de aclaramiento y, a continuación la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un

radionucleótido).

Los anticuerpos de la presente invención también se pueden conjugar con una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterápico de peptidilo, véase el documento WO 81/01145) en un fármaco antineoplásico activo. Véase, por ejemplo, el documento WO 88/07378 y la patente de EE. UU. n.º 4.975.278.

El componente enzimático de dichos conjugados incluye cualquier enzima que pueda actuar sobre un profármaco de tal manera que lo convierta en su forma citotóxica más activa.

Las enzimas que son útiles en el procedimiento de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina, útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa, útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa, útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco antineoplásico, 5-fluorouracilo; proteasas, tales como proteasa de *Serratia*, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácidos; enzimas que escinden hidratos de carbono, tales como β -galactosidasa y neuraminidasa, útiles para convertir profármacos glucosilados en fármacos libres; β -lactamasa, útil para convertir fármacos derivatizados con β -lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasas, tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos amínicos con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. De forma alternativa, se pueden usar anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "accimas", para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey, *Nature* 328: 457-458 (1987)). Los conjugados anticuerpo-accima se pueden preparar como se describe en el presente documento para el suministro de la accima a una población de células tumorales.

Las enzimas de la presente divulgación se pueden unir covalentemente al anticuerpo mediante técnicas bien conocidas en la técnica, tales como el uso de los reactivos de reticulación heterobifuncionales analizados anteriormente. De forma alternativa, las proteínas de fusión que comprenden al menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención enlazado a al menos una parte funcionalmente activa de una enzima de la divulgación se pueden construir usando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Neuberger *et al.*, *Nature*, 312: 604-608 (1984)).

Otras modificaciones del anticuerpo se contemplan en el presente documento. Por ejemplo, el anticuerpo se puede enlazar a uno de una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. En algunos modos de realización, los fragmentos de anticuerpos, tales como Fab', se enlazan a una o más moléculas de PEG.

Los anticuerpos divulgados en el presente documento también se pueden formular como liposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante procedimientos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030 (1980); patentes de EE. UU. n.º 4.485.045 y 4.544.545; y el documento WO97/38731 publicado el 23 de octubre de 1997. Se divulgan liposomas con tiempo en circulación potenciado en la patente de EE. UU. n.º 5.013.556.

Se pueden generar liposomas útiles en particular mediante el procedimiento de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Se extruyen liposomas a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Se pueden conjugar fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención con los liposomas como se describe en Martin *et al.* *J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982) por medio de una reacción de intercambio de disulfuro. Opcionalmente un agente quimioterápico está contenido dentro del liposoma. Véase Gabizon *et al.*, *J. National Cancer Inst.* 81(19):1484(1989).

Variantes de anticuerpos

Se contemplan una modificación/modificaciones en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia aminoacídica del anticuerpo se preparan introduciendo cambios nucleotídicos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo, o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se realiza cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos postraduccionales del anticuerpo, tales como cambiar el número o posición de sitios de glucosilación.

Un procedimiento útil para la identificación de determinados residuos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferentes para la mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe por Cunningham and Wells *Science*, 244:1081-1085 (1989). Aquí, un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos

cargados, tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) se identifica y reemplaza por un aminoácido neutro o cargado negativamente (lo más preferentemente alanina o polialanina) para que afecten a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Esas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan, a continuación, introduciendo variantes adicionales u otras en, o para, los sitios de sustitución. Por tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia aminoacídica está predeterminado, la naturaleza de la mutación *per se* no está necesariamente predeterminada. Por ejemplo, para analizar el funcionamiento de una mutación en un sitio dado, se realiza una mutagénesis aleatoria o por barrido de Ala en el codón o región diana y se criban las variantes de anticuerpo expresadas para determinar la actividad deseada.

5
10
15 Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxiterminales que varían en longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuenciales de residuos aminoacídicos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo de una enzima o un polipéptido que incrementa la semivida en suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución aminoacídica. Estas variantes tienen al menos un residuo aminoacídico en la molécula de anticuerpo reemplazado por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución de anticuerpo de los anticuerpos incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones en FR. Se muestran sustituciones conservadoras en la tabla 3 bajo el encabezado "sustituciones preferentes". Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se pueden introducir más cambios sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la tabla 3, y cribar los productos.

25 **TABLA 3: SUSTITUCIONES AMINOACÍDICAS CONSERVADORAS**

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

30 Se consiguen modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieran significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en el área de sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con las similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en *Biochemistry*, segunda ed., pp. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

35 (1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) polares no cargados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) ácidos: Asp (D), Glu (E)

(4) básicos: Lys (K), Arg (R), His(H)

5 De forma alternativa, los residuos naturales se pueden dividir en grupos basados en propiedades de cadena lateral comunes:

(1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

10 (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

15 (4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

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

Cualquier residuo de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo también se puede sustituir, en general, con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir la reticulación anómala. Por el contrario, se puede(n) añadir enlace(s) de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (en particular, si el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Un tipo de variante de sustitución preferente en particular implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo original. En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para su desarrollo adicional tendrá(n) propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo original a partir del que se generan. Una manera conveniente de generar dichas variantes de sustitución es la maduración de la afinidad usando presentación en fagos. En resumen, se mutan varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de aminoácido en cada sitio. Las variantes de anticuerpo generadas así se presentan de una forma monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetadas en cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se criban a continuación por su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se divulga en el presente documento. Para identificar los sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación, se puede realizar mutagénesis por barrido de alanina para identificar los residuos de la región hipervariable que contribuyan significativamente a la unión a antígeno. De forma alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos cercanos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas detalladas en el presente documento. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se criba como se describe en el presente documento y se pueden seleccionar anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes para su desarrollo adicional.

45 Otro tipo de variante de aminoácidos del anticuerpo altera el patrón de glucosilación original del anticuerpo. Dicha alteración incluye la delección de uno o más restos glucídicos encontrados en el anticuerpo y/o adición de uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glucosilación de polipéptidos es típicamente con enlace N o bien con enlace O. Con enlace N se refiere al acoplamiento del resto glucídico a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para el acoplamiento enzimático del resto glucídico a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación con enlace O se refiere al acoplamiento de uno de los glúcidos N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, lo más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxi prolina o 5-hidroxisilina.

La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se logra convenientemente alterando la secuencia aminoacídica de tal manera que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glucosilación con enlaces N). La alteración también se puede realizar mediante la adición de, o sustitución con, uno o más residuos de serina o treonina con respecto a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación con enlace O).

Si el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato unido a la misma. Por ejemplo, los anticuerpos con una estructura de carbohidratos maduros que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo se describen en la solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2003/0157108 A1 (Presta, L.); véase también el documento

US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd) sobre una composición de anticuerpo CD20. Se referencian anticuerpos con una *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) de bisección en el carbohidrato unido a una región Fc del anticuerpo en el documento WO03/011878, Jean-Mairet *et al.* y la patente de EE. UU. n.º 6.602.684, Umana *et al.* Se informa de anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo en el documento WO97/30087 (Patel *et al.*); véanse también los documentos WO98/58964 (Raju, S.) y WO99/22764 (Raju, S.) referentes a anticuerpos con carbohidratos alterados unidos a la región Fc de los mismos.

En algunos modos de realización, la variante de glucosilación en el presente documento comprende una región Fc, en la que una estructura glucídica unida a la región Fc carece de fucosa. Dichas variantes tienen una función ADCC mejorada. Opcionalmente, la región Fc comprende además una o más sustituciones aminoacídicas en la misma que mejoran adicionalmente la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración Eu de residuos). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con anticuerpos "desfucosilados" o "carentes de fucosa" incluyen: la solicitud de patente de EE. UU. N.º US 2003/0157108 A1, Presta, L.; el documento WO 00/61739A1; el documento WO01/29246A1; el documento US2003/0115614A1; el documento US2002/0164328A1; el documento US2004/0093621A1; el documento US2004/0132140A1; el documento US2004/0110704A1; el documento US2004/0110282A1; el documento US2004/0109865A1; el documento WO03/085119A1; el documento WO03/084570A1; el documento WO2005/035778; el documento WO2005/035586 (que describen la inhibición de ARN (ARNi) de fucosilación); Okazaki *et al.*, *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares que producen anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lec 13 carentes de fucosilación de proteínas (Ripka *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2003/0157108 A1, Presta, L.; y documento WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente en el ejemplo 11) y líneas celulares atenuadas, tales como células CHO con el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, atenuado (Yamane-Ohnuki *et al.*, *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)).

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de las variantes de secuencia de aminoácidos de origen natural) o la preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigida a sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis de módulo de una variante anterior preparada o una versión no variante del anticuerpo.

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, para potenciar la citotoxicidad celular dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede lograr introduciendo una o más sustituciones aminoacídicas en una región Fc de un anticuerpo. De forma alternativa o adicionalmente, se puede(n) introducir residuo(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. Por tanto, el anticuerpo homodimérico generado puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una destrucción celular mediada por el complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementadas. Véase Caron *et al.*, *J. Exp Med.* 176:1191-1195 (1992) y Shopes, B. *J. Immunol.* 148:2918-2922 (1992). También se pueden preparar anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada usando agentes de reticulación heterobifuncionales como se describe en Wolff *et al.*, *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). De forma alternativa, se puede genomanipular un anticuerpo que tenga regiones Fc dobles y, de este modo, pueda tener capacidades de lisis mediada por el complemento y de ADCC potenciadas. Véase Stevenson *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989).

El documento WO 00/42072 (Presta, L.) describe anticuerpos con función ADCC mejorada en presencia de células efectoras humanas, donde los anticuerpos comprenden sustituciones aminoacídicas en la región Fc de los mismos. En algunos modos de realización, el anticuerpo con ADCC mejorada comprende sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc. En algunos modos de realización, la región Fc alterada es una región Fc de IgG1 humana que comprende o consiste en sustituciones en una, dos o tres de estas posiciones.

Los anticuerpos con unión a C1q y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alteradas se describen en el documento WO99/51642, patente de EE. UU. n.º 6.194.551B1, la patente de EE. UU. n.º 6.242.195B1, patente de EE. UU. n.º 6.528.624B1 y patente de EE. UU. n.º 6.538.124 (Idusogie *et al.*). Los anticuerpos comprenden una sustitución aminoacídica en una o más de las posiciones de aminoácido 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 y/o 334 de la región Fc de los mismos.

Para incrementar la semivida en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión al receptor de rescate en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe en la patente de EE. UU. 5.739.277, por ejemplo. Como se usa en el presente documento, el término "epítipo de unión a receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable de incrementar la semivida en suero *in vivo* de la molécula de IgG. Los anticuerpos con sustituciones en una región Fc de los mismos y semividas en suero incrementadas también se describen en el documento WO00/42072 (Presta, L.).

También se contemplan anticuerpos genomanipulados con tres o más (preferentemente cuatro) sitios de unión a antígeno funcionales (solicitud de patente de EE. UU. n.º US2002/0004587 A1, Miller *et al.*).

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

Vectores, células huésped y procedimientos recombinantes

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

Componente de secuencia señal

Un anticuerpo de la invención se puede producir recombinantemente no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o polipéptido maduro. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferentemente es una que se reconoce y se procesa (por ejemplo, se escinde por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para las células huésped procariontas que no reconocen y procesan una secuencia señal de anticuerpo natural, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procarionta seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en secuencias líder de fosfatasa alcalina, penicilinasa, lpp o enterotoxina II termoestable. Para la secreción en levadura, la secuencia señal natural se puede sustituir, por ejemplo, por la secuencia líder de invertasa de levadura, secuencia líder de factor α (incluyendo las secuencias líder de factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*) o la secuencia líder de la fosfatasa ácida, la secuencia líder de la glucoamilasa de *C. albicans* o la señal descrita en el documento WO 90/13646. En la expresión de células de mamífero están disponibles secuencias señal de mamífero, así como secuencias líder secretoras víricas, por ejemplo, la señal gD del herpes simple.

Origen de la replicación

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

Componente del gen de selección

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

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

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

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

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

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

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

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

Componente de promotor

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

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

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

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

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

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

Componente de elemento potenciador

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

Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión usados en células huésped eucariotas (levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, humanos o células nucleadas de otros organismos multicelulares) contendrán también las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están comúnmente disponibles de regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente, 3' de ADN o ADNc eucariotas o víricos. Estas regiones contienen segmentos nucleotídicos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión divulgado en el mismo.

Selección y transformación de células huésped

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

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

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores codificantes de anticuerpos. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura

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

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

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

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

Las células de vertebrados se pueden usar como huéspedes, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para su cultivo en suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR⁻ (Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); y líneas de células de mieloma, tales como NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), págs. 255-268.

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

Cultivo de las células huésped

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

el experto en la técnica.

Purificación de anticuerpo

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

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

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

Selección de anticuerpos biológicamente activos

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

45 Por ejemplo, para un anticuerpo anti-PDL1, las propiedades de unión a antígeno del anticuerpo se pueden evaluar en un ensayo que detecta la capacidad de unirse a PDL1. En algunos modos de realización, la unión del anticuerpo se puede determinar mediante ensayos de unión por saturación; ELISA; y/o competencia (por ejemplo, RIA), por ejemplo. Además, el anticuerpo se puede someter a otros ensayos de actividad biológica, por ejemplo, para evaluar su eficacia como agente terapéutico. Dichos ensayos son conocidos en la técnica y dependen del antígeno diana y del uso previsto del anticuerpo. Por ejemplo, los efectos biológicos del bloqueo de PD-L1 por el anticuerpo se pueden evaluar en linfocitos T CD8+, un modelo en ratón de virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) y/o un modelo de tumor singénico, por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 8.217.149.

55 Para detectar anticuerpos que se unen a un epítipo particular en el antígeno de interés (por ejemplo, aquellos que bloquean la unión del anticuerpo anti-PDL1 del ejemplo a PD-L1), se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado de rutina como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). De forma alternativa, el mapeo de epítipos, por ejemplo, como se describe en Champe *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270:1388-1394 (1995), se puede realizar para determinar si el anticuerpo se une a un epítipo de interés.

V. Formulaciones farmacéuticas

65 Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos usados de acuerdo con la presente invención se preparan para el almacenaje mezclando opcionalmente un anticuerpo que tenga el grado deseado de pureza con los vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16.ª edición, Osol, A., Ed., (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o de soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o

estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metilparabeno o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; glúcidos tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Las formulaciones liofilizadas adaptadas para administración subcutánea se describen en la patente de EE. UU. n.º 6.267.958 (Andya *et al.*). Dichas formulaciones liofilizadas se pueden reconstituir con un diluyente adecuado a una alta concentración de proteína y la formulación reconstituida se puede administrar por vía subcutánea al mamífero que se va a tratar en el presente documento.

También se contemplan formas cristalizadas del anticuerpo o anticuerpo. Véase, por ejemplo, el documento US 2002/0136719A1 (Shenoy *et al.*).

La formulación en el presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, en algunos modos de realización, aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además un agente citotóxico; agente quimioterápico; agente inmunosupresor; citocina; antagonista de o anticuerpo frente a citocina; factor de crecimiento; hormona; integrina; antagonista de o anticuerpo frente a integrina (por ejemplo, un anticuerpo frente a LFA-1 tal como efalizumab/RAPTIVA disponible comercialmente de Genentech, o un anticuerpo frente a integrina alfa 4 tal como natalizumab/TYSABRI®) disponible de Biogen Idec/Elan Pharmaceuticals, Inc.); fármaco de clase interferón tal como IFN-beta-1a (REBIF® y AVONEX®) o IFN-beta-1b (BETASERON®); un oligopéptido tal un acetato de glatirámero (COPAXONE®); un agente citotóxico, tal como mitoxantrona (NOVANTRONE®), metotrexato, ciclofosfamida, clorambucilo o azatioprina; inmunoglobulina intravenosa (gammaglobulina); fármaco reductor de linfocitos (por ejemplo, mitoxantrona, ciclofosfamida, Campath, anti-CD4 o cladribina); fármaco inmunosupresor no reductor de linfocitos (por ejemplo, micofenolato mofetilo (MMF) o ciclosporina); fármaco reductor de colesterol de la clase de "estatina"; estradiol; testosterona tratamiento de reposición hormonal; fármaco que trata síntomas secundarios o relacionados con la EM (por ejemplo, espasticidad, incontinencia, dolor, fatiga); un inhibidor de TNF; fármaco antirreumático modificador de la enfermedad (DMARD); fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE); corticosteroide (por ejemplo, metilprednisolona, prednisona, dexametasona o glucocorticoide); levotiroxina; ciclosporina A; análogo de somatostatina; antagonista de citocina; antimetabolito; agente inmunosupresor; antagonista de o anticuerpo frente a integrina (por ejemplo, un anticuerpo frente a LFA-1, tal como efalizumab o un anticuerpo frente a integrina alfa 4 tal como natalizumab); u otro anticuerpo/antagonista de superficie de linfocitos B; etc en la formulación. El tipo y las cantidades eficaces de dichos otros agentes dependen, por ejemplo, de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, del tipo de esclerosis múltiple que se está tratando y de los parámetros clínicos de los pacientes. Estos se usan, en general, en las mismas dosificaciones y con las mismas vías de administración que las usadas anteriormente en el presente documento o aproximadamente de un 1 a un 99 % de las dosificaciones empleadas hasta ahora.

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

Se pueden preparar preparaciones de liberación prolongada. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación prolongada incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación prolongada incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE. UU. n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -L-glutamato de etilo, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico.

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

VI. Administración

En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 se administra por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, tópica, oral, transdérmica, intraperitoneal, intraorbital, por implantación, por inhalación, por vía intratecal, intraventricular o intranasal. Se puede administrar una cantidad eficaz del anticuerpo anti-PD-L1 para la prevención o el tratamiento de la enfermedad. La dosificación apropiada del anticuerpo anti-PD-L1 se puede determinar en base al tipo de enfermedad que se va a tratar, el tipo de anticuerpo anti-PD-L1, la gravedad y la evolución de la enfermedad, el estado clínico del individuo, la anamnesis del individuo y la respuesta al tratamiento, y el criterio del médico especialista.

Como una propuesta general, la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo administrada al ser humano puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal del paciente, ya sea mediante una o más administraciones. En algunos modos de realización, el anticuerpo usado es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 45 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 40 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 35 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 25 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 15 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mg/kg o de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1 mg/kg administrados diariamente, por ejemplo. En algunos modos de realización, el anticuerpo se administra a 15 mg/kg. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. En un modo de realización, un anticuerpo anti-PDL1 descrito en el presente documento se administra a un ser humano a una dosis de aproximadamente 100 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 400 mg aproximadamente 500 mg, aproximadamente 600 mg, aproximadamente 700 mg, aproximadamente 800 mg, aproximadamente 900 mg, aproximadamente 1000 mg, aproximadamente 1100 mg, aproximadamente 1200 mg, aproximadamente 1300 mg o aproximadamente 1400 mg el día 1 de ciclos de 21 días. La dosis se puede administrar como una dosis única o como dosis múltiples (por ejemplo, 2 o 3 dosis), tal como infusiones. La dosis del anticuerpo administrado en un tratamiento combinado se puede reducir en comparación con la de un tratamiento único. La evolución de este tratamiento se supervisa fácilmente por técnicas convencionales.

