B.T

SUPERINTENDENCIA DE IND

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-064204- -00000-0000
Fecha: 2011-05-24 17:06:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 286

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

ENTRADA FASE NACIONAL

21. **EXPEDIENTE No.** 11-64204

54. **TITULO** ANTICUERPOS ANTI-PD-L1 Y SU USO PARA MEJORAR LA FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS T

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE** GENENTECH, INC.

DOMICILIO SOUTH SAN FRANCISCO, CA, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

74. **APODERADO** JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. **BOGOTÁ, D.C.**

(FORMA P 10)

Oficina de Comunicaciones

09-07-2011

AS: 116.576

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-064204- -00000-0000 le radicación
Fecha: 2011-05-24 17:06:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 286

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☐ Capítulo I. ☒ Capítulo II.

2 SOLICITANTE

Nombre: **GENENTECH, INC.**

Dirección: 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, Estados Unidos de América.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.
Lugar de Constitución: Estados Unidos de América.
Teléfono: Fax:
E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número _____

3 REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

Dirección: Calle 70 A #4–41, Bogotá, Colombia.

Teléfono: 744-2200 Fax: 742-2200
E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número 80.410.337 TP 57492

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el numero de radicación (del poder). _____

4 INVENTOR (ES) (72)

Nombre: IRVING, Bryan; CHEUNG, Jeanne; CHIU, Henry; LEHAR, Sophie, M.; MAECKER, Heather; MARIATHASAN, Sanjeev; WU, Yan.

Dirección: 587 Arkansas Street, San Francisco, California 94107, Estados Unidos de América; 300 Berry Street, Unit 807, San Francisco, California 94158, Estados Unidos de América; 2334 20TH Avenue, San Francisco, California 94116, Estados Unidos de América; 945 Irving Street, Montara, California 94037, Estados Unidos de América; 733 C Loma Verde Avenue, Palo Alto, California 94303, Estados Unidos de América; 1291 Encina Drive, Millbrae, California 94030, Estados Unidos de América; 1160 Blythe Street, Foster City, California 94404, Estados Unidos de América; respectivamente.
Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América, respectivamente.

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2009/067104 Fecha 08.12.2009
Publicación Internacional No WO 2010/077634 A1 Fecha 08.07.2010

6 Título (54): ANTICUERPOS ANTI-PD-L1 Y SU USO PARA MEJORAR LA FUNCIÓN DE CÉLULAS T

7 Clasificación Internacional (51): _____

8 Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	09.12.2008	61/121,092

9 Comprobante de pago No. 11-37345;10-36.452;11-2781;11-14441;11-23300;10-100.379 **Fecha** 16-05-2011

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10 ANEXOS

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. $ 571.000
- [x] Documento que acredita la existencia y representación legal de la persona jurídica peticionaria, en cuanto no esté inscrita en alguna Cámara de Comercio Colombiana.
- [x] Poderes, si fuere el caso. Fotocopia autenticada.
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. Fotocopia autenticada.
- [x] Traducción de la solicitud internacional al español (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [x] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA).
- [x] Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12x12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional bajo el Art. 34.
- [x] Otros: - Comprobante(s) de pago de la tasa por concepto de reivindicaciones adicionales $ 2.295.000 (85*$27.000).

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:

12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

FIRMA:

C.C. 80.410.337 de Usaquén TP 57492 del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

116576

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0037345

Bogotá D.C., Abril 19 de 2011 - 17:02:50

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	430542302	19/04/2011	66.381.200.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr UNDITARIO	Vr CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	571.000.00	571.000.00
				$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-064204- -00000-0000
Fecha: 2011-05-24 17:06:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 286

116576

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 36,452
FECHA : MAYO 6 DE 2010

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAG	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754327	354692074	05/05/2010	29,820,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	.000.00 000.00

SON: UN MILLON TRESCIENTOS PESOS

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-064204- -00000-0000
Fecha: 2011-05-24 17:06:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 286

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

116576

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 002781

Bogotá D.C., 13 de 2011 - 07:45:52

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	391765861	12/01/2011	61.870.100.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	540.000.00	540.000.00
				$540.000.00