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

Politerapias

En determinados modos de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 se administra junto con otro agente antineoplásico o tratamiento contra el cáncer. "Junto con" se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento además de otra modalidad de tratamiento. Como tal, "junto con" se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento antes, durante (tal como conjuntamente o simultáneamente) o después de la administración de la otra modalidad de tratamiento al individuo.

En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con una quimioterapia o agente quimioterápico. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con una radioterapia o agente radioterápico. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un tratamiento dirigido o agente terapéutico dirigido. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con una inmunoterapia o agente inmunoterápico, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal.

Sin quedar vinculado a teoría alguna, se cree que potenciar la estimulación de los linfocitos T, promoviendo una molécula coestimuladora activadora o inhibiendo una molécula coestimuladora negativa, puede promover la muerte de las células tumorales, tratando o retrasando de este modo la progresión del cáncer. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un agonista dirigido frente a una molécula coestimuladora activadora. En algunos modos de realización, una molécula coestimuladora activadora puede incluir CD40, CD226, CD28, OX40, GITR, CD137, CD27, HVEM o CD127. En algunos modos de realización, el agonista dirigido contra una molécula coestimuladora activadora es un anticuerpo agonista que se une a CD40, CD226, CD28, OX40, GITR, CD137, CD27, HVEM o CD127. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo

anti-PD-L1 junto con un antagonista dirigido frente a una molécula coestimuladora inhibidora. En algunos modos de realización, una molécula coestimuladora inhibidora puede incluir CTLA-4 (también conocido como CD152), PD-1, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3, B7-H3, B7-H4,IDO, TIGIT, MICA/B o arginasa. En algunos modos de realización, el antagonista dirigido frente a una molécula coestimuladora inhibidora es un anticuerpo antagonista que se une a CTLA-4, PD-1, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3, B7-H3, B7-H4,IDO, TIGIT, MICA/B o arginasa.

En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un antagonista dirigido frente a CTLA-4 (también conocido como CD152), por ejemplo, un anticuerpo bloqueante. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con ipilimumab (también conocido como MDX-010, MDX-101 o Yervoy®). En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con tremelimumab (también conocido como ticilimumab o CP-675.206). En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un antagonista dirigido frente a B7-H3 (también conocido como CD276), por ejemplo, un anticuerpo bloqueante. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con MGA271. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un antagonista dirigido frente a un TGF beta, por ejemplo, metelimumab (también conocido como CAT-192), fresolimumab (también conocido como GC1008) o LY2157299.

En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un tratamiento que comprende la transferencia adoptiva de un linfocito T (por ejemplo, un linfocito T citotóxico o CTL) que expresa un receptor antigénico quimérico (RAQ). En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un tratamiento que comprende la transferencia adoptiva de un linfocito T que comprende un receptor de TGF beta dominante negativo, por ejemplo, un receptor de TGF beta dominante negativo. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un tratamiento que comprende un protocolo HERCREEM (véase, por ejemplo, ClinicalTrials.gov Identifier NCT00889954).

En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un agonista dirigido frente a CD137 (también conocido como TNFRSF9, 4-1BB o ILA), por ejemplo, un anticuerpo activador. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con urelumab (también conocido como BMS-663513). En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un agonista dirigido frente a CD40, por ejemplo, un anticuerpo activador. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con CP-870893. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un agonista dirigido frente a OX40 (también conocido como CD134), por ejemplo, un anticuerpo activador. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PDL1 junto con un anticuerpo anti-OX40 (por ejemplo, AgonOX). En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un agonista dirigido frente a CD27, por ejemplo, un anticuerpo activador. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con CDX-1127. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un antagonista dirigido frente a indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO). En algunos modos de realización, el antagonista de IDO es 1-metil-D-triptófano (también conocido como 1-D-MT).

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

En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un inhibidor de la angiogénesis. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un anticuerpo dirigido frente a un VEGF, por ejemplo, VEGF-A. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con bevacizumab (también conocido como AVASTIN®, Genentech). En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un anticuerpo dirigido frente a angiopoyetina 2 (también conocida como Ang2). En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con MEDI3617.

En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un agente antineoplásico. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un agente dirigido a CSF-1R (también conocido como M-CSFR o CD115). En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con anti-CSF-1R (también conocido como IMC-CS4). En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PDL1 junto con un interferón, por ejemplo, interferón alfa o interferón gamma. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con Roferon-A (también conocido como interferón alfa-2a recombinante). En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con GM-CSF (también conocido como factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos humano recombinante, rhu GM-CSF, sargramostim o Leukine®). En algunos modos de realización, se puede administrar el

anticuerpo anti-PD-L1 junto con IL-2 (también conocido como aldesleucina o Proleukin®). En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con IL-12. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un anticuerpo dirigido a CD20. En algunos modos de realización, el anticuerpo dirigido a CD20 es obinutuzumab (también conocido como GA101 o Gazyva®) o rituximab. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un anticuerpo dirigido a GITR. En algunos modos de realización, el anticuerpo dirigido a GITR es TRX518.

En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con una vacuna contra el cáncer. En algunos modos de realización, la vacuna contra el cáncer es una vacuna peptídica contra el cáncer, que, en algunos modos de realización, es una vacuna peptídica personalizada. En algunos modos de realización, la vacuna contra el cáncer peptídica es una vacuna de péptido largo multivalente, péptido múltiple, cóctel de péptidos, péptido híbrido o células dendríticas pulsadas con péptidos (véase, por ejemplo, Yamada *et al.*, Cancer Sci, 104:14-21, 2013). En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un adyuvante. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un tratamiento que comprende un agonista de TLR, por ejemplo, poli-ICLC (también conocido como Hiltonol®), LPS, MPL u ODN CpG. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con el factor de necrosis tumoral (TNF) alfa. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con IL-1. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con HMGB1. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un antagonista de IL-10. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un antagonista de IL-4. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un antagonista de IL-13. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un antagonista de HVEM. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PDL1 junto con un agonista de ICOS, por ejemplo, por administración de ICOS-L o un anticuerpo agonista dirigido frente a ICOS. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un tratamiento dirigido a CX3CL1. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un tratamiento dirigido a CXCL9. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un tratamiento dirigido a CXCL10. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un tratamiento dirigido a CCL5. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un agonista de LFA-1 o ICAM1. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un agonista de selectina.

En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un tratamiento dirigido. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un inhibidor de B-Raf. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con vemurafenib (también conocido como Zelboraf®). En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con dabrafenib (también conocido como Tafinlar®). En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con erlotinib (también conocido como Tarceva®). En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un inhibidor de una MEK, tal como MEK1 (también conocida como MAP2K1) o MEK2 (también conocida como MAP2K2). En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con cobimetinib (también conocido como GDC-0973 o XL-518). En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con trametinib (también conocido como Mekinist®). En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un inhibidor de K-Ras. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un inhibidor de c-Met. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PDL1 junto con onartuzumab (también conocido como MetMAb). En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un inhibidor de Alk. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con AF802 (también conocido como CH5424802 o alectinib). En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un inhibidor de una fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K). En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con BKM120. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con idelalisib (también conocido como GS-1101 o CAL-101). En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con perifosina (también conocida como KRX-0401). En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un inhibidor de un Akt. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con MK2206. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con GSK690693. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un inhibidor de mTOR. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con sirilimus (también conocido como rapamicina). En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con temsirólimus (también conocido como CCI-779 o Torisel®). En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con everólimus (también conocido como RAD001). En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con ridaforólimus (también conocido como AP-23573, MK-8669 o deforólimus). En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con OSI-027. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con AZD8055. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con INK128. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con un inhibidor de PI3K/mTOR doble. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con XL765. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-

PDL1 junto con GDC-0980. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con BEZ235 (también conocido como NVP-BEZ235). En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con BGT226. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con GSK2126458. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con PF-04691502. En algunos modos de realización, se puede administrar el anticuerpo anti-PD-L1 junto con PF-05212384 (también conocido como PKI-587).

VII. Kits y artículos de fabricación

La divulgación proporciona además kits y artículos de fabricación que contienen materiales útiles para el tratamiento del cáncer de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento.

En algunos modos de realización, la divulgación proporciona una fabricación que comprende, envasados conjuntamente, una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-PD-L1 (o fragmento de unión a antígeno del mismo) y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y un marcador que indica que el anticuerpo anti-PD-L1 (o fragmento de unión a antígeno del mismo) o la composición farmacéutica está indicado para tratar sujetos con cáncer que tienen un nivel medio o bajo de metilación en CpG1 en la región promotora de PD-L1 o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 en una muestra que contiene células cancerosas del sujeto. En algunos modos de realización, el artículo de fabricación comprende además instrucciones para administrar el anticuerpo anti-PD-L1 (o fragmento de unión a antígeno del mismo) o composición farmacéutica a un sujeto con cáncer que tiene un nivel de metilación medio o bajo en CpG1 en la región promotora de PD-L1 o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 en una muestra que contiene células cancerosas del sujeto.

En algunos modos de realización, la divulgación proporciona una fabricación que comprende, envasados conjuntamente, una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-PD-L1 (o fragmento de unión a antígeno del mismo) y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y un marcador que indica que la administración del anticuerpo anti-PD-L1 (o fragmento de unión a antígeno del mismo) o la composición farmacéutica se basa en el paciente que tienen un nivel medio o bajo de metilación en CpG1 en la región promotora de PD-L1 o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 en una muestra que contiene células cancerosas del sujeto. En algunos modos de realización, el artículo de fabricación comprende además instrucciones para administrar el anticuerpo anti-PD-L1 (o fragmento de unión a antígeno del mismo) o composición farmacéutica a un sujeto con cáncer que tiene un nivel de metilación medio o bajo en CpG1 en la región promotora de PD-L1 o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 en una muestra que contiene células cancerosas del sujeto.

En algunos modos de realización, la divulgación proporciona una fabricación que comprende, envasados conjuntamente, una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-PD-L1 (o fragmento de unión a antígeno del mismo) y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y un marcador que indica que el anticuerpo anti-PD-L1 (o fragmento de unión a antígeno del mismo) o la composición farmacéutica se administra a un paciente seleccionado, en el que se ha descubierto que el sujeto tiene un nivel medio o bajo de metilación en CpG1 en la región promotora de PD-L1 o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 en una muestra que contiene células cancerosas del sujeto. En algunos modos de realización, el artículo de fabricación comprende además instrucciones para administrar el anticuerpo anti-PD-L1 (o fragmento de unión a antígeno del mismo) o composición farmacéutica a un sujeto con cáncer que tiene un nivel de metilación medio o bajo en CpG1 en la región promotora de PD-L1 o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 en una muestra que contiene células cancerosas del sujeto.

En algunos modos de realización, la divulgación proporciona un kit que comprende reactivos para medir el nivel de metilación en CpG1 en la región promotora de PD-L1 y/o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 en una muestra que contiene células cancerosas del sujeto e instrucciones para clasificar al sujeto como que tiene un nivel de metilación medio o bajo en CpG1 en la región promotora de PD-L1 y/o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1. En determinados modos de realización, el kit comprende además un anticuerpo anti-PD-L1 e instrucciones para administrar el anticuerpo anti-PD-L1 al sujeto si el sujeto tiene un nivel de metilación medio o bajo en CpG1 en la región promotora de PD-L1 y/o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1.

En algunos modos de realización de cualquiera de los kits o artículos de fabricación descritos en el presente documento, se ha descubierto que el sujeto tiene un nivel medio o bajo de metilación en CpG1 en la región promotora de PD-L1 y en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del gen PD-L1 en una muestra que contiene células cancerosas del sujeto.

En algunos modos de realización de cualquiera de los kits o artículos de fabricación descritos en el presente documento, el marcador indica que el grado de metilación en CpG1 en la región promotora de PD-L1 o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del PD-L1 se determina por secuenciación de ADN con bisulfito. En algunos modos de realización de cualquiera de los kits o artículos de fabricación descritos en el presente documento, el marcador indica que el grado de metilación en CpG1 en la región promotora de PD-L1 o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del PD-L1 se determina por secuenciación de próxima generación con bisulfito. En algunos modos de realización de cualquiera de los kits o artículos de fabricación descritos en el presente documento, el marcador indica que el grado de metilación en CpG1 en la región promotora de PD-L1 o en uno o más sitios de CpG en el intrón 1 del PD-L1 se

determina usando una matriz de chip de metilación (tal como la matriz INFINIUM® HumanMethylation450 BeadChip).

En algunos modos de realización, los kits o artículos de fabricación proporcionados en el presente documento incluyen reactivos para detectar la infiltración de células inmunitarias en una muestra que contiene células cancerosas del sujeto.

En algunos modos de realización, los reactivos incluyen uno o más de los siguientes: un anticuerpo anti-CD16, un anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo anti-CD56, un anticuerpo anti-CD45, un anticuerpo anti-CD68, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-CD163 o anticuerpo anti-CD8. En algunos modos de realización, el reactivo es un anticuerpo anti-CD8. En algunos modos de realización, los kits o artículos de fabricación proporcionados en el presente documento comprenden además instrucciones para realizar un ensayo inmunohistoquímico (que incluye, pero no se limita a, inmunoelectrotransferencia, ELISA o citometría de flujo) para detectar infiltración de células inmunitarias en una muestra que contiene células cancerosas del sujeto. En algunos modos de realización, los kits o artículos de fabricación proporcionados en el presente documento comprenden además instrucciones para realizar un ensayo de análisis de expresión génica, que incluyen, pero no se limitan a PCR cuantitativa (qPCR), qRT-PCR, perfil de transcriptoma (tal como sec-ARN), análisis de micromatrices, secuenciación de próxima generación, etc.

En algunos modos de realización de cualquiera de los kits o artículos de fabricación proporcionados en el presente documento, el cáncer es cáncer de mama, cáncer de pulmón o cáncer de piel, incluyendo las formas metastásicas de esos cánceres. En determinados modos de realización, el cáncer de mama es carcinoma de mama. En algunos modos de realización, el cáncer de pulmón es carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón o carcinoma de células escamosas del pulmón. En determinados modos de realización, el cáncer de piel es melanoma, melanoma de extensión superficial, melanoma lentigo maligno, melanomas lentiginosos acrales, melanomas nodulares o carcinoma de piel.

En algunos modos de realización de cualquiera de los kits o artículos de fabricación, el anticuerpo anti-PD-L1 (o fragmento de unión a antígeno del mismo) incluido en el kit o artículo de fabricación es un anticuerpo anti-PD-L1 descrito en el presente documento. En algunos modos de realización de cualquiera de los kits o artículos de fabricación, el anticuerpo anti-PD-L1 (o fragmento de unión a antígeno del mismo) se selecciona del grupo que consiste en YW243.55.S70, MPDL3280A, MDX-1105 y MEDI4736. Otros anticuerpos anti-PD-L1 ejemplares (o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) que se pueden incluir en los artículos de fabricación proporcionados en el presente documento, o incluir en los artículos de fabricación o kits proporcionados en el presente documento, se describen en los documentos WO 2010/077634, WO 2007/005874, WO 2011/066389 y US 2013/034559.

Típicamente, un kit o artículo de fabricación comprende un recipiente y una ficha técnica o prospecto del envase en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas, etc. Los recipientes se pueden formar a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente posee o contiene el anticuerpo anti-PD-L1 (o fragmento de unión a antígeno del mismo) o la composición farmacéutica eficaz para tratar el cáncer y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un anticuerpo anti-PD-L1.

La ficha técnica o prospecto del envase indica que la composición se usa para tratar el cáncer en un paciente que padece el mismo con unas directrices específicas con respecto a las cantidades e intervalos de dosificación del anticuerpo y de cualquier otro fármaco que se proporcione. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

Opcionalmente, el artículo de fabricación en el presente documento comprende además un recipiente que comprende un agente distinto del anticuerpo para el tratamiento y que comprende además instrucciones sobre el tratamiento del paciente con dicho agente, siendo dicho agente, por ejemplo, un agente quimioterápico (tal como un agente quimioterápico descrito en otra parte en el presente documento), un agente citotóxico (tal como un agente citotóxico descrito en otra parte en el presente documento), etc.

Se ilustran más detalles de la invención por los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

Los ejemplos, que se pretende que sean puramente ejemplares de la invención y, por lo tanto, no se deben considerar que limitan la invención de ningún modo, también describen y detallan aspectos y modos de realización de la invención analizada anteriormente. Los anteriores ejemplos y la descripción detallada se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Ejemplo 1: Materiales y procedimientos

Los siguientes materiales y procedimientos se usaron en el ejemplo 2 a continuación.

5 Líneas celulares y condiciones de cultivo

Las líneas celulares de NSCLC se obtuvieron del American Type Cell Culture (ATCC) o de fuentes académicas y se cultivaron en medio RPMI 1640 complementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % y L-glutamina 2 mM. Las células se separaron para división y/o análisis experimental después de un lavado con PBS e incubación con medio de separación de Accutase (Sigma). Las células se trataron con tricostatina A 0,1 mM ("TSA", Sigma) y/o 1 ng/ml de interferón gamma (IFN γ) durante 24 horas y 5-azacitidina-dC 1 mM (5-aza-dC, Sigma), durante 3 días *qd* (es decir, una vez al día) o 6 días *q2d* (es decir, cada dos días).

15 Muestras tumorales

Las muestras tumorales de archivo de pacientes con NSCLC se obtuvieron de colecciones de proveedores aprobadas por el IRB de The MT Group, Cureline, Inc, Cambridge BioSource, Tristar Technology Group LLC o ClinPath Advisors.

20 Análisis de ADN/ARN

El tampón RLT Plus (Qiagen) se usó para lisar las células para la extracción de ARN y ADN del mismo lisado usando el AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen). La expresión de ARN se analizó por micromatriz en la matriz GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix) por Asuragen, Inc, y por qPCR usando ensayos de expresión génica TaqMan (Life Technologies). Los datos se analizaron usando Genomics Suite (Partek), Spotfire (TIBCO), JMP (SAS) e IPA (Ingenuity). El ADN se analizó en la INFINIUM $\text{\textcircled{R}}$ HumanMethylation450 BeadChip (Illumina). El ADN se modificó con bisulfito usando el kit de metilación Zymo DNA Gold (Zymo Research) y se amplificó con cebadores de secuenciación específicos con bisulfito dirigidos a la región promotora de CD274. Los productos de PCR se subclonaron con TA y se secuenciaron usando procedimientos estándar (ABI). Los archivos de secuencia ABI se analizaron usando el programa informático BIQ Analyzer (C. Bock).