SON: **QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
****

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-064204- -00000-0000
Fecha: 2011-05-24 17:06:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 286

116576 6

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0014441

Bogotá D.C., Febrero 16 de 2011 - 16:51:23

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	391765872	16/02/2011	32.257.100.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	270.000.00	270.000.00
				$270.000.00

SON: **DOSCIENTOS SETENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-064204- -00000-0000
Fecha: 2011-05-24 17:06:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 286

7

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0023300

Bogotá D.C., Marzo 14 de 2011 - 17:06:59

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	324973235	14/03/2011	39.119.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	135.000.00	135.000.00
				$135.000.00

SON: **CIENTO TREINTA Y CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
****

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-064204- -00000-0000

Fecha: 2011-05-24 17:06:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 286

8

1165-16.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 100,379
FECHA : NOVIEMBRE 25 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-064204- -00000-0000
Fecha: 2011-05-24 17:06:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 286

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PASO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	329790496	25/11/2010	50,309,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS		50,000.00
		TOTAL :	$	50,000.00

SON: CINCUENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VISENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

PATENT COOPERATION TREATY PCT/US2009/067104

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

SVOBODA, Craig, G.
Genentech, Inc.
1 DNA Way
MS 49
South San Francisco, California 94080
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
18 February 2011 (18.02.2011)

Applicant's or agent's file reference
P4192R2WO

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2009/067104

International filing date *(day/month/year)*
08 December 2009 (08.12.2009)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG Grenzacherstrasse 124 CH-4070 Basel Switzerland	CH	CH
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:
The person identified in Box 2 should be added to the record as applicant for AT BE BG CH CN CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IN IS IT LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK SM TR.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☒ the International Preliminary Examining Authority
☐ the designated Offices concerned
☒ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Authorized officer
Blanc Veronique
e-mail pt08.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 08

116576 10

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
8 July 2010 (08.07.2010)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2010/077634 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2009/067104

(22) International Filing Date:
8 December 2009 (08.12.2009)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/121,092 9 December 2008 (09.12.2008) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **GENENTECH, INC.** [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **IRVING, Bryan** [US/US]; 587 Arkansas Street, San Francisco, California 94107 (US). **CHEUNG, Jeanne** [US/US]; 300 Berry Street, Unit 807, San Francisco, California 94158 (US). **CHIU, Henry** [US/US]; 2334 20th Avenue, San Francisco, California 94116 (US). **LEHAR, Sophie, M.** [US/US]; 945 Irving Street, Montara, California 94037 (US). **MAECKER, Heather** [US/US]; 733 C Loma Verde Avenue, Palo Alto, California 94303 (US). **MARIATHASAN, Sanjeev** [CA/US]; 1291 Encina Drive, Millbrae, California 94030 (US). **WU, Yan** [US/US]; 1160 Blythe Street, Foster City, California 94404 (US).

(74) Agents: **SVOBODA, Craig, G.** et al.; Genentech, Inc., 1 DNA Way, MS 49, South San Francisco, California 94080 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

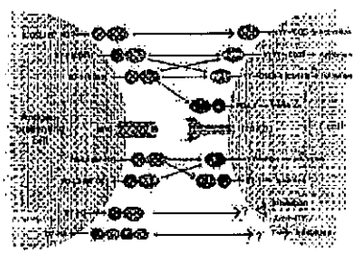
— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

(54) Title: ANTI-PD-L1 ANTIBODIES AND THEIR USE TO ENHANCE T-CELL FUNCTION

B7 Family Costimulation

Figure 1



(57) Abstract: The present application relates to anti-PD-L1 antibodies, nucleic acid encoding the same, therapeutic compositions thereof, and their use enhance T-cell function to upregulate cell-mediated immune responses and for the treatment of T cell dysfunctional disorders, including infection (e.g., acute and chronic) and tumor immunity.