30 Análisis de proteínas

Los lisados de proteínas se generaron usando el tampón de extracción celular (Life Technologies), complementado con comprimidos de inhibidor de proteasa SigmaFAST (Sigma) y mezcla inhibidora de fosfatasa 1 y 2 (Sigma). Los lisados se centrifugaron a 20.000 x g durante 10 minutos a 4 °C, y los sobrenadantes se retiraron a continuación para su análisis por inmunoelectrotransferencia (WB). Las muestras se trataron con tampones NuPage Novex LDS y SRA (Life Technologies) y se cargaron en un gel Bis-Tris (Life Technologies) junto con el estándar de peso molecular SeeBlue Plus2 (Life Technologies). Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa usando el sistema iBlot (Life Technologies) y a continuación se bloquearon con tampón de bloqueo Odyssey (LI-COR) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los geles se tiñeron con anticuerpos frente a PD-L1 humana (interno), β -actina (Sigma); p/t STAT1, p-STAT3-Y705, p-STAT3-S727 y t-STAT3 (todos de Cell Signaling) diluidos en tampón de bloqueo Odyssey + Tween-20 al 0,01 %. Los anticuerpos primarios se detectaron de anticuerpos secundarios de LI-COR en tampón de bloqueo Odyssey + Tween-20 al 0,01 % + SDS al 0,001 % y se analizaron en el sistema Odyssey CLx (LI-COR).

45 Para el análisis FACS, las células se separaron y a continuación se lavaron dos veces en tampón de tinción de FBS (BD Biosciences). A continuación, las células se tiñeron con anti-PD-L1 humano conjugado con PE o bien control de isotipo (BD Biosciences) y a continuación, se lavaron y analizaron en el analizador FACSCanto II (BD Biosciences).

50 Los análisis de inmunohistoquímica (IHQ) se realizaron como se describe en Herbst *et al.* (2014) *Nature* 515, 563-574.

Inmunoprecipitación con cromatina (ChIP, Active Motif)

55 Las líneas celulares de NSCLC se cultivaron hasta una confluencia apropiada, y las células tratadas se fijaron con formaldehído al 1 % durante 15 min y se desactivaron con glicina 0,125 M. La cromatina se aisló mediante la adición de tampón de lisis y homogeneización con un homogeneizador Dounce. Los lisados se trataron con ultrasonido y el ADN se cortó a una longitud promedio de 300-500 pb. El ADN genómico (entrada) se preparó tratando alícuotas de cromatina con RNasa, proteinasa K y calor para la eliminación de la reticulación. El tratamiento se siguió de precipitación con etanol. Los sedimentos de ADN genómico se resuspendieron y el ADN resultante se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop. La extrapolación al volumen de cromatina original permitió la cuantificación del rendimiento total de cromatina.

65 Una alícuota de cromatina (30 μ g) se aclaró previamente con microesferas de agarosa de proteína A (Invitrogen). Las regiones de ADN genómico de interés se aislaron usando 4 μ g de anticuerpo frente a STAT1 (Santa Cruz, n.º cat sc-345) y STAT3 (Santa Cruz, sc-482). Los complejos se lavaron, se eluyeron de las microesferas con tampón SDS y se sometieron a tratamiento con RNasa y proteinasa K. Los reticulados se revirtieron por incubación durante la noche a

65 °C, y el ADN inmunoprecipitado con cromatina (ChIP) se purificó por extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol.

La calidad del enriquecimiento de ChIP se sometió a ensayo mediante qPCR usando cebadores frente a los sitios de control STAT1 y STAT3 candidatos. Las reacciones qPCR se llevaron a cabo por triplicado usando SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Las señales resultantes se normalizaron para determinar la eficacia del cebador llevando a cabo qPCR para cada par de cebadores usando ADN de entrada.

Secuenciación con ChIP (Illumina, Active Motif)

Las colecciones de secuenciación de Illumina se prepararon a partir de los ADN de ChIP y entrada mediante las etapas enzimáticas consecutivas estándar de pulido final, adición de dA y ligadura de adaptador. Después de una etapa final de amplificación por PCR, las colecciones de ADN resultantes se cuantificaron y secuenciaron en HiSeq 2500 o NexSeq 500. Las secuencias (lecturas de 50 nt, extremo único o lecturas de 75 nt, extremo único) se alinearon al genoma humano (hg19) usando el algoritmo BWA. Las secuencias alineadas se extendieron cada una *in silico* en sus extremos 3' a una longitud de 200 pb, es decir, la longitud promedio del fragmento genómico en la colección seleccionada por tamaño, y se asignaron a periodos de 32 nt a lo largo del genoma. Los histogramas resultantes ("mapas de señales" genómicos) se almacenaron en archivos bigWig. Las localizaciones de los picos se determinaron usando el algoritmo MACS (v1.4.2.) con un valor de corte de valor de $p = 1 \times 10^{-7}$. Los mapas de señales y las localizaciones de los picos se usaron como datos de entrada al programa de análisis patentado de Active Motif, que crea tablas de Excel que contienen información detallada sobre la comparación de muestras, métricas de picos, localizaciones de picos y anotaciones génicas.

Secuenciación de próxima generación con bisulfito (Bisulfite NGS, Active Motif)

Las líneas celulares de NSCLC analizadas por ChIP-Seq también se analizaron por medio de secuenciación de próxima generación (NGS) con bisulfito para determinar el estado de metilación del promotor de PD-L1. Los cebadores de PCR para las regiones diana (hebra positiva) se diseñaron con el programa informático MethPrimer (world-wide-web.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi). Se usaron cebadores para amplificar las regiones diana a partir de ADN genómico convertido con bisulfito. Para cada una de las 6 muestras, se agruparon cantidades aproximadamente iguales de los 9 productos de PCR, se concatemerizaron, se sometieron a ultrasonido a una longitud de fragmento promedio de 150-300 pares de bases y se procesaron en colecciones de secuenciación Illumina con código de barras estándar. Las colecciones de secuenciación Illumina se secuenciaron en NextSeq 500. Las lecturas de secuenciación se analizaron usando el programa de alineación bismark (v 0.7.7) (world-wide-web.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/bismark/). Los chr6 y chr9 humanos (ensamblaje hg19) se usaron como secuencias de referencia. Los informes de alineación de Bismark se compilan en el archivo "2674Genentech bismark reports.xlsx". Se analizaron entre 5,1 y 7,4 millones de lecturas por muestra.

Ejemplo 2: Análisis de la metilación y expresión de PD-L1

El ARN y el ADN se extrajeron de 91 líneas celulares de NSCLC y se sometieron a prueba para determinar los niveles de expresión de PD-L1 (sec-ARN, recuento log2) y la metilación del promotor (matriz INFINIUM®). Dos de los cinco sitios de CpG (es decir, CpG1 - CpG5) mostraron patrones de metilación diferencial que se correlacionaron inversamente con la expresión de ARN de PD-L1. Véase la **FIG. 1**. El primer sitio de CpG, es decir, CpG1, mostrado en la **FIG. 1** como el sitio de CpG más a la izquierda, se encontró en el sitio del promotor de PD-L1 predicho en dirección 5' del TSS. El segundo sitio de CpG, es decir, CpG5, mostrado en la **FIG. 1** como el sitio de CpG más a la derecha, se localizó dentro del intrón 1. Se trazó un mapa de calor de cada valor beta promedio de CpG 1-5 con respecto a su localización en el transcrito CD274 NM_014143, con su mapa de calor de expresión adjunto situado a la derecha del mapa del promotor de PD-L1 en el locus 9p24.1. La **FIG. 1** muestra los mapas de calor de expresión y metilación de la región promotora de PD-L1 para cada línea celular sometida a prueba. Los mapas de calor se ordenaron por expresión de ARN de PD-L1, de alta (rojo) a baja (verde). Se encontraron líneas celulares con alta expresión de PD-L1 con baja metilación (azul).

Los datos tumorales del Atlas del genoma del cáncer (TCGA 3,0) se analizaron para estudiar además la asociación entre la expresión de PD-L1 (sec-ARN, recuento log2) frente a la metilación del ADN (matriz INFINIUM®, valor de m promedio de CpG1 y CpG5). Se incluyeron tumores de cuatro colecciones: adenocarcinoma de pulmón (LUAD), carcinoma de células escamosas de pulmón (LUSC), cáncer de mama (BRCA) y carcinoma de piel (SKCM). También se observaron correlaciones inversas entre la expresión de ARN y la metilación en estos análisis de tumores de pacientes: LUAD = -0,33, LUSC = -0,38, BRCA = -0,4 y SKCM = -0,25. Las muestras tumorales se subagruparon y colorearon además por expresión de CD8A (sec-ARN, mediana del valor de corte) para analizar además la expresión de PD-L1 por la cantidad de infiltrado inmunitario en cada tumor. Los tumores con una mayor expresión de CD8A tendieron a tener también una mayor expresión de PD-L1 y una menor metilación del promotor de PD-L1. Véanse Véanse las **FIGS. 2A** (adenocarcinoma de pulmón), **2B** (carcinoma de células escamosas de pulmón), **2C** (cáncer de mama) y **2D** (carcinoma de piel).

Un número selecto de líneas celulares de NSCLC sometidas a prueba para determinar los niveles de expresión de

PD-L1 y la metilación del promotor (véase la **FIG. 1**) se analizaron además para investigar la relación entre la metilación del promotor de PD-L1 y la expresión de PD-L1 *in vitro*. Las líneas celulares elegidas para su análisis adicional se seleccionaron en base a los niveles de metilación promedio en CpG1 y CpG5. Las líneas celulares H661, LXFL529 y A427 se clasificaron como con niveles de metilación promedio altos en CpG1 y CpG5; las líneas celulares H2073 y H322T se clasificaron como con niveles de metilación promedio medios en CpG1 y CpG5; y la línea celular H1993 se clasificó como con niveles de metilación promedio bajos en CpG1 y CpG5.

Las células de cada una de las líneas celulares se expusieron a una de cinco condiciones: (1) sin tratamiento; (2) tratamiento con 5-azacitidina-dC 1 mM (5-aza-dC, un agente de desmetilación de ADN); (3) tratamiento con tricostatina A 0,1 mM (TSA, una histona desacetilasa de mamífero clase I y clase II); (4) tratamiento con 1 ng/ml de interferón gamma (IFN γ); o (5) tratamiento con una combinación de 5-aza-dC, TSA e IFN γ . La expresión de ARN de PD-L1 se midió a continuación por qRT-PCR. Como se muestra en la **FIG. 3**, la expresión de ARN de PD-L1 incrementó en H661, LXFL529, A427 y H322T después de 3 días de tratamiento con 5-aza-dC. Solo H322T demostró un incremento en la expresión de ARN de PD-L1 después del tratamiento con TSA. El tratamiento con la combinación de 5-aza-dC, TSA e IFN γ dio como resultado un incremento de la expresión de PD-L1 en todas las líneas, excepto H1993 (es decir, la línea celular que tiene niveles de metilación promedio bajos en CpG1 y CpG5). H1993 ya demostró un alto nivel de expresión de PD-L1 de referencia.

Cuatro líneas celulares, es decir, A427 (en la que CpG1 y CpG5 tienen un nivel alto de metilación); H322T (en la que CpG1 y CpG5 tienen un nivel medio de metilación, y en la que la expresión de PD-L1 es inducible por tratamiento con IFN γ); H292 (en la que CpG1 y CpG5 tienen un nivel bajo de metilación) y H358 (en la que CpG1 y CpG5 tiene un nivel bajo de metilación) se seleccionaron para su uso en experimentos para investigar además la relación del ARN de PD-L1 y la expresión de proteínas en presencia y ausencia de IFN γ . Cuando se estimula con IFN γ , A427, H322T, H292 y H358 mostraron incrementos en la inducción de ARN de PD-L1, independientemente de su expresión basal original. Véase la **FIG. 4A**. A427 y H292, que expresan ARN de PD-L1 a niveles bajos en ausencia de IFN γ , mostraron respuestas variables a la estimulación con IFN γ permaneciendo A427 bajo (a $0,012 \cdot 2^{-D_{CT}}$), mientras que H292 mostró un incremento en los niveles de ARN (a $0,102 \cdot 2^{-D_{CT}}$). El mayor cambio en la expresión de ARN de PD-L1 se observó en la línea H322T, incrementada de $0,018$ a $1,356 \cdot 2^{-D_{CT}}$. La línea celular H358, que ya mostraba altos niveles de expresión de PD-L1 de referencia y nivel de metilación bajo en CpG1 y CpG5, no mostró cambios significativos en su expresión de ARN después de la estimulación.

La expresión de la proteína PD-L1 se correlacionó débilmente con la expresión de ARN en este subconjunto de líneas celulares, tanto en el valor de referencia como después de la estimulación con IFN γ . A427 todavía no mostró casi ninguna expresión sobre el fondo por FACS con una mediana de la intensidad de fluorescencia normalizada (nMFI) de 20. H322T también mostró un bajo nivel de expresión de PD-L1 (nMFI de 107). Véase la **FIG. 4A**. H292 mostró una expresión de proteína significativamente mayor con una nMFI de 1580, y H358 demostró la mayor expresión de referencia (nMFI de 4204). Las cuatro líneas celulares mostraron niveles de proteína PD-L1 en superficie incrementados después del tratamiento con IFN γ . En la línea celular A427, la expresión de la proteína PD-L1 permaneció baja. En las líneas celulares H292 y H358, la expresión de la proteína PD-L1 se incrementó 3-4 veces, y en H322T, la expresión de la proteína PD-L1 se incrementó más de 48 veces en comparación con los niveles de referencia. De forma comparativa, los niveles de proteína PD-L1 en A427 después del tratamiento con IFN γ se incrementaron a los niveles previos al tratamiento observados en H322T. El tratamiento con IFN γ en H322T siguiente mostró que la expresión de la proteína PD-L1 es altamente inducible. Como se analiza anteriormente, los niveles de referencia de la proteína PD-L1 en H322T fueron bajos. Por el contrario, los niveles de proteína PD-L1 en H322T después del tratamiento con IFN γ fueron comparables a los niveles de proteína PD-L1 en H292 y H358 después del tratamiento con IFN γ .

A continuación, se realizaron inmunoelectrotransferencias para determinar si la vía de señalización IFN γ /JAK/STAT desempeña un papel en la inducción mediada por IFN γ del transcrito de PD-L1 y los niveles de proteína en A427, H322T, H292 y H358. En resumen, las células de A427, H322T, H292 y H358 estaban (a) sin tratar; (b) tratadas con IFN γ durante 30 minutos; o bien (c) tratadas con IFN γ durante 24 horas. A continuación, las células se procesaron en lisados de proteínas y se prepararon en geles, se transfirieron y se sondearon con los siguientes anticuerpos: (1) anti-fosfo-STAT1; (2) anti-total-STAT1; (3) anti-fosfo-STAT3-Y705; (4) anti-fosfo-STAT3-S727; (5) anti-total-STAT3; y (6) β -actina (control de carga). Las cuatro líneas celulares mostraron una activación de p-STAT1 fuerte con la siguiente estimulación con IFN γ , con p-STAT1 basal solo observado en H358. Véase la **FIG. 4B**. p-STAT3-Y705, el sitio de activación inicial para STAT3, se activó constitutivamente en H292 (después de 30 min de tratamiento con IFN γ) y H358, pero se perdió en H358 en 24 h después de la estimulación con IFN γ . STAT3 se activó además por las vías mTOR y MAPK en S727. La activación de la vía de señalización JAK/STAT se observó en todas las líneas celulares en 24 h, excepto en las células H358, que no mostraron la activación de p-STAT3-S727 antes y después de la estimulación en ambos momentos temprano y tardío. Estos resultados muestran que las vías JAK/STAT (incluyendo la vía STAT1) están activas en las cuatro líneas celulares sometidas a prueba.

A continuación, se investigó la relación entre la metilación del promotor de PD-L1 y la vía IFN γ /JAK/STAT en A427 y H358 usando ARNip. Como se indica anteriormente, CpG1 y CpG5 tuvieron niveles bajos de metilación en A427, y A427 mostró una expresión de proteína PD-L1 baja o nula en el valor de referencia y después de la estimulación con IFN γ . Por el contrario, CpG1 y CpG5 tuvieron niveles bajos de metilación en H358, y H358 mostró una alta expresión

de proteína PD-L1 en el valor de referencia, que se incrementó después de la estimulación con IFN γ . Para determinar qué STAT fue más crucial para la expresión de PD-L1 en el contexto de la metilación, las células de cada línea celular se dosificaron con (1) ningún ARNip; (2) control "revuelto"; (3) siSTAT1; (4) siSTAT3; (5) IFN γ o (6) siSTAT1, siSTAT3 e IFN γ .

A427 no mostró expresión de PD-L1 independientemente del tratamiento, a pesar de la fuerte inducción de STAT1 y STAT3 activados después de la estimulación con IFN γ . Véase la **FIG. 4C**. Las células H358 no metiladas mostraron expresión basal constitutiva de PD-L1 que se indujo además con estimulación con IFN γ . siSTAT3 redujo además la expresión basal de PD-L1. Tanto siSTAT1 como siSTAT3 atenuaron la expresión de PD-L1 cerca del valor de referencia, mientras que la combinación de IFN γ y ambos ARNip mostraron la menor cantidad de expresión de PD-L1, a pesar de la estimulación simultánea con la interferencia de ARNip. Estos resultados muestran que la metilación del promotor de PD-L1 bloqueó la expresión de PD-L1 a pesar de la activación de IFN γ /JAK/STAT1 o IFN γ /JAK/STAT3. Estos resultados también muestran que STAT1 y STAT3 son ambos necesarios para la expresión de PD-L1 estimulada por IFN γ y que STAT3 también parece ser parcialmente necesario para la expresión basal de PD-L1.

A continuación, los datos de secuenciación con bisulfito se superpusieron en mapas de posibles sitios de metilación de CpG para subconjuntos de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), líneas celulares pulmonares normales inmortalizadas y líneas pulmonares de NSCLC representativas de las tres categorías de metilación del promotor de PD-L1 (es decir, niveles de metilación alto, medio y bajo). En las **FIGS. 5A y 5B**, el Mut2/CpG1 y Mut7/CpG5 están encuadrados en rojo. Se observó poca o ninguna metilación en los diversos subconjuntos de PBMC que se podían encontrar como infiltrado inmunitario en tumores de pacientes. Véase la **FIG. 5A**. Las líneas celulares pulmonares normales tampoco mostraron metilación en estos sitios. Véanse las **FIG. 5A y 5B**. Las líneas celulares H358 y H1993, que expresaron PD-L1 a niveles altos, no mostraron metilación en CpG1 y 5. Véase la **FIG. 5B**. Las líneas celulares H322T y H2073, que mostraron una expresión de PD-L1 de referencia baja pero inducible, demostraron metilación parcial en ambos sitios de CpG. Véase la **FIG. 5B**. A427, que se demostró que tenía una expresión de PD-L1 de referencia baja, exhibió altos niveles de metilación en CpG1 y CpG5. Como se observó poca o ninguna metilación en CpG1 y CpG5 en subconjuntos de PBMC y líneas celulares hepáticas normales, la metilación en la región promotora de PD-L1 que se detecta en la muestra tumoral completa de un paciente, por lo tanto, debe surgir predominantemente de las células tumorales, y no de ningún otro subconjunto celular en la muestra.