WO 2010/077634 A1

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

(43) Fecha de Publicación Internacional
08 de julio de 2010 (08.07.2010)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/077634 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) Numero de Solicitud Internacional:
PCT/US2009/067104

(22) Fecha de Presentación Internacional:
08 de diciembre de 2009 (08.12.2009)

(25) Lenguaje de entrega: Inglés

(26) Lenguaje de Publicación: Inglés

(30) Datos de la Prioridad:
61/121,092 09 de diciembre de 2008 (09.12.2008) EU

(71) Solicitante *(para todos los Estados designados menos los Estados Unidos)*: **GENENTECH, INC.** [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes *(solo para los Estados Unidos)*: **IRVING, Bryan** [US/US]; 587 Arkansas Street, San Francisco, California 94107 (US). **CHEUNG, Jeanne** [US/US]; 300 Berry Street, Unit 807, San Francisco, California 94158 (US). **CHIU, Henry** [US/US]; 2334 20TH Avenue, San Francisco, California 94116 (US). **LEHAR, Sophie, M.** [US/US]; 945 Irving Street, Montara, California 94037 (US). **MAECKER, Heather** [US/US]; 733 C Loma Verde Avenue, Palo Alto, California 94303 (US). **MARIATHASAN, Sanjeev** [US/US]; 1291 Encina Drive, Millbrae, California 94030 (US). **WU, Yan** [US/US]; 1160 Blythe Street, Foster City, California 94404 (US).

(74) Agente: **SVOBODA, Craig, G.**; Genentech, Inc. 1 DNA Way, MS 49, South San Francisco, California 94080 (US).

(81) Estados Designados (*a menos que se indique lo contrario, para todo tipo de protección nacional disponible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (*a menos que se indique lo contrario, para todo tipo de protección regional disponible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

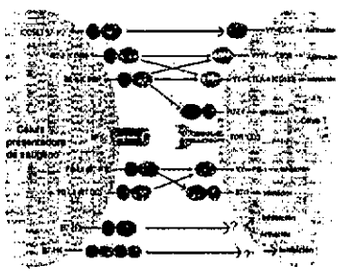
— *Con el informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

— *antes del vencimiento de la fecha límite para modificar las reivindicaciones y ser publicado nuevamente en el evento de recibir modificaciones(Regla 48.2(h))*

— *con el listado de secuencias parte de la descripción (Regla 5.2(a))*

(54) Título: ANTICUERPOS ANTI-PD-L1 Y SU USO PARA MEJORAR LA FUNCIÓN DE CÉLULAS T

Coestimulación de la Familia B7



(57) Resumen: La presente solicitud se refiere a anticuerpos anti-PD-L1, ácidos nucleicos que codifican para los mismos, composiciones terapéuticas de los mismos y su uso que mejora la función de las células T para sobre-regular las respuestas inmunes mediadas por células y para el tratamiento de trastornos disfuncionales de células T, incluyendo infección (por ejemplo, aguda y crónica) e inmunidad tumoral.

ANTICUERPOS ANTI-PD-L1 Y SU USO PARA MEJORAR LA FUNCIÓN DE CÉLULAS T

Solicitudes Relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad bajo 35 USC 119(e) de la Solicitud Provisional de E.U. No. 61/121092, presentada el 9 de diciembre de 2008, cuya descripción se incorpora en la presente mediante la referencia en su totalidad.

Campo de la Invención

Esta invención se refiere en general a la función inmune y al mejoramiento de la función de células T, incluyendo la sobrerregulación de las respuestas inmunes mediadas por células y al tratamiento de trastornos disfuncionales de células T.

Antecedentes de la Invención

La co-estimulación o la provisión de dos señales distintas en las células T es un modelo ampliamente aceptado de la activación de linfocitos de linfocitos T en reposo mediante células que presentan antígeno (APCs). Lafferty et al., Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 53:27-42 (1975). Este modelo proporciona además la discriminación de la tolerancia autónoma de la no autónoma e inmune. Bretscher et al., Science 169:1042-1049 (1970); Bretscher, P.A., P.N.A.S. EUA 96:185-190 (1999); Jenkins et al., J. Exp. Med. 165:302-319 (1987). La señal primaria, o señal específica para antígeno, se transduce a través del receptor de célula T (TCR) después del reconocimiento del péptido de antígeno externo presentado en el contexto del complejo de mayor histocompatibilidad (MHC). La segunda señal o co-estimuladora se suministra a las células T por medio de moléculas co-estimuladoras expresadas en células que presentan el antígeno (APCs) e induce a las células T a promover la expansión clonal, la secreción de citosinas y la función efectora. Lenschow et al., Ann, Rev. Immunol., 14:233 (1996). En ausencia de co-estimulación, las células T pueden volverse refractarias a la estimulación de antígeno, no proporciona una respuesta inmune efectiva y además puede dar como resultado agotamiento o tolerancia a antígenos externos.