Las líneas celulares de NSCLC del Proyecto del genoma del cáncer (CGP) se usaron para crear una curva de dispersión que compara directamente la metilación suavizada de CpG1 y CpG5 (valor M) en el eje X y la expresión de PD-L1 (sec-ARN, recuento log₂) en el eje Y. Como se muestra en la **FIG. 6A**, los datos tienen una relación altamente correlacionada de forma inversa, con una correlación de Pearson de -0,7. La expresión de referencia de PD-L1 en estas líneas celulares está altamente afectada por el nivel de metilación del promotor. Las líneas celulares CGP analizadas en la **FIG. 6A** se clasificaron a continuación en tres grupos de metilación: (1) baja (es decir, metilación baja o nula tanto en CpG1 como en CpG5), (2) intermedia (es decir, sitio de CpG1 o CpG5 metilado) o (3) alta (CpG1 y CpG5 ambos metilados). Estos grupos se trazaron en el eje X, con expresión basal de PD-L1 por sec-ARN trazada en el Y y la mediana de la expresión mostrada para cada grupo. El análisis ANOVA mostró una alta relevancia estadística para cada grupo, tras la expresión de PD-L1. El grupo (1) (es decir, bajo) tuvo la mayor expresión mediana de PD-L1, mostrando los grupos de metilación grupo (2) (es decir, intermedia) y grupo (3) (es decir, alta) una mediana de la expresión de PD-L1 menor. Véase la **FIG. 6B**. Estos datos muestran que la expresión basal de PD-L1 se regula inversamente por el nivel de metilación del promotor en CpG1 o bien CpG5, pero también por el número de sitios de CpG que se metilan.

Las líneas celulares en el panel de líneas celulares CPC de NSCLC se trataron a continuación con 5-aza-dC para que el efecto de la desmetilación global tuviera lugar en la expresión de PD-L1 en un conjunto de datos con un mayor número de líneas celulares. La expresión de PD-L1 se indujo significativamente. Solo las líneas celulares del grupo (3) (es decir, alto) mostraron una inducción significativa de la expresión de PD-L1 suprimida por metilación. Véase la **FIG. 6C**. Adicionalmente, es conocido que dos líneas celulares en este panel se han obtenido de dos muestras separadas de un paciente, H1993 (bajo) y H2073 (intermedio). H1993 no mostró cambios significativos en la expresión de PD-L1 después del tratamiento con 5-aza-dC, mientras que H2073 mostró una inducción de expresión de PD-L1 significativa después de la desmetilación del promotor de PD-L1. Véase la **FIG. 6D**. Estos resultados demuestran que la metilación de PD-L1 podría ser un factor impulsor que influye en la expresión de PD-L1, ya que diferentes líneas celulares con patrones diferentes de metilación en CpG1 y CpG5 se han originado en el mismo paciente.

La inmunidad adaptativa es el proceso mediante el que el infiltrado inmunitario puede activar y regular por incremento las proteínas del punto de control inmunitario, tal como PD-L1, en un tumor mediante la liberación de IFN γ y otros factores de los linfocitos T activados. Los resultados de los experimentos descritos anteriormente sugieren que esta activación de PD-L1 se bloquea en líneas celulares que tienen un nivel alto de metilación en CpG1 y/o CpG5. Se analizó una colección de muestras tumorales de NSCLC humanas para detectar la infiltración de linfocitos T activados (expresión del gen CD8A, Fluidigm) y la metilación del promotor de PD-L1 de células tumorales en CpG5 (también denominado mut7). Como se muestra en las **FIGS. 7A y 7B**, solo las muestras tumorales altamente infiltradas con baja metilación de CpG5/mut7 mostraron una alta expresión de células tumorales de PD-L1 tanto por IHQ (proteína, Véase la **FIG. 7A**) como por qRT-PCR (ARN, véase la **FIG. 7B**). Los tumores con poca o ninguna infiltración o los

tumores con alta metilación de CpG5 mostraron todos una baja expresión de ARN y proteína PD-L1. La regulación por incremento de PD-L1 de células tumorales por la infiltración de linfocitos T activados todavía se bloquea por la metilación del promotor en CpG5 en estas muestras tumorales de pacientes con NSCLC.

5 A continuación, se realizaron experimentos para determinar si la metilación de CpG en CpG1 y CpG5 puede bloquear físicamente la unión de STAT1 y/o STAT3 a la región promotora de PD-L1 (CpG1) y al intrón 1 (CpG5). Existen dos motivos de unión de STAT conocidos en estrecha proximidad a CpG1 en el promotor de PD-L1. Las líneas celulares A427 (es decir, metiladas) y H358 (es decir, no metiladas) descritas anteriormente se cultivaron casi hasta la confluencia y a continuación se estimularon con un tampón de control o bien IFN γ , como se describe anteriormente.

10 A la mañana siguiente, las células se dividieron en dos alícuotas, la primera para su uso en la secuenciación con bisulfito y la segunda para su uso en ChIP-Seq para evaluar la unión de STAT1 y STAT3. La secuenciación con bisulfito confirmó el estado de metilación para ambas líneas celulares y se observó un patrón de unión diferencial entre las dos líneas celulares, como se representa en el análisis de picos significativos por MACS Peak Calling.

15 Los resultados de los experimentos de ChIP-Seq se muestran en la **FIG. 8** como archivos .bed mostrados en el IgV Integrated Genomics Viewer (Broad Institute). En la **FIG. 8**, el archivo .bed superior contiene las coordenadas de los CpG encontrados en la región promotora de PD-L1 y el intrón 1. CpG1 y CpG5 están marcados. El segundo archivo .bed contiene las coordenadas de los motivos de unión de STAT conocidos en la región promotora de PD-L1. El tercer archivo .bed contiene la secuencia Hg19 y la estructura génica para PD-L1/CD274. Los archivos .bed del 4.º al 11.º

20 (numerados 1-8) son los archivos de unión significativos de MACS, generados después de nuestro experimento ChIP-Seq con STAT1 y STAT3 en las líneas celulares de NSCLC A427 y H358.

Las líneas celulares metiladas A427 no mostraron unión de ninguna de las proteínas STAT, con o sin estimulación con IFN γ . Véase la **tabla 4**. Dichos resultados indican que la metilación de CpG1, y posiblemente CpG5, en A427

25 bloquea completamente la unión de STAT1 y STAT3 a los motivos de unión de STAT cerca de CpG1 en el promotor de PD-L1. El H358 no estimulado no mostró unión por STAT1, pero se demostró que STAT1 se unía al promotor de PD-L1 después de la estimulación con IFN γ . Véase la **tabla 4**. Las líneas celulares H358 estaban unidas por STAT3 independientemente de la estimulación. Véase la **tabla 4**. Como se muestra anteriormente, H358 ya tiene un nivel basal muy alto de expresión de ARN de PD-L1 y estos resultados sugieren que el factor de transcripción de STAT3

30 podría ser el impulsor del alto nivel de expresión basal de PD-L1 en esta línea celular.

Tabla 4: Unión de STAT1 y STAT3 cerca de CpG1 en el promotor de PD-L1

N.º de muestra	Línea celular	Metilación en el promotor de PD-L1	Estimulación	chIP	Unión
1	A427	ALTA	Control	STAT1	NO
2	A427	ALTA	IFN γ	STAT1	NO
3	A427	ALTA	Control	STAT3	NO
4	A427	ALTA	IFN γ	STAT3	NO
5	H358	BAJA	Control	STAT1	NO
6	H358	BAJA	IFN γ	STAT1	SÍ
7	H358	BAJA	Control	STAT3	SÍ
8	H358	BAJA	IFN γ	STAT3	SÍ

35 Los ejemplos precedentes se ofrecen únicamente con propósitos ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Genentech, Inc.
- 5 <120> METILACIÓN DEL PROMOTOR DE PD-L1 EN CÁNCER
- <130> 146392027040
- <140> Aún sin asignar
- 10 <141> Conjuntamente con la presente
- <150> US 62/168.668
- <151> 29/05/2015
- 15 <160> 30
- <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
- 20 <211> 10
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 25 <223> Construcción sintética
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> 6
- 30 <223> Xaa = D o G
- <400> 1
- Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Ser Trp Ile His**
- 1 5 10**
- 35 <210> 2
- <211> 18
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
- <223> Construcción sintética
- <220>
- <221> VARIANTE
- 45 <222> 4
- <223> Xaa = S o L
- <220>
- <221> VARIANTE
- 50 <222> 10
- <223> Xaa = T o S
- <400> 2
- Ala Trp Ile Xaa Pro Tyr Gly Gly Ser Xaa Tyr Tyr Ala Asp Ser Val**
- 1 5 10 15**
- Lys Gly**
- 55 <210> 3
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 60 <220>
- <223> Construcción sintética

ES 2 810 700 T3

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

5 <210> 4
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 4
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

15 <210> 5
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

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

25 <210> 6
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Construcción sintética

35 <400> 6
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

40 <210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

45 <400> 7
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 1 5 10

50 <210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

55 <220>
 <223> Construcción sintética

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 5
 5 <223> Xaa = D o V

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 6
 10 <223> Xaa = V o I

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 7
 15 <223> Xaa = S o N

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 9
 20 <223> Xaa = A o F

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 10
 25 <223> Xaa = V o L

<400> 8
Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Ala
1 5 10

30 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Construcción sintética

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 4
 40 <223> Xaa = F o T

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 6
 45 <223> Xaa = Y o A

<400> 9
Ser Ala Ser Xaa Leu Xaa Ser
1 5

50 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Construcción sintética

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3
 60 <223> Xaa = Y, G, F o S

ES 2 810 700 T3

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 4
 <223> Xaa = L, Y, F o W
 5
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 5
 <223> Xaa = Y, N, A, T, G, F o I
 10
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 6
 <223> Xaa = H, V, P, T o I
 15
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 8
 <223> Xaa = A, W, R, P o T
 20
 <400> 10
Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr
1 5
 25
 <210> 11
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 11
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20
 35
 <210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 12
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15
 45
 <210> 13
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 13
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30
 55

ES 2 810 700 T3

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 14
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 10 **1** **5** **10**
 <210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 20 <400> 15
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His
 1 **5** **10**
 <210> 16
 <211> 18
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 30 <400> 16
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 **5** **10** **15**
Lys Gly
 <210> 17
 35 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Construcción sintética
 <400> 17
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 **5** **10**
 45 <210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 18
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 **5**
 55 <210> 19
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

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

<210> 20

10 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<400> 20
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

20 <210> 21
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 21
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

30 <210> 22

<211> 5
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5 <400> 22 5
gctcg

<210> 23
 <211> 139
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 23
cacgggtcca agtccaccgc cagctgcttg ctagtaacat gacttgtgta agttatccca 60
gctgcagcat ctaagtaagt ctcttctctgc gctaagcagg tccaggatcc ctgaacggaa 120
tttatttgct ctgtccatt 139

15 <210> 24
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 24
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
 25 **Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr**
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

30 <210> 25
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

35 <400> 25
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

40 <210> 26
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

45

<400> 26

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Ser
			20						25				30		
Trp	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40						45		
Ala	Trp	Ile	Ser	Pro	Tyr	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55						60			
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr
65					70						75				80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Arg	Arg	His	Trp	Pro	Gly	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100					105					110		
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
		115					120					125			
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
	130					135						140			
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
145					150					155					160
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
				165					170					175	
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
			180					185					190		
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser
		195					200					205			
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
	210					215						220			
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
225					230					235					240
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
				245					250					255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
			260					265					270		
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
		275					280					285			
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
	290					295						300			
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
305					310					315					320
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
				325					330					335	
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
			340					345					350		
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
		355					360					365			
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
	370					375						380			
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
385					390					395					400
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
				405					410					415	
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
			420						425				430		

ES 2 810 700 T3

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

5 <210> 27
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 27
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

15 <210> 28
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 28
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120

<210> 29
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 29
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 30
 <211> 1186
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 30
 gctcgggatg ggaagttctt ttaatgacaa agcaaatgaa gtttcattat gtcgaggaac 60
 tttgaggaag tcacagaatc cacgatttaa aatatatatt cctattatac acccatacac 120
 acacacacac acctacttct tagaataaaa accaaagcca tatgggtctg ctgctgactt 180
 tttatatggt gtagagttat atcaagttat gtcaagatgt tcagtcacct tgaagaggct 240
 tttatcagaa agggggacgc ctttctgata aagggttaag ggtaacctta agctcttacc 300
 cctctgaagg taaaatcaag gtgcggtcag atggttgctt gttgtaaatt tcttttttta 360
 ttaataacat actaaatgtg gatttgcttt aatcttcgaa actcttcccg gtgaaaatct 420
 catttacaag aaaactggac tgacatggtt cactttctgt ttcatttcta tacacagott 480
 tattcctagg acaccaacac tagataccta aactgaaagc ttccgccgat ttcaccgaag 540
 gtcaggaaag tccaacgccc ggcaaaactgg atttgctgcc ttgggcagag gtgggcggga 600
 ccccgcctcc gggcctggcg caacgctgag cagctggcgc gtcccgcgcg gccccagttc 660
 tgccgagctt cccgaggctc cgcaccagcc gcgcttctgt ccgctgagcag gtagggagcg 720
 ttgttctctc gggggtgccc acggcccagt atctctggct agctcgctgg gcactttagg 780
 acggagggtc tctacacctt ttctttggga tggagagagg agaagggaaa ggaacgcga 840
 tggcttaggg ggcagtagag ccaattacct gttgggggta ataagaacag gcaatgcac 900
 tggccttctc ccaggcgcga ttcagttttg ctctaaaaat aatttatacc tctaaaaata 960
 aataagatag gtagtatagg ataggtagtc attcttatgc gactgtgtgt tcagaatata 1020
 gctctgatgc taggctggag gtctggacac ggggtccaagt ccaccgccag ctgcttgcta 1080
 gtaacatgac ttgtgtaagt tatcccagct gcagcatcta agtaagtctc ttctctgcgt 1140
 aagcaggtcc aggatccctg aacggaattt atttgctctg tccatt 1186

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-PD-L1 para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto siempre que se haya encontrado que el sujeto tiene un nivel medio o bajo de metilación en la coordenada genómica hg19 chr9: 5449887-5449891 y/o en uno o más sitios de CpG en la coordenada genómica hg19 chr9: 5450934-5451072 en una muestra que contiene células cancerosas del sujeto,
- (i) en el que el nivel medio de metilación está entre aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 40 % de metilación y en el que el nivel bajo de metilación es menor de aproximadamente un 20 % de metilación, donde el nivel de metilación se determina por secuenciación con bisulfito,
- (ii) en el que el nivel medio de metilación está entre aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 60 % de metilación y en el que el nivel bajo de metilación es menor de aproximadamente un 5 % de metilación, donde la metilación se determina por secuenciación de próxima generación con bisulfito, o
- (iii) en el que el nivel medio de metilación es un valor beta de entre aproximadamente 0,2 a 0,3 y en el que el nivel bajo de metilación es un valor beta menor de aproximadamente 0,2, donde el nivel de metilación se determina usando una matriz de chip de metilación.
2. Un procedimiento para predecir si es probable que un sujeto con cáncer responda al tratamiento con un anticuerpo anti-PD-L1 que comprende medir el nivel de metilación en la coordenada genómica hg19 chr9:5449887-5449891 y/o en uno o más sitios de CpG en la coordenada genómica hg19 chr9:5450934-5451072 en una muestra que contiene células cancerosas del sujeto, en el que el nivel medio o bajo de metilación en hg19 chr9:5449887-5449891 y/o hg19 chr9:5450934-5451072 en la muestra indica que es probable que el sujeto responda al tratamiento,
- (i) en el que el nivel medio de metilación está entre aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 40 % de metilación y en el que el nivel bajo de metilación es menor de aproximadamente un 20 % de metilación, donde el nivel de metilación se determina por secuenciación con bisulfito,
- (ii) en el que el nivel medio de metilación está entre aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 60 % de metilación y en el que el nivel bajo de metilación es menor de aproximadamente un 5 % de metilación, donde la metilación se determina por secuenciación de próxima generación con bisulfito, o
- (iii) en el que el nivel medio de metilación es un valor beta de entre aproximadamente 0,2 a 0,3 y en el que el nivel bajo de metilación es un valor beta menor de aproximadamente 0,2, donde el nivel de metilación se determina usando una matriz de chip de metilación.
3. El anticuerpo anti-PD-L1 para su uso o el procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el sujeto tiene un nivel medio o bajo de metilación en la coordenada genómica hg19 chr9:5449887-5449891 y en uno o más sitios de CpG en la coordenada genómica hg19 chr9:5450934-5451072.
4. El anticuerpo anti-PD-L1 para su uso o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la secuencia de ácido nucleico de la coordenada genómica hg19 chr9:5449887-5449891 es SEQ ID NO: 22.
5. El anticuerpo anti-PD-L1 para su uso o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la secuencia de ácido nucleico de hg19 chr9:5450934-5451072 es SEQ ID NO: 23.
6. El anticuerpo anti-PD-L1 para su uso o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la muestra del sujeto muestra pruebas de infiltración de células inmunitarias.
7. El anticuerpo anti-PD-L1 para su uso o el procedimiento de la reivindicación 6, en el que las pruebas de infiltración de células inmunitarias están indicadas por linfocitos CD8⁺ detectados por medio de inmunoelectrotransferencia, ELISA, citometría de flujo, qPCR, qRT-PCR, perfil de transcriptoma, análisis de micromatriz o secuenciación de próxima generación.
8. El anticuerpo anti-PD-L1 para su uso o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de vejiga o melanoma.
9. El anticuerpo anti-PD-L1 para su uso o el procedimiento de la reivindicación 8, en el que el cáncer es cáncer de pulmón, y en el que el cáncer de pulmón es carcinoma de pulmón no microcítico, carcinoma de pulmón de células escamosas o adenocarcinoma de pulmón.
10. El anticuerpo anti-PD-L1 para su uso o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el anticuerpo anti-PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1.
11. El anticuerpo anti-PD-L1 para su uso o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que

el anticuerpo anti-PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a B7-1.

12. El anticuerpo anti-PD-L1 para su uso o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el anticuerpo anti-PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 tanto a PD-1 como a B7-1.

5 13. El anticuerpo anti-PD-L1 para su uso o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal.

10 14. El anticuerpo anti-PD-L1 para su uso o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el anticuerpo anti-PD-L1 es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en fragmentos Fab, Fab'-SH, Fv, scFv y (Fab')₂.

15 15. El anticuerpo anti-PD-L1 para su uso o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.

16. El anticuerpo anti-PD-L1 para su uso o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el anticuerpo anti-PD-L1 se selecciona del grupo que consiste en: YW243.55.S70, MPDL3280A, MDX-1105, MEDI4736 y MSB0010718C.

20 17. El anticuerpo anti-PD-L1 para su uso o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de HVR-H1 de SEQ ID NO: 15, la secuencia de HVR-H2 de SEQ ID NO: 16 y la secuencia de HVR-H3 de SEQ ID NO: 3; y una cadena ligera que comprende la secuencia de HVR-L1 de SEQ ID NO:17, la secuencia de HVR-L2 de SEQ ID NO: 18 y la secuencia de HVR-L3 de SEQ ID NO: 19.

25 18. El anticuerpo anti-PD-L1 para su uso o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el anticuerpo anti-PD-L1 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.

30 19. Uso de un kit que comprende reactivos para medir el nivel de metilación en la coordenada genómica hg19 chr9:5449887-544989 y/o en uno o más sitios de CpG en la coordenada genómica hg19 chr9:5450934-5451072 en una muestra que contiene células cancerosas de un sujeto de acuerdo con el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2-18.