El simple modelo de dos señales puede ser una sobre-simplificación debido a que la intensidad de la señal TCR tiene de hecho una influencia

cuantitativa en la activación y la diferenciación de las células T. Viola et al., Science 273:104-106 (1996); Sloan-Lancaster, Nature 363:156-159 (1993). Además, la activación de células T puede presentarse incluso en ausencia de una señal co-estimuladora si la intensidad de la señal TCR es alta. De manera más importante, las células T reciben señales co-estimuladoras secundarias tanto positivas como negativas. La regulación de tales señales positivas y negativas es crítica para maximizar las respuestas inmunes protectoras del huésped, mientras mantiene la tolerancia inmune y previene la autoinmunidad. Las señales secundarias negativas parecen necesarias para la inducción de la tolerancia en células T, mientras que las señales positivas promueven la activación de las células T. Aunque el simple modelo de dos señales proporciona aún una explicación válida para linfocitos no tratados anteriormente, la respuesta inmune de un huésped es un proceso dinámico y las señales co-estimuladoras también pueden proporcionarse a células T expuestas al antígeno.

El mecanismo de co-estimulación es de interés terapéutico debido a que la manipulación de las señales co-estimuladoras ha demostrado proporcionar un medio ya sea para mejorar o terminar la respuesta inmune en base a células. Recientemente, se ha descubierto que la disfunción o anergia de las células T se presenta concurrentemente con una expresión inducida y sostenida del polipéptido 1 de muerte programada (PD-1) del receptor inhibitorio. Como resultado, la dirección terapéutica de PD-1 y a otras moléculas que producen señales a través de interacciones con PD-1, tales como el ligando 1 de muerte programada (PD-L1) y el ligando 2 de muerte programada (PD-L2), son un área de gran interés. La inhibición de la señalización de PD-L1 se ha propuesto como un medio para mejorar la inmunidad de las células T para el tratamiento de cáncer (e.g., inmunidad tumoral) e infección, incluyendo infección tanto aguda como crónica (e.g., persistente). Sin embargo, ya que aún tiene que comercializarse un terapéutico óptimo dirigido a un objetivo en esta trayectoria, existe una significativa necesidad médica no cumplida.

Sumario de la Invención

La presente invención proporciona anticuerpos anti-PD-L1, incluyendo la codificación de ácido nucleico y composiciones que contienen tales anticuerpos, y su uso para mejorar la función de las células T para sobre-regular las respuestas inmunes mediadas por células y el tratamiento de trastornos disfuncionales de células T, incluyendo infección (e.g., aguda y crónica) e

inmunidad tumoral.

En una modalidad, la invención proporciona un polipéptido aislado de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en donde:

(a) la secuencia HVR-H1 es GFTFSX$_1$SWIH (SEQ ID NO: 1);

(b) la secuencia HVR-H2 es AWIX$_2$PYGGSX$_3$YYADSVKG (SEQ ID NO: 2);

(c) la secuencia HVR-H3 es RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 3);

en donde además: X_1 es D o G; X_2 es S o L; X_3 es T o S.

En un aspecto específico, X_1 es D; X_2 es S y X_3 es T. En otro aspecto, el polipéptido comprende además secuencias marco de región variable de cadena pesada yuxtapuestas entre las HVRs 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 marco se derivan de secuencias humanas de estructura de consenso. En un aspecto adicional, las secuencias marco son estructuras de consenso del subgrupo III de VH. Aún en un aspecto adicional, al menos una de las secuencias marco 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 WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 7).