35

FIG. 1

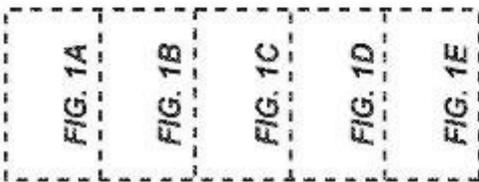
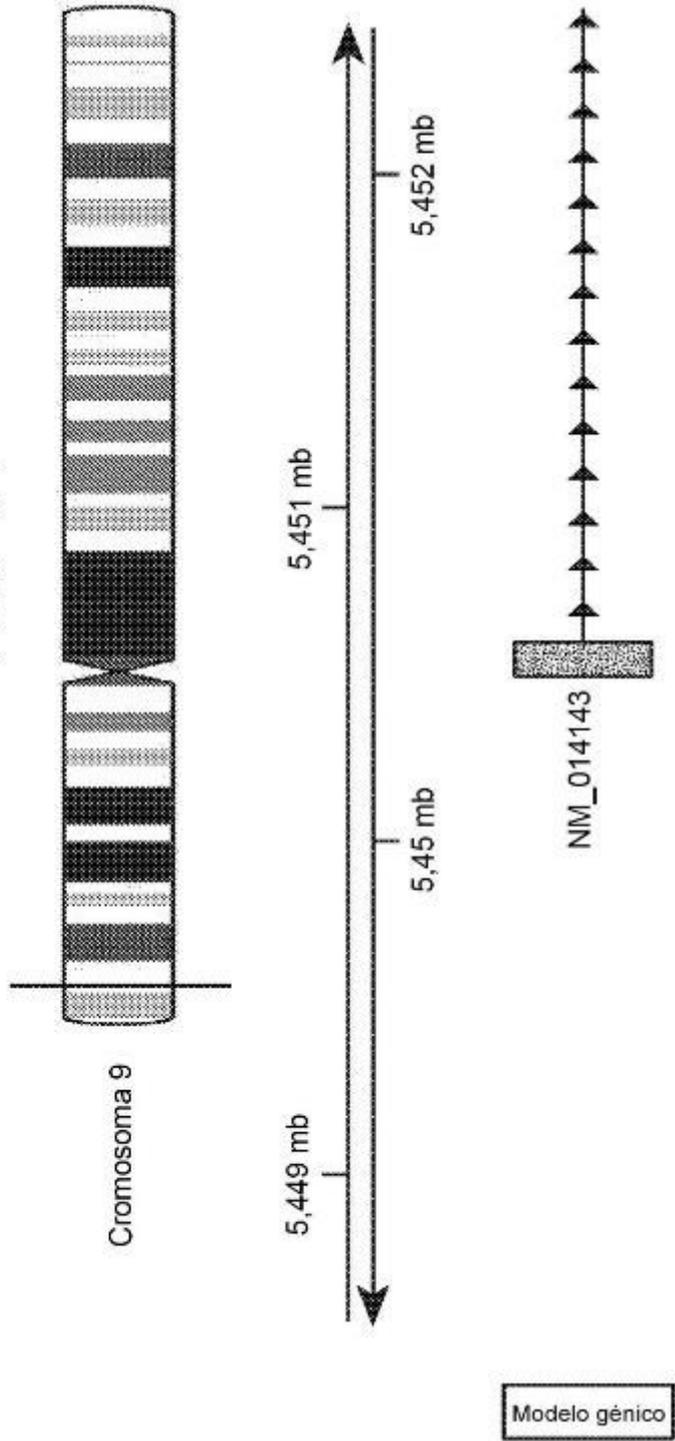
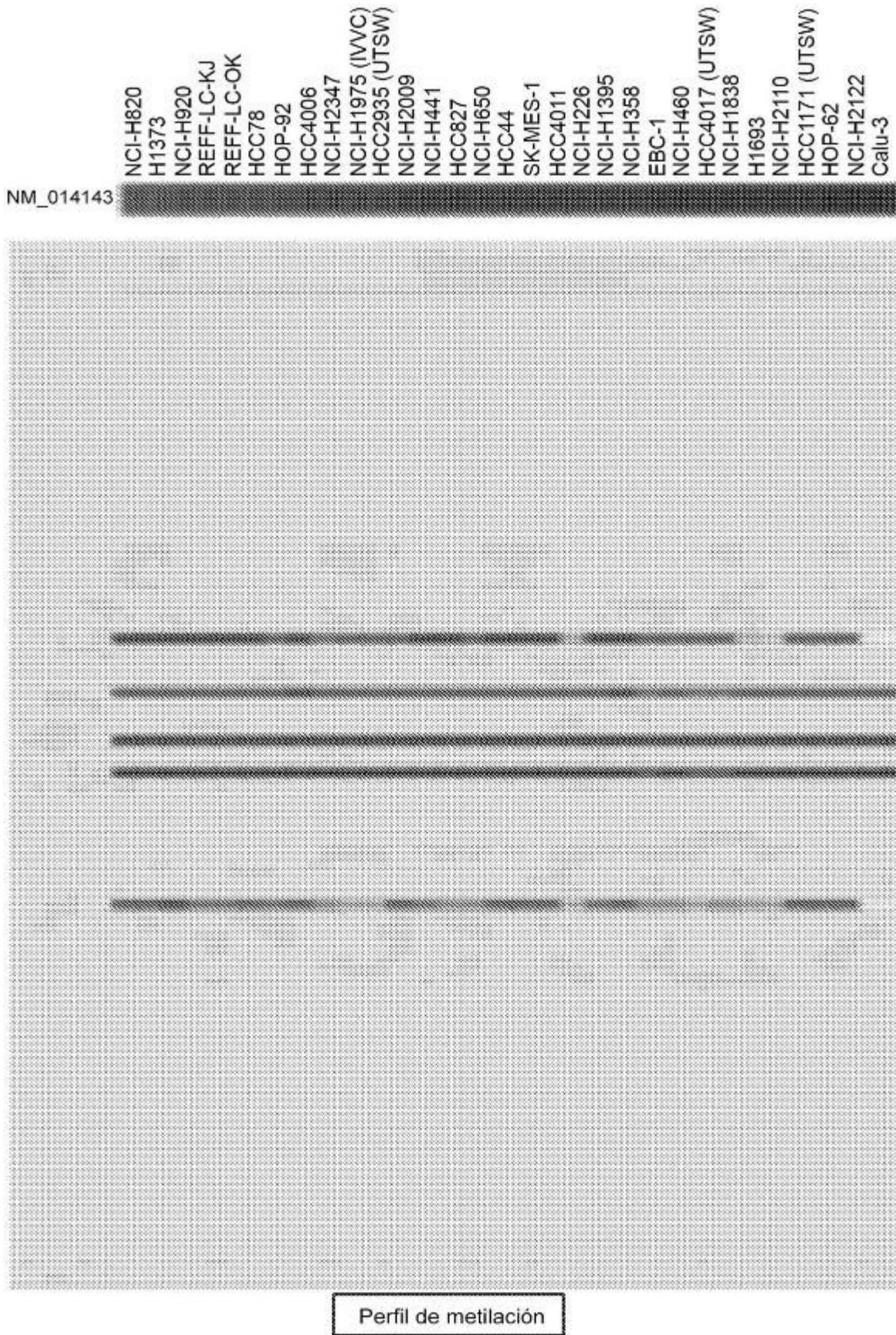


FIG. 1A





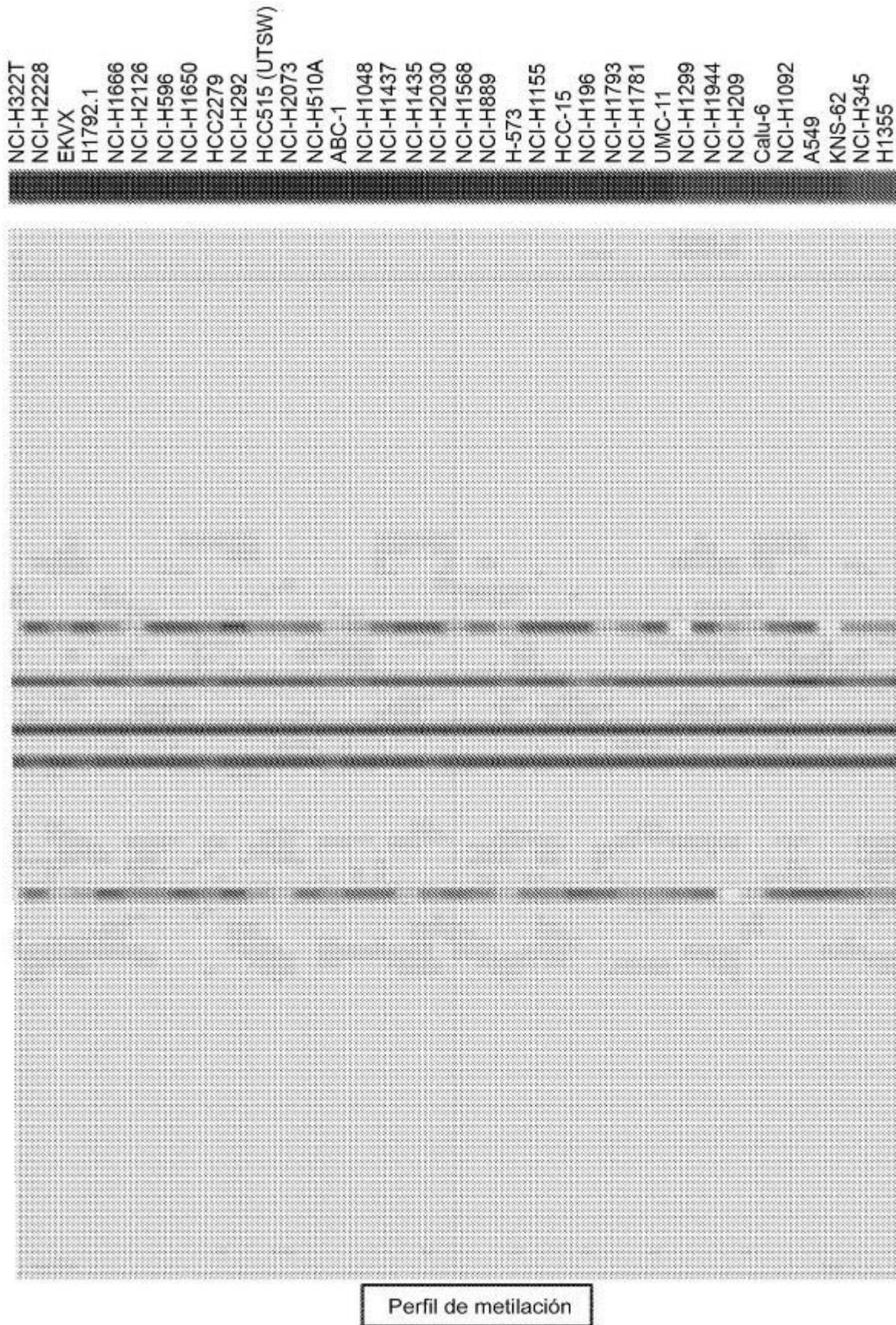


FIG. 1C

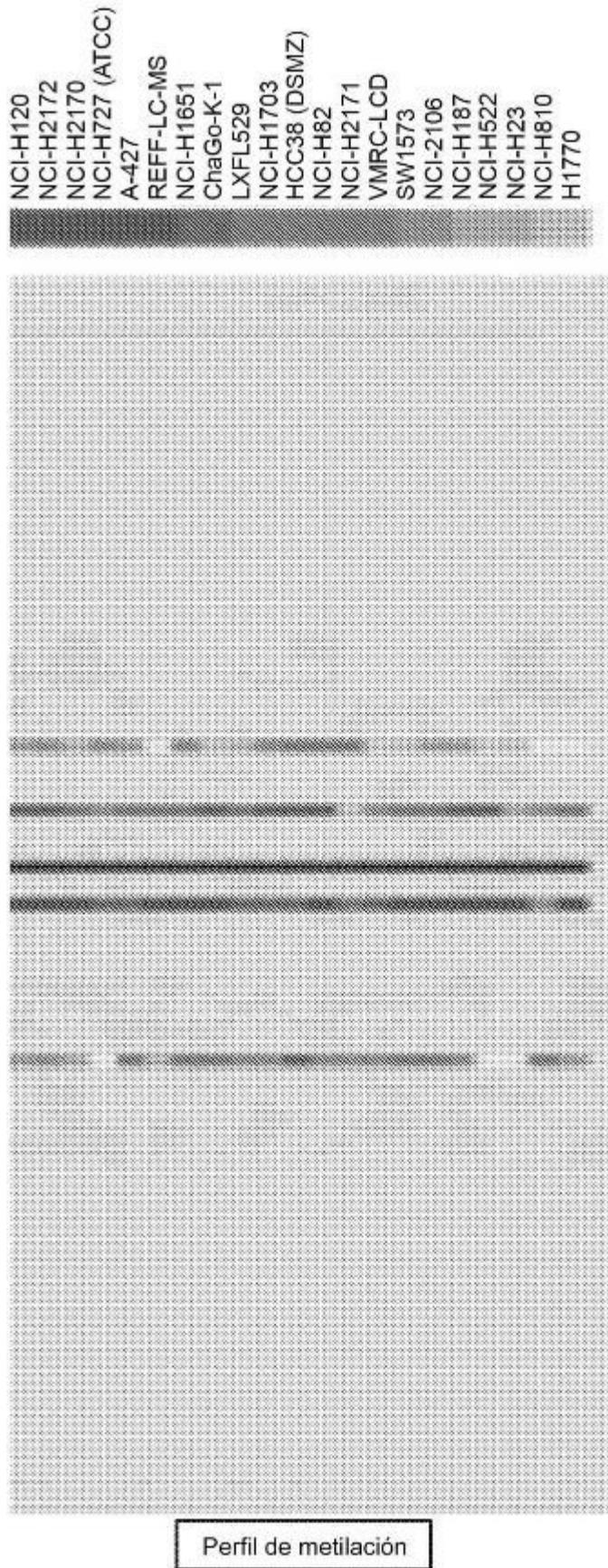


FIG. 1D

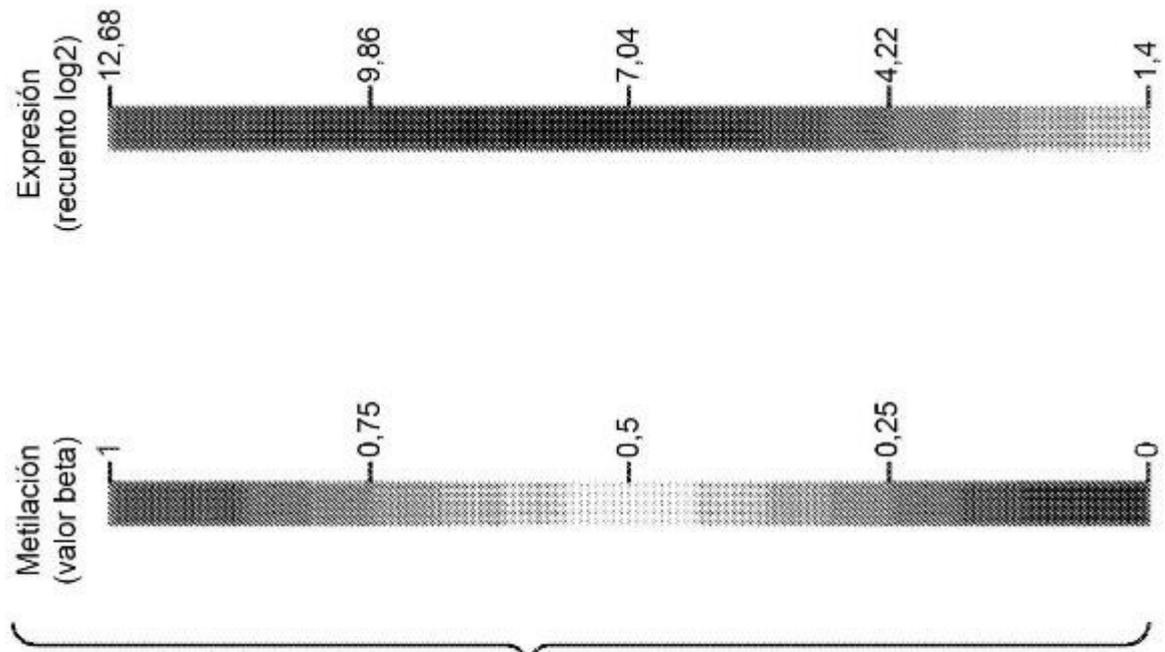


FIG. 1E

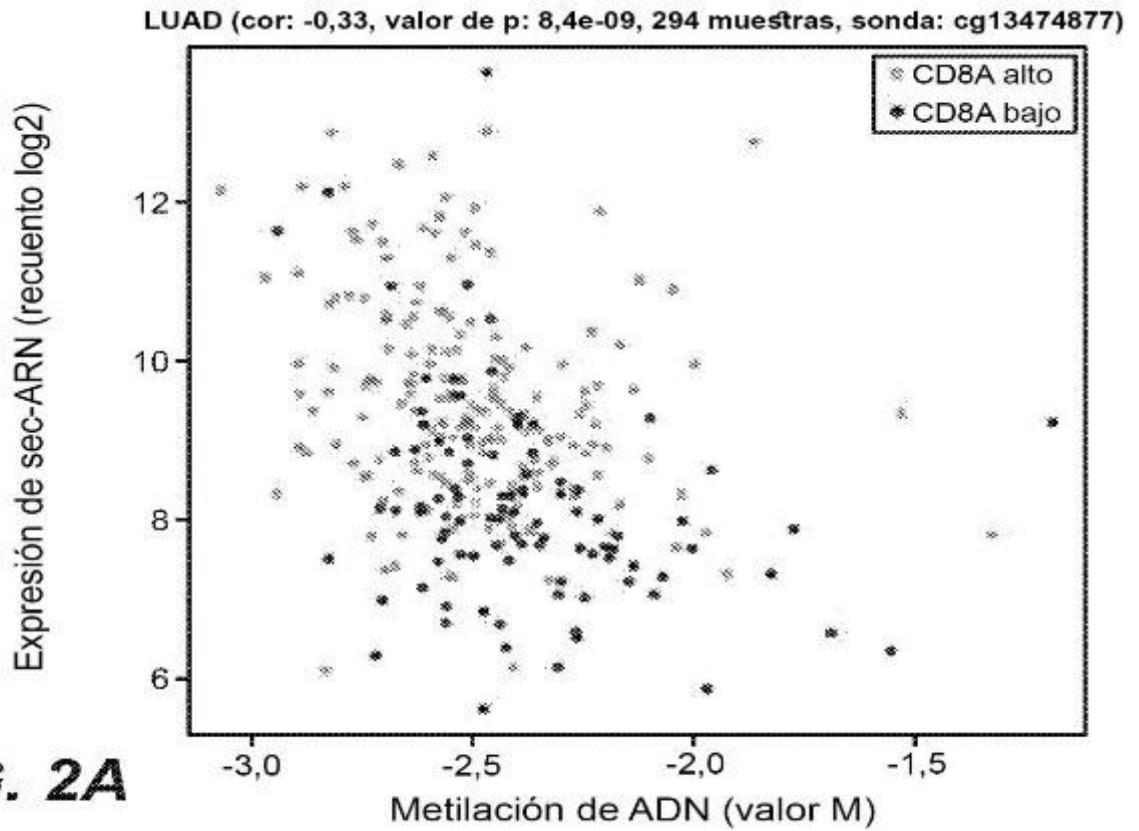


FIG. 2A

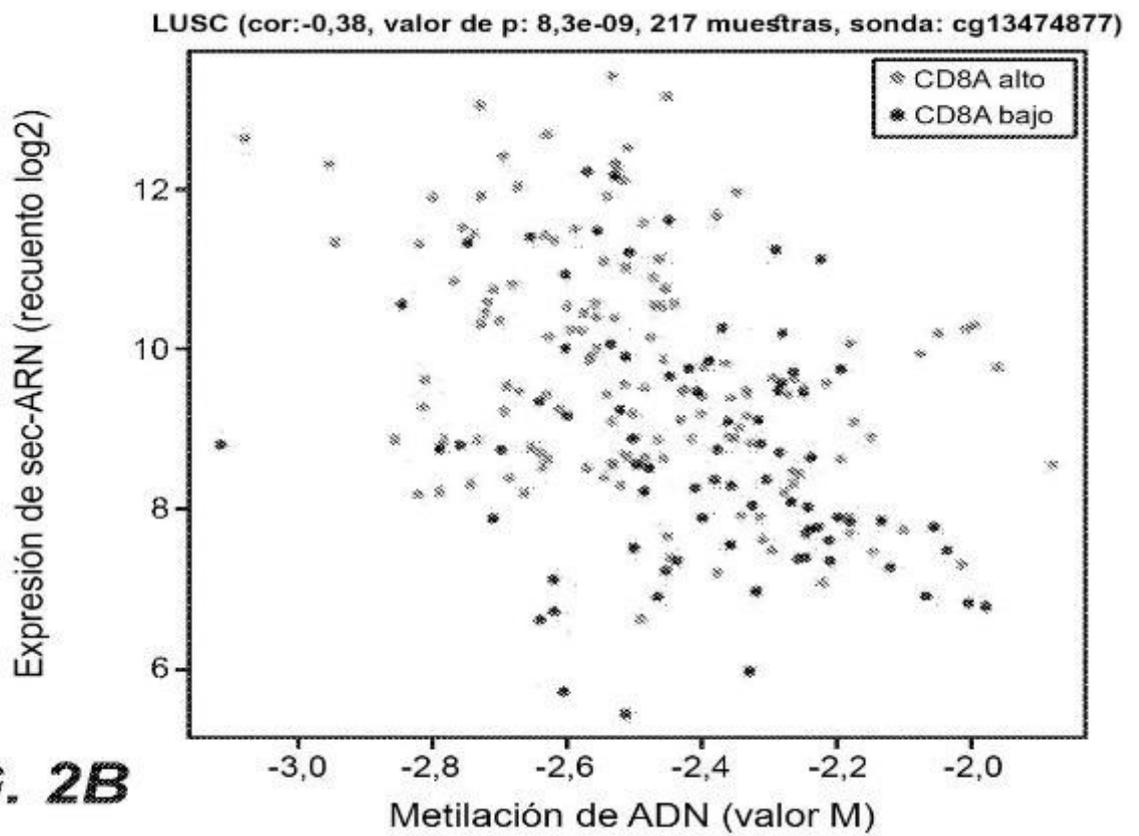


FIG. 2B

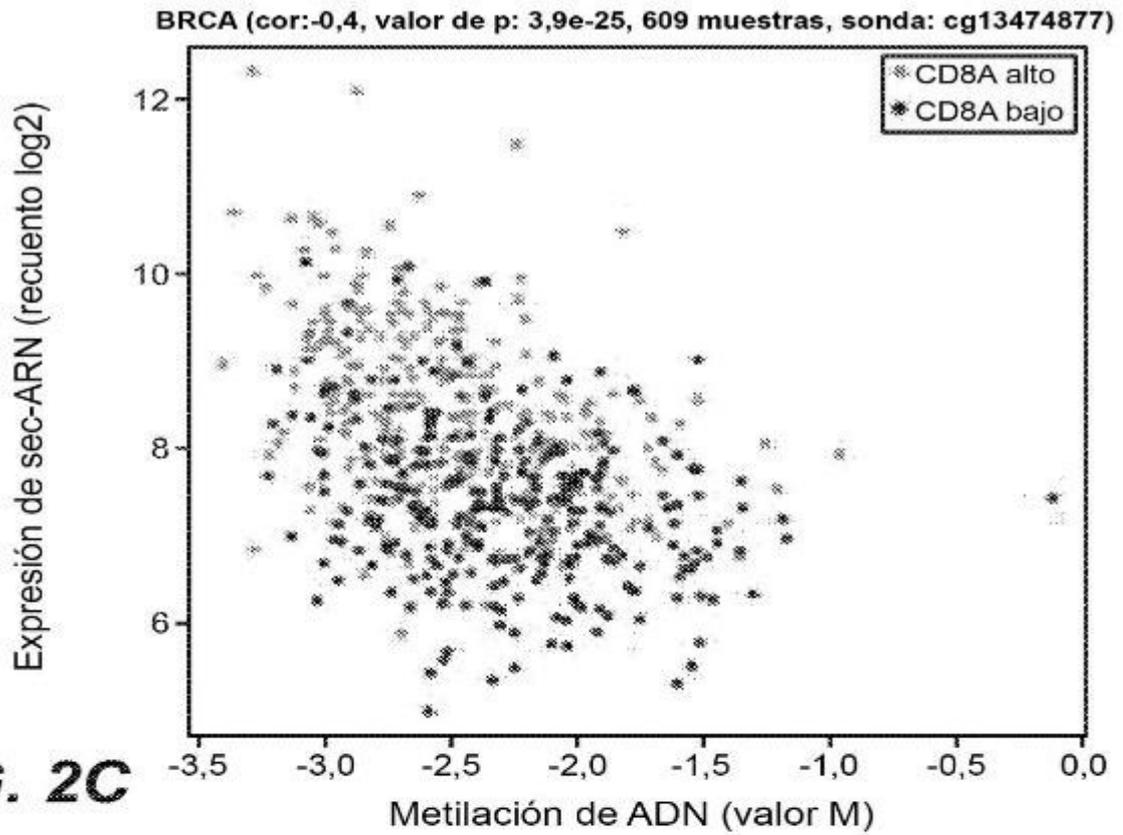


FIG. 2C

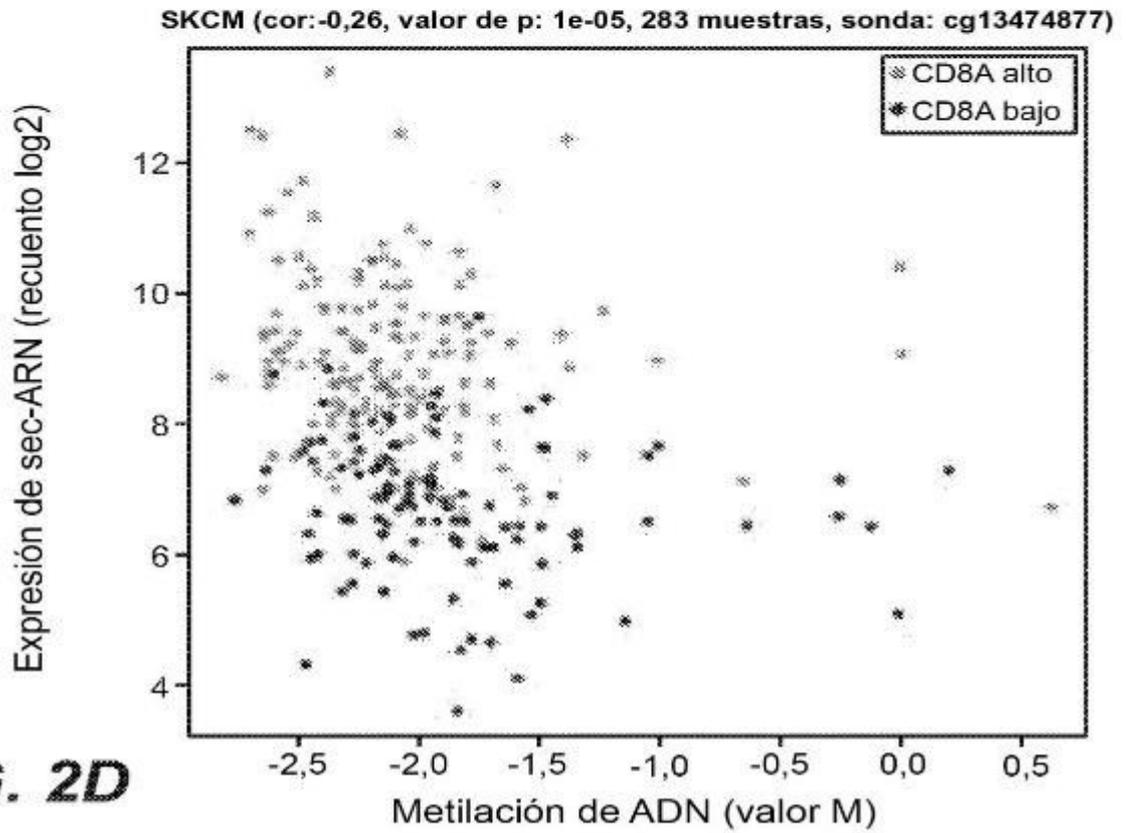