Aún en un aspecto adicional, el polipéptido de cadena pesada se combina adicionalmente con una cadena ligera de región variable que comprende una HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, en donde:

(a) la secuencia HVR-L1 es RASQX$_4$X$_5$X$_6$TX$_7$X$_8$A (SEQ ID NO: 8);

(b) la secuencia HVR-L2 es SASX$_9$LX$_{10}$S (SEQ ID NO: 9);

(c) la secuencia HVR-L3 es QQX$_{11}$X$_{12}$X$_{13}$X$_{14}$PX$_{15}$T (SEQ ID NO: 10);

en donde además: X_4 es D o V; X_5 es V o I; X_6 es S o N; X_7 es A o F; X_8 es V o L; X_9 es F o T; X_{10} es Y o A; X_{11} es Y, G, F o S; X_{12} es L, Y, F o W; X_{13} es Y, N, A, T, G, F o I; X_{14} es H, V, P, T o I; X_{15} es A, W, R, P o T.

Aún en un aspecto adicional, X_4 es D; X_5 es V; X_6 es S; X_7 es A; X_8 es V; X_9 es F; X_{10} es Y; X_{11} es Y; X_{12} es L; X_{13} es Y; X_{14} es H; X_{15} es A. Aún en un aspecto adicional, la cadena ligera comprende además secuencias marco de región variable de cadena ligera yuxtapuestas entre las HVRs de acuerdo con la fórmula: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4).

Aún en un aspecto adicional, las secuencias marco se derivan de secuencias humanas de estructura de consenso. Aún en un aspecto adicional, las secuencias marco son la estructura de consenso kappa I de VL. Aún en un aspecto adicional, al menos una secuencia marco es la siguiente:

LC-FR1 es DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 11)

LC-FR2 es WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 12)

LC-FR3 es GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 13)

LC-FR4 es FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 14).

En otra modalidad, la invención proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 o fragmento de enlace al antígeno que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y de cadena ligera en donde:

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

(i) la secuencia HVR-H1 es GFTFSX$_1$SWIH (SEQ ID NO: 1)

(ii) la secuencia HVR-H2 es AWIX$_2$PYGGSX$_3$YYADSVKG (SEQ ID NO: 2)

(iii) la secuencia HVR-H3 es RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 3) y

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

(i) la secuencia HVR-L1 es RASQX$_4$X$_5$X$_6$TX$_7$X$_8$A (SEQ ID NO: 8);

(ii) la secuencia HVR-L2 es SASX$_9$LX$_{10}$S (SEQ ID NO: 9); y

(iii) la secuencia HVR-L3 es QQX$_{11}$X$_{12}$X$_{13}$X$_{14}$PX$_{15}$T (SEQ ID NO: 10);

en donde además: X$_1$ es D o G; X$_2$ es S o L; X$_3$ es T o S; X$_4$ es D o V; X$_5$ es V o I; X$_6$ es S o N; X$_7$ es A o F; X$_8$ es V o L; X$_9$ es F o T; X$_{10}$ es Y o A; X$_{11}$ es Y, G, F o S; X$_{12}$ es L, Y, F o Q; X$_{13}$ es Y, N, A, T, G, F o I; X$_{14}$ es H, V, P, T o I; X$_{15}$ es A, W, R, P o T.

En un aspecto específico, X$_1$ es D; X$_2$ es S y X$_3$ es T. En otro aspecto, X$_4$ es D; X$_5$ es V; X$_6$ es S; X$_7$ es A; X$_8$ es V; X$_9$ es F; X$_{10}$ es Y; X$_{11}$ es Y; X$_{12}$ es L; X$_{13}$ es Y; X$_{14}$ es H; X$_{15}$ es A. Aún en otro aspecto, X$_1$ es D; X$_2$ es S y X$_3$ es T, X$_4$ es D; X$_5$ es V; X$_6$ es S; X$_7$ es A, X$_8$ es V; X$_9$ es F; X$_{10}$ es Y; X$_{11}$ es Y; X$_{12}$ es L; X$_{13}$ es Y; X$_{14}$ es H y X$_{15}$ es A.