FIG. 2D

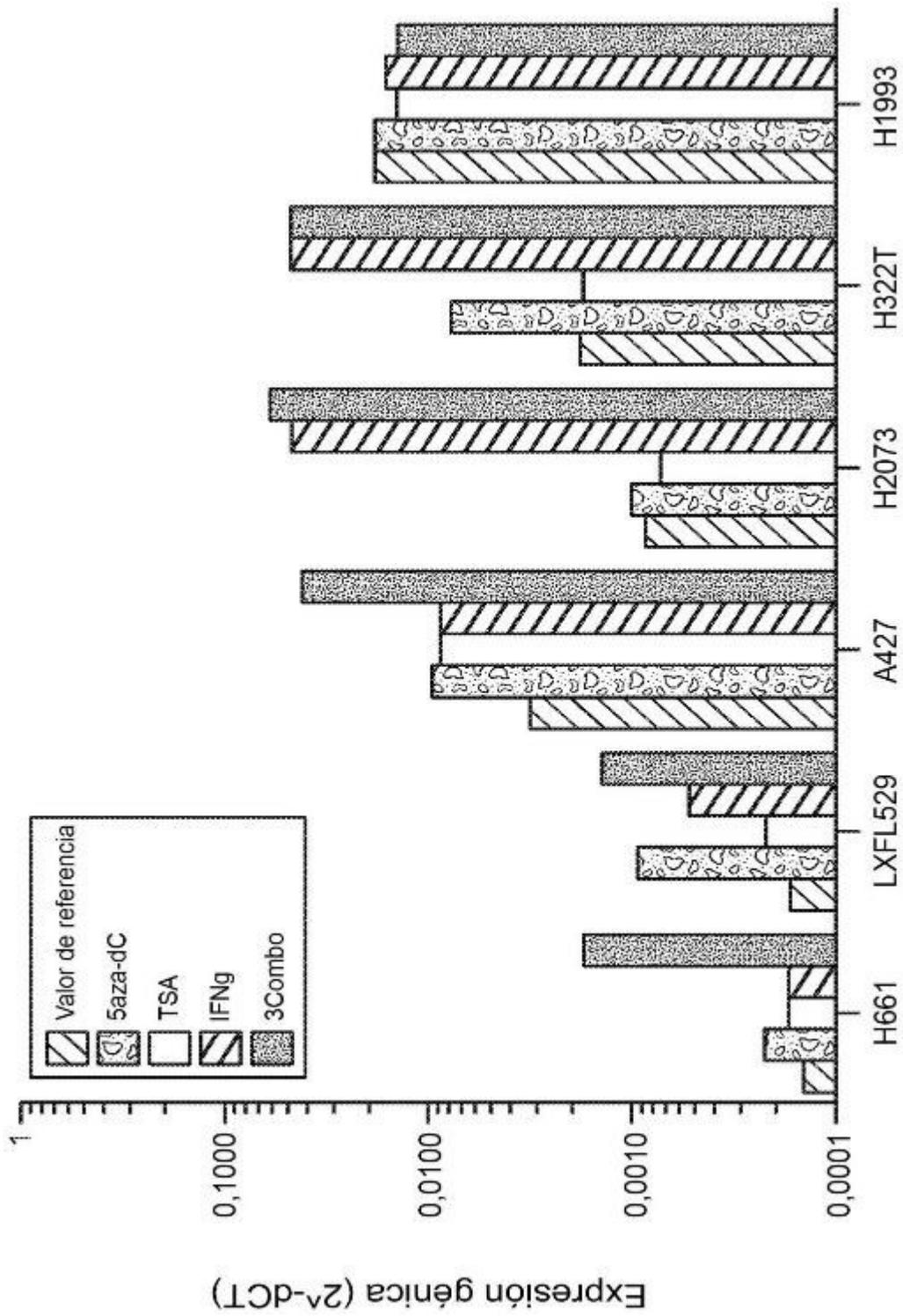


FIG. 3

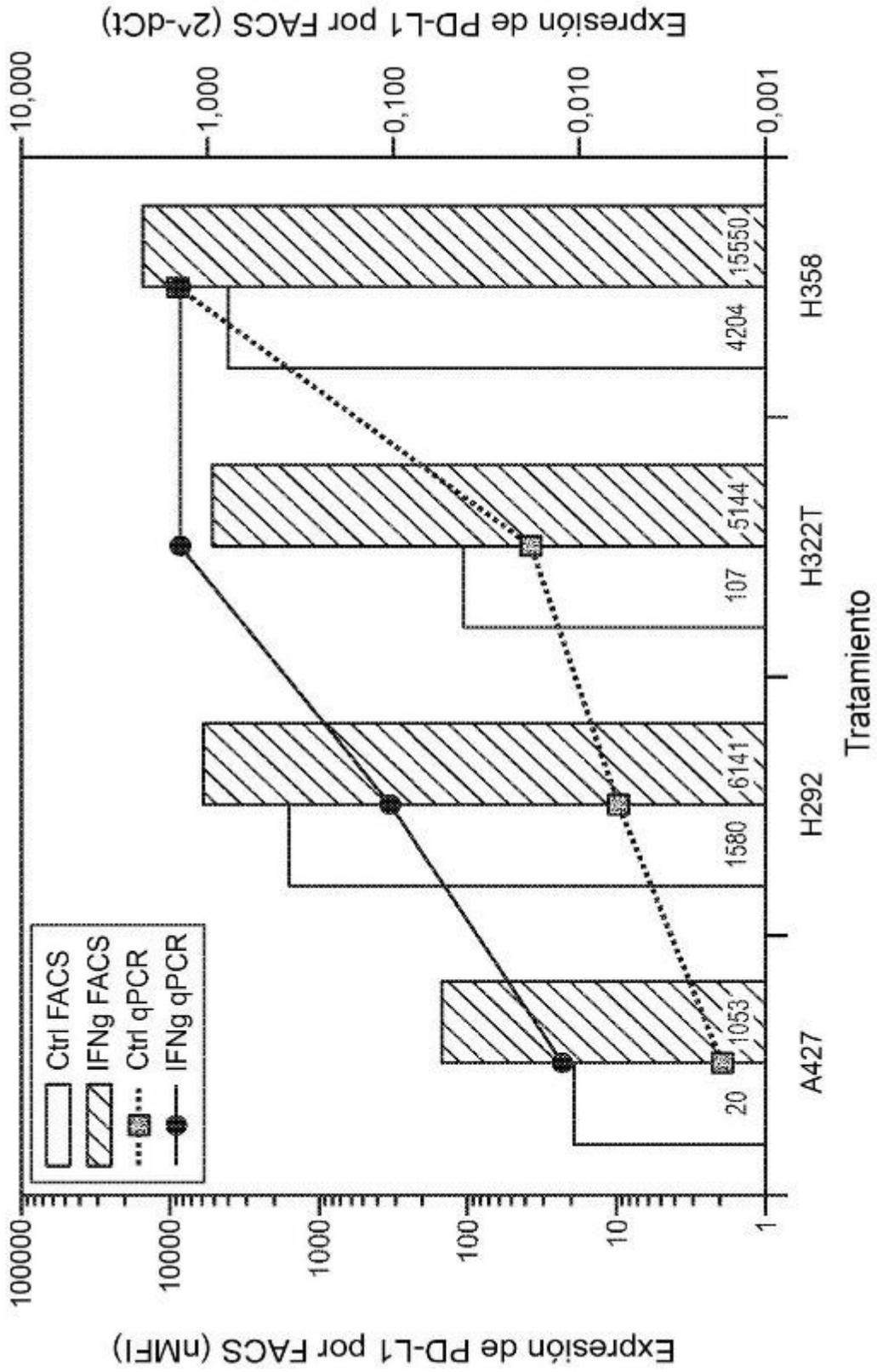


FIG. 4A

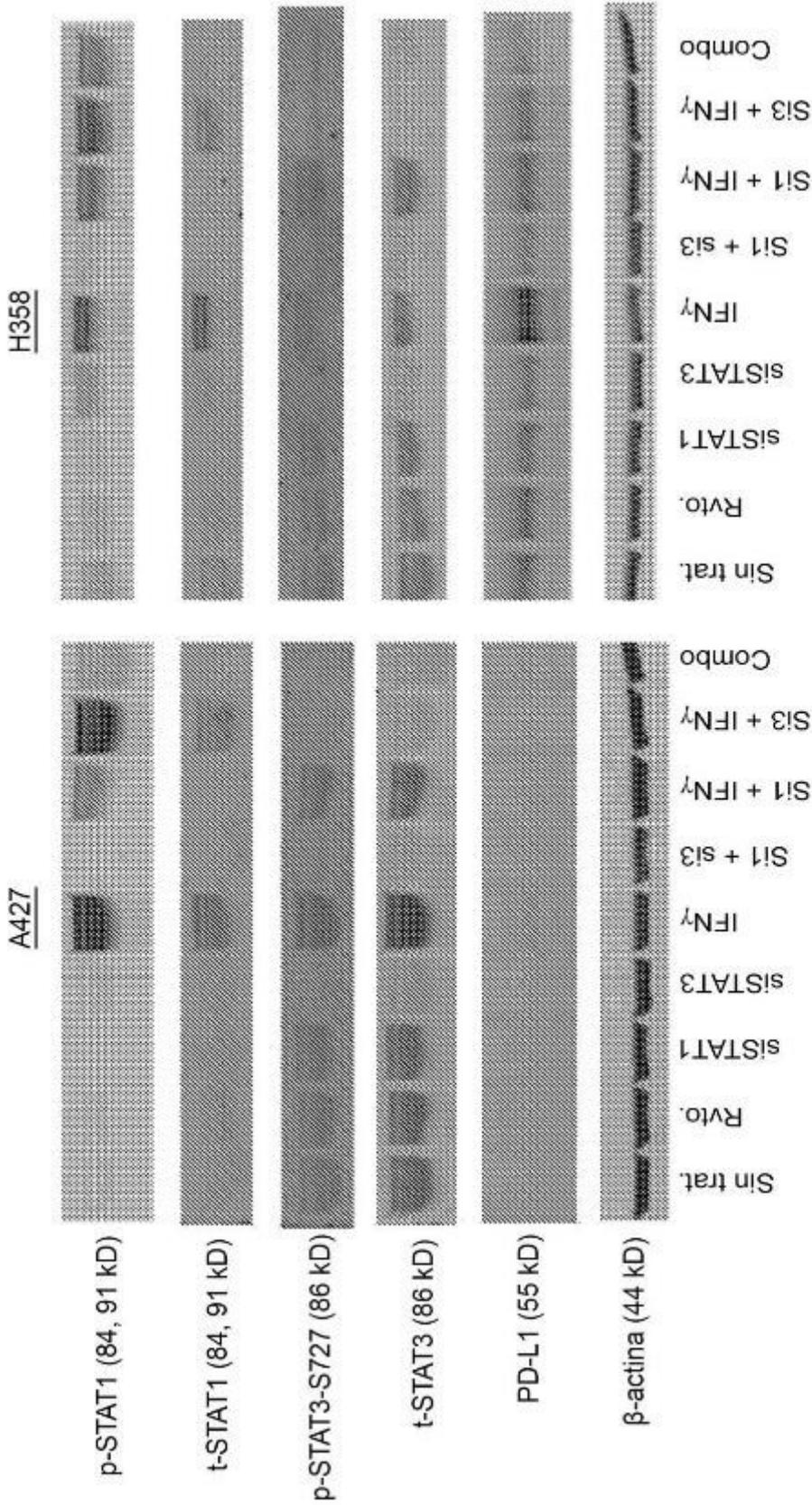
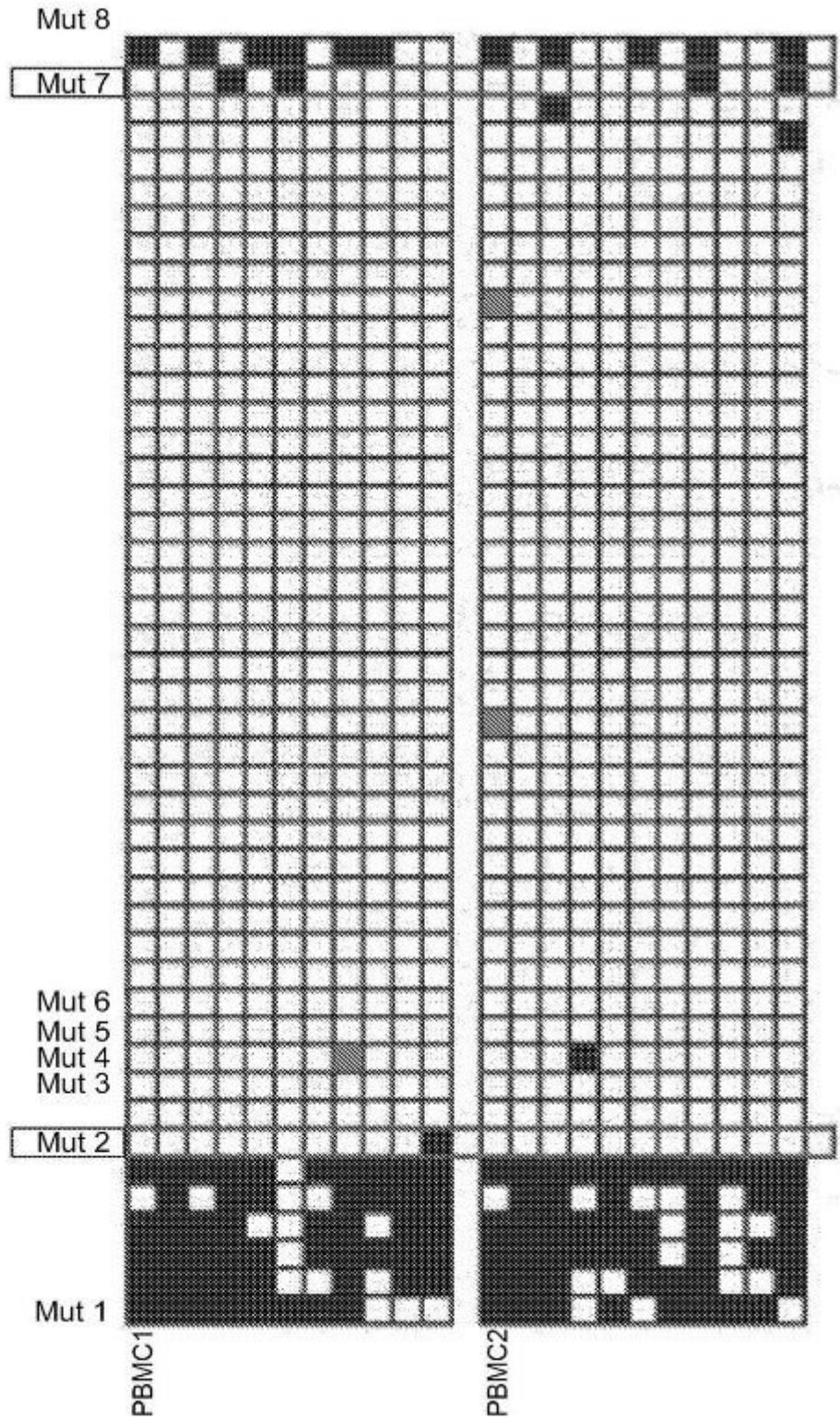


FIG. 4C

FIG. 5A
FIG. 5A-1
FIG. 5A-2
FIG. 5A-3

FIG. 5A-1



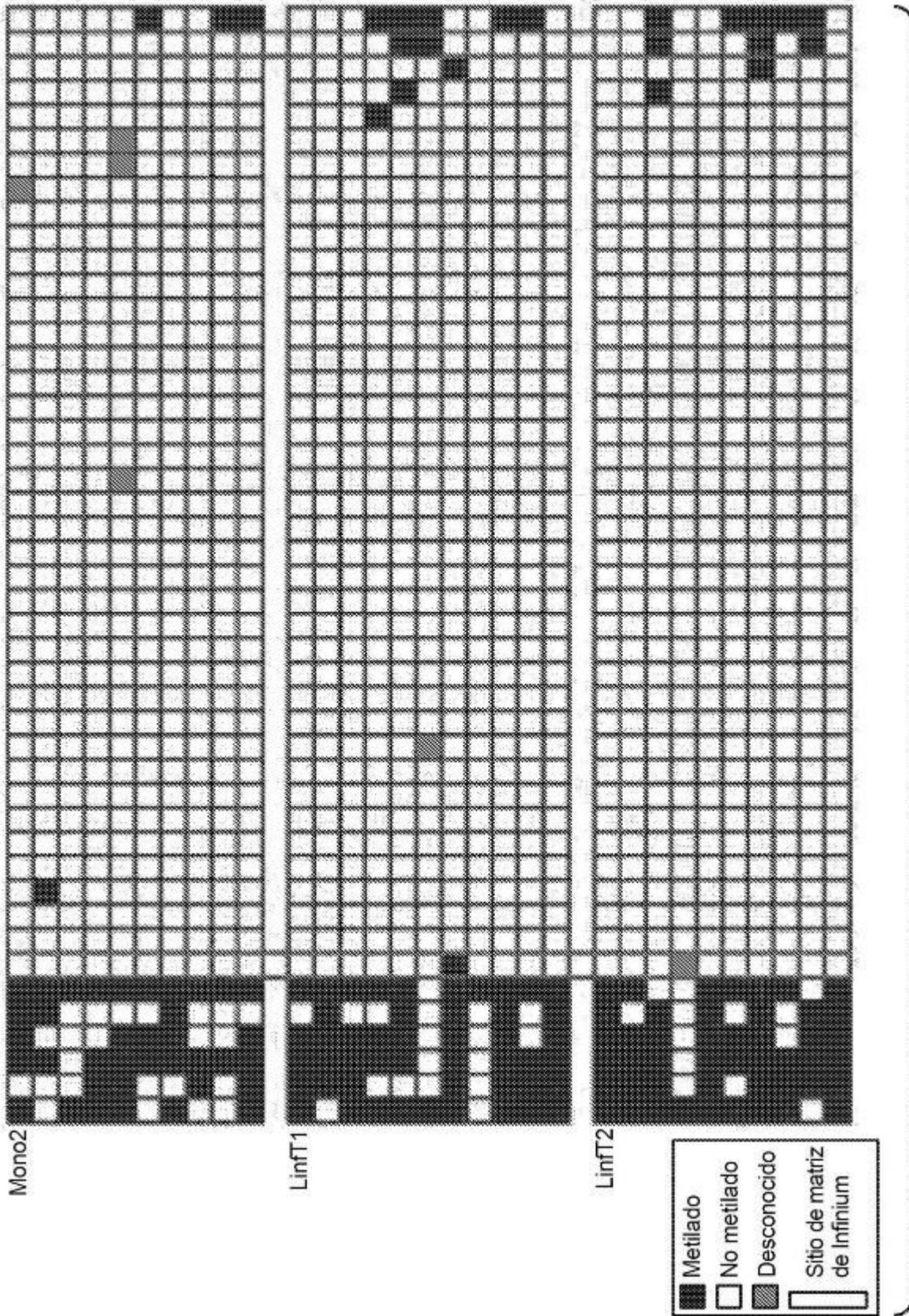
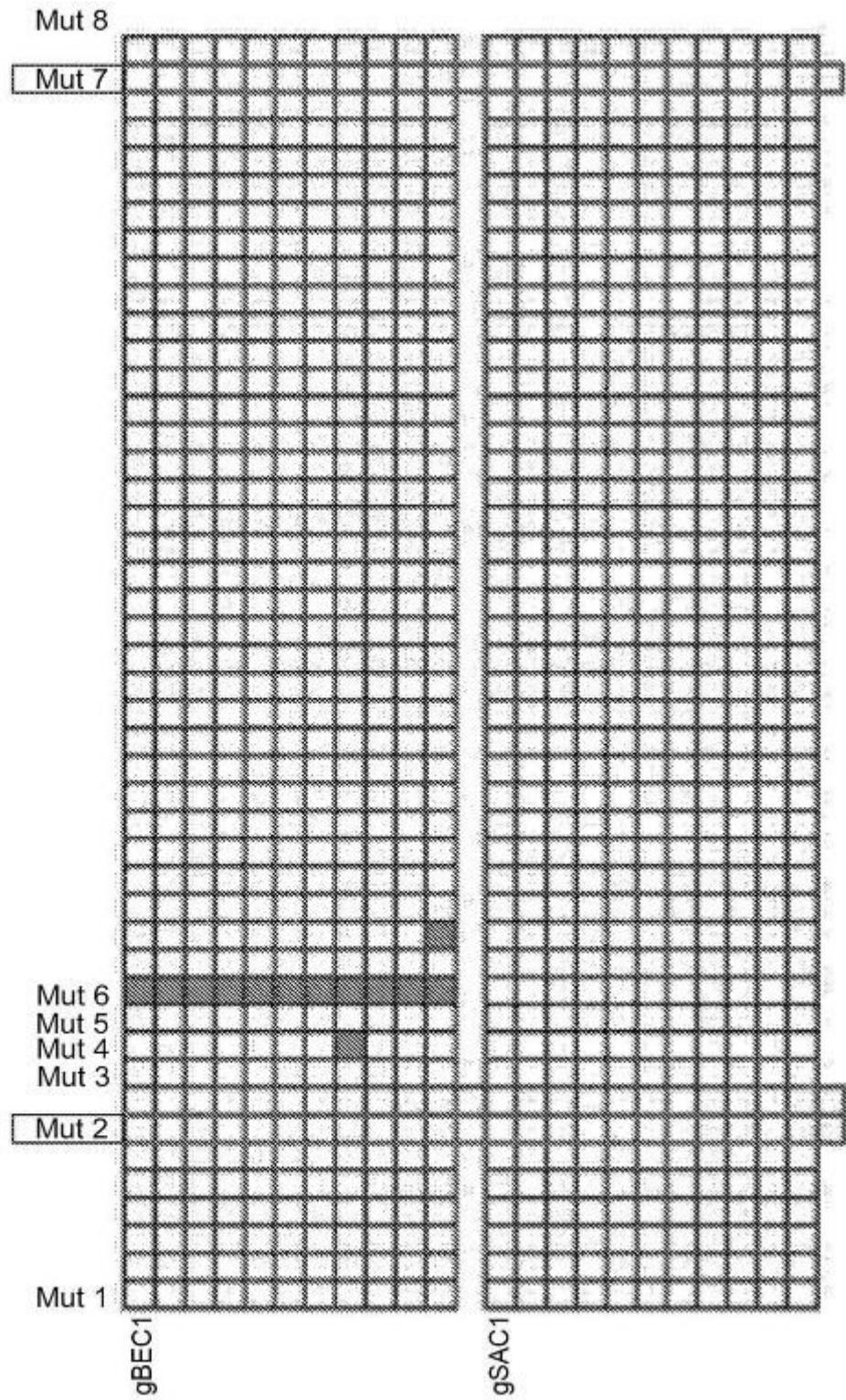


FIG. 5A-3

FIG. 5B



FIG. 5B-1



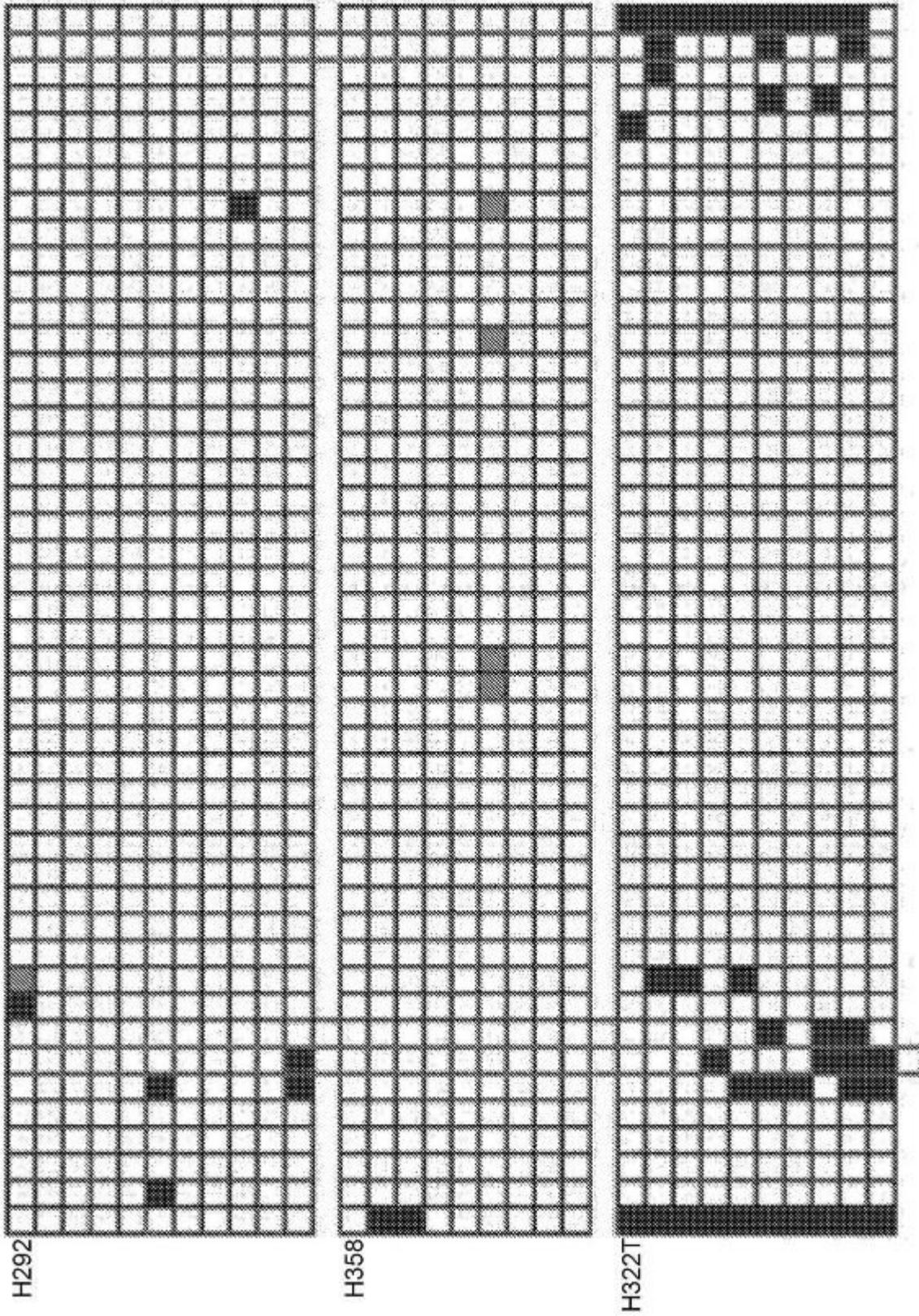


FIG. 5B-2

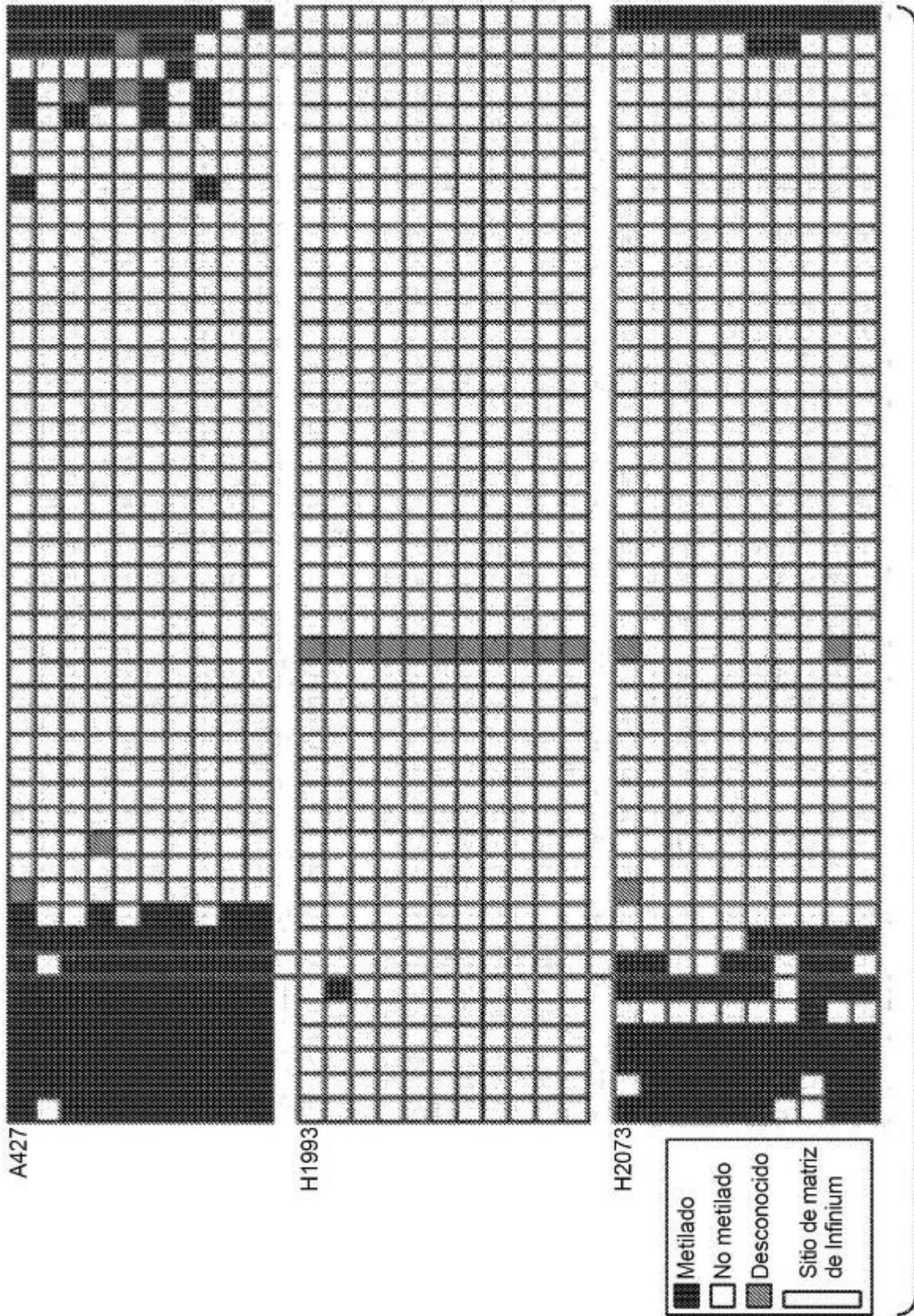


FIG. 5B-3

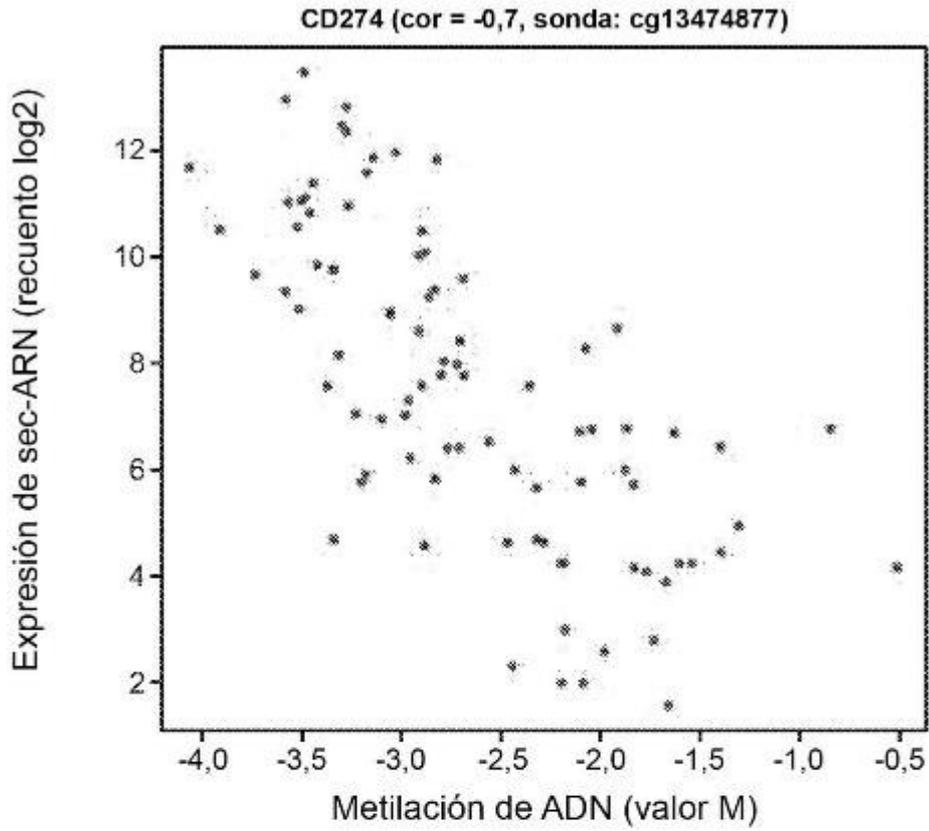


FIG. 6A

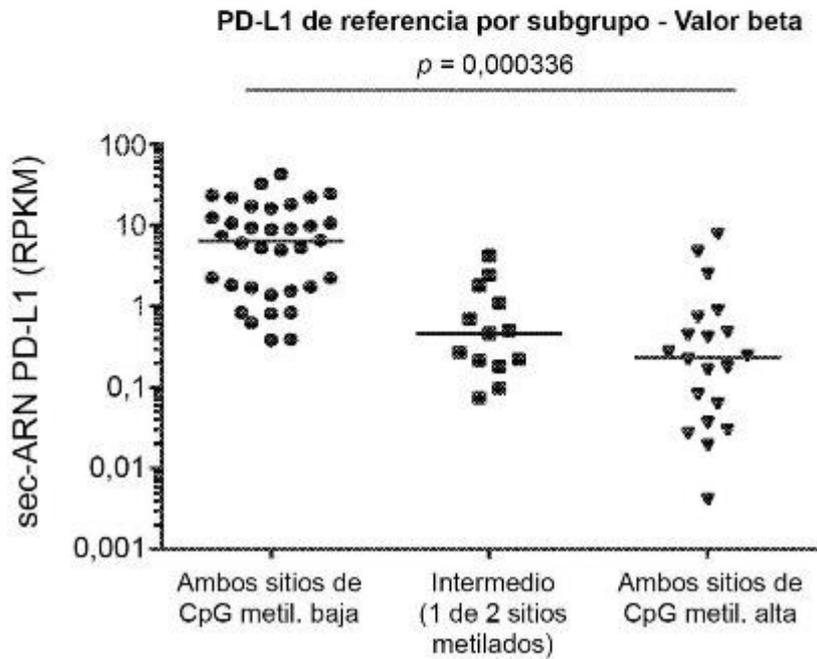


FIG. 6B

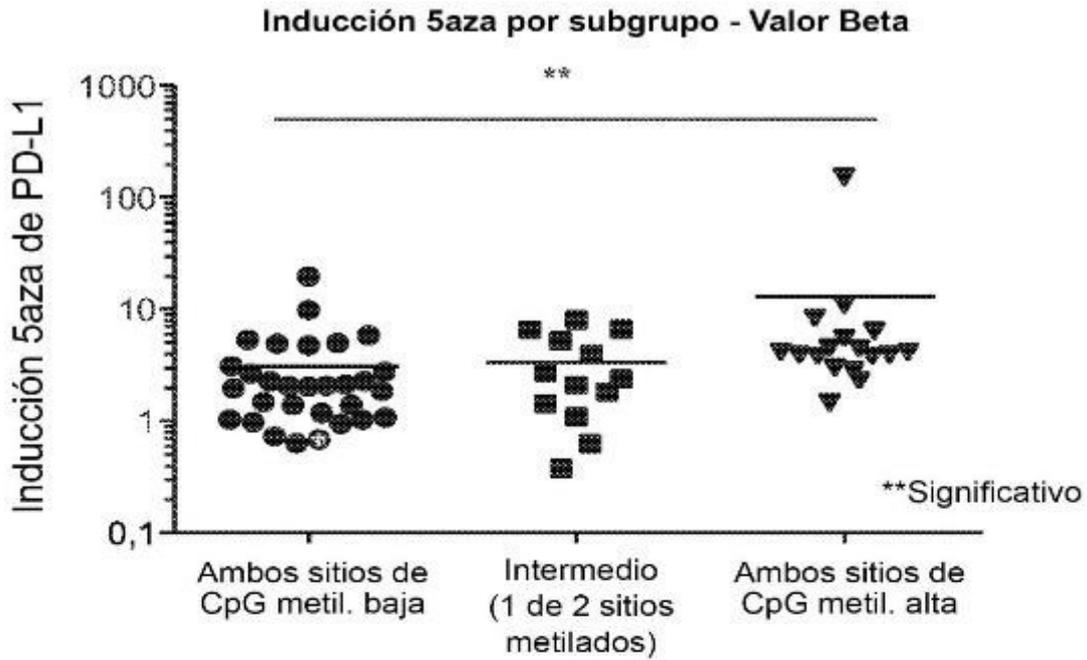


FIG. 6C

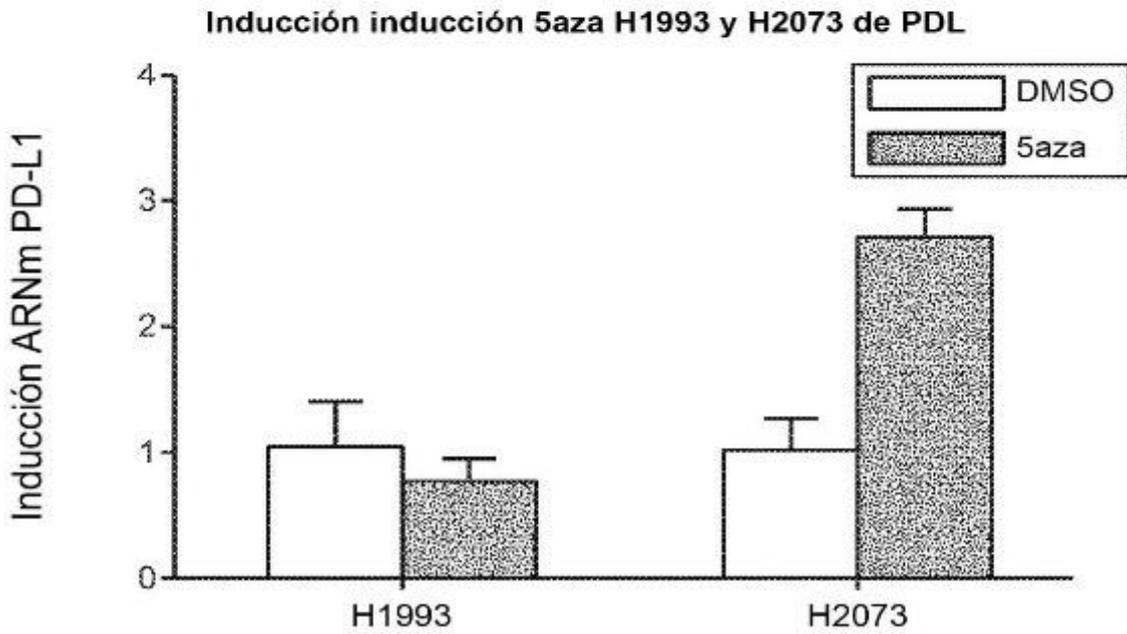


FIG. 6D

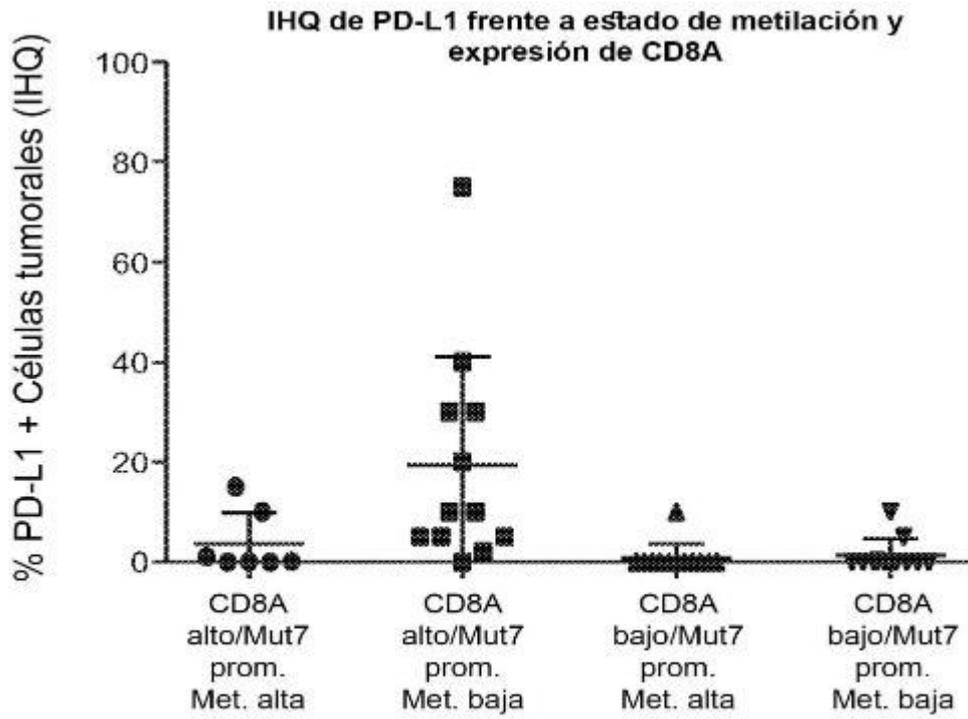


FIG. 7A

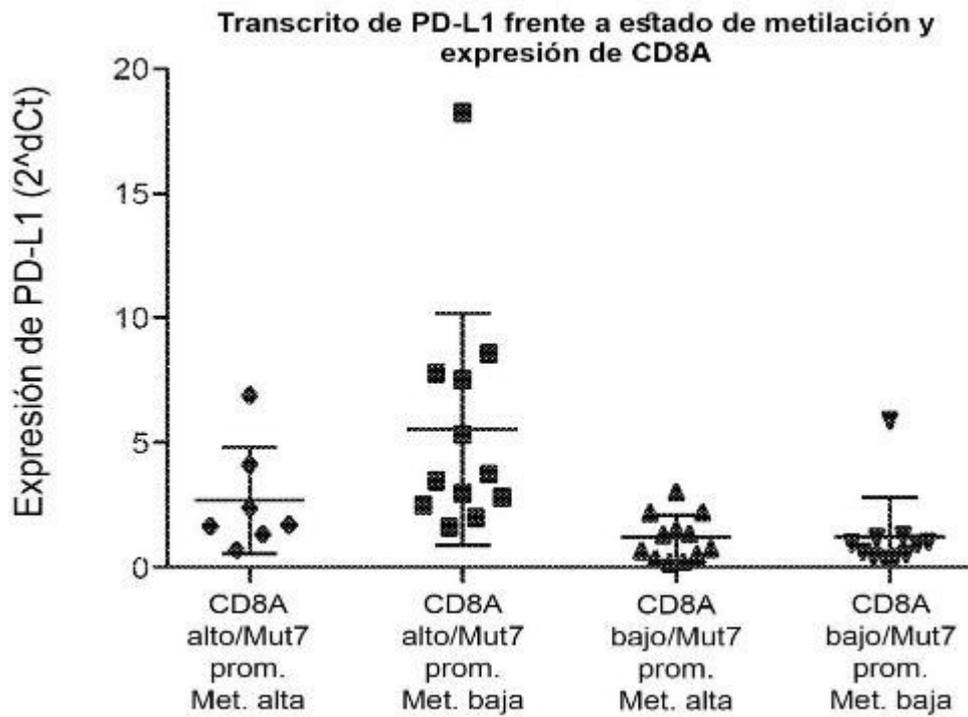


FIG. 7B

FIG. 8A FIG. 8B

FIG. 8A

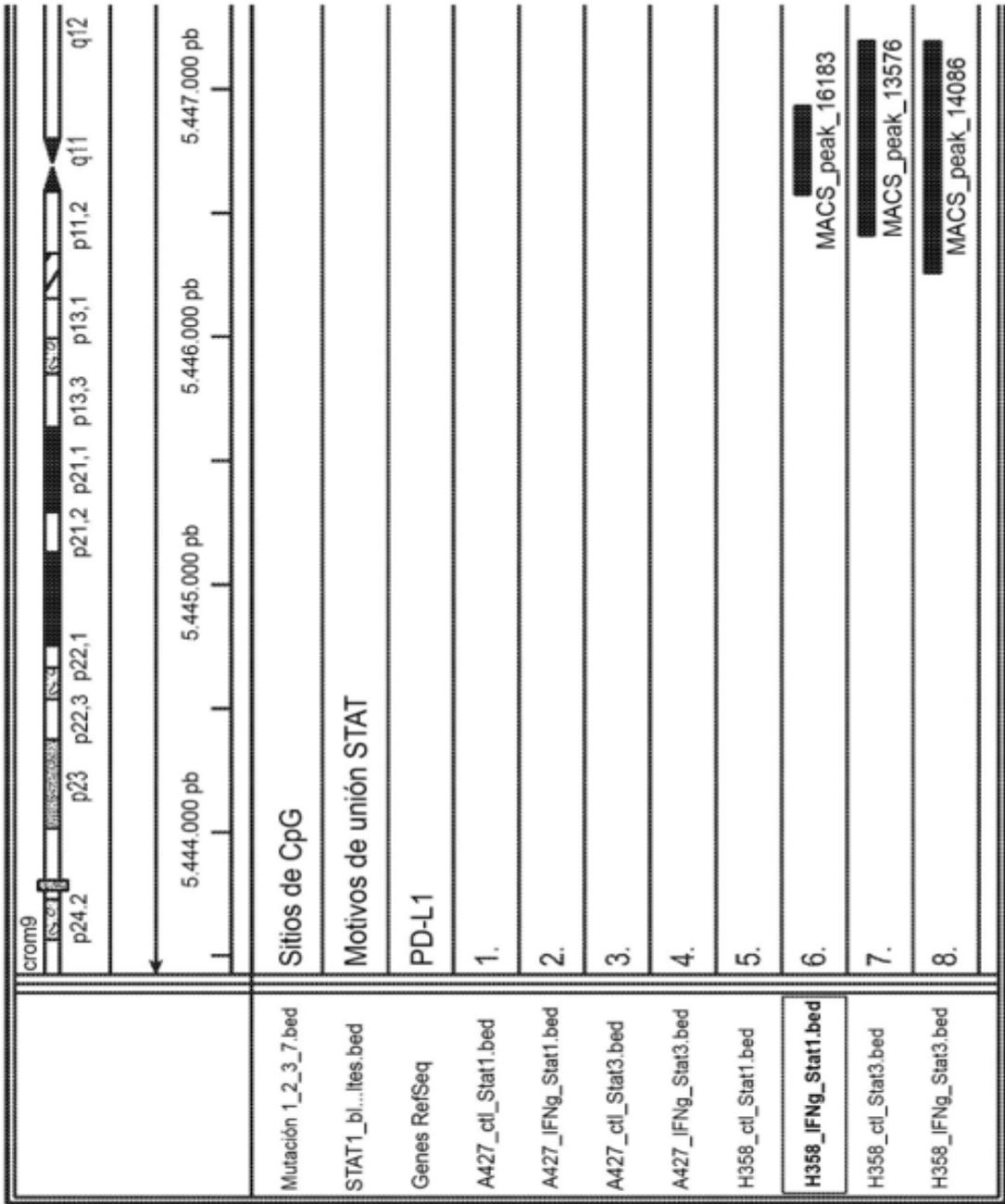


FIG. 8

FIG. 8B