En un aspecto adicional, la región variable de cadena pesada comprende una o más secuencias marco yuxtapuestas entre las HVRs como: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4) y la región variable de cadena ligera comprende una o más secuencias marco

yuxtapuestas entre las HVRs como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Aún en un aspecto adicional, las secuencias marco se derivan de secuencias humanas de estructura de consenso. Aún en otro aspecto, las secuencias marco de cadena pesada se derivan de la secuencia del subgrupo Kabat I, II o III. Aún en un aspecto adicional, la secuencia marco de cadena pesada es una estructura de consenso del subgrupo III de VH. Aún en un aspecto adicional, una o más de las secuencias marco de cadena pesada 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 WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 7).

Aún en un aspecto adicional, las secuencias marco de cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo I, II, III o IV Kabat kappa. Aún en un aspecto adicional, las secuencias marco de cadena ligera son la estructura de consenso kappa I de VL. Aún en un aspecto adicional, una o más de las secuencias marco de cadena ligera es la siguiente:

LC-FR1 es DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 11)

LC-FR2 es WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 12)

LC-FR3 es GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 13)

LC-FR4 es FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 14).

Aún en un aspecto específico adicional, el anticuerpo comprende además una región constante humana o murina. Aún en un aspecto adicional, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste de IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Aún en un aspecto adicional específico, la región constante humana es IgG1. Aún en un aspecto adicional, la región constante murina es IgG1. Aún en un aspecto adicional, la región constante murina se selecciona del grupo que consiste de IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Aún en un aspecto adicional, la región constante murina es IgG2A. Aún en un aspecto adicional específico, el anticuerpo tiene una función efectora reducida o mínima. Aún en un aspecto adicional específico la mínima función efectora resulta de una "mutación de Fc no efectora" o aglicosilación. Aún en una modalidad adicional, la mutación de Fc no efectora es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

Aún en otra modalidad, la invención proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y de

cadena ligera, en donde:

(a) la cadena pesada comprende además una secuencia HVR-H1, HVR-H2 y una HVR-H3 que tiene una identidad de secuencia de al menos 85% para GFTFSDSWIH (SEQ ID NO: 15), AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 16) y RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 3), respectivamente, o

(b) la cadena ligera comprende además una secuencia HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que tiene una identidad de secuencia de al menos 85% para 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 de 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%. En otro aspecto, la región variable de cadena pesada comprende una o más secuencias marco yuxtapuestas entre las HVRs como: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4) y la región variable de cadena ligera comprende una o más secuencias marco yuxtapuestas entre las HVRs como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Aún en un aspecto, las secuencias marco se derivan de secuencias humanas de estructura de consenso. Aún en un aspecto adicional, las secuencias marco de cadena pesada se derivan de la secuencia del subgrupo Kabat I, II o III. Aún en un aspecto adicional, la secuencia marco de cadena pesada es una estructura de consenso del subgrupo III de VH. Aún en un aspecto adicional, una o más de las secuencias marco de cadena pesada 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 WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 7).

Aún en un aspecto adicional, las secuencias marco de cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo I, II, III o IV Kabat kappa. Aún en un aspecto adicional, las secuencias marco de cadena ligera son la estructura de consenso kappa I de VL. Aún en un aspecto adicional, una o más de las secuencias marco de cadena ligera es la siguiente:

LC-FR1 es DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 11)

LC-FR2 es WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 12)

LC-FR3 es GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 13)

LC-FR4 es FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 14).

Aún en un aspecto específico adicional, el anticuerpo comprende además una región constante humana o murina. Aún en un aspecto adicional, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste de IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Aún en un aspecto adicional específico, la región constante humana es IgG1. Aún en un aspecto adicional, la región constante murina se selecciona del grupo que consiste de IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Aún en un aspecto adicional, la región constante murina es IgG2A. Aún en un aspecto adicional específico, el anticuerpo tiene una función efectora reducida o mínima. Aún en un aspecto adicional específico la mínima función efectora resulta de una "mutación de Fc no efectora" o aglicosilación. Aún en una modalidad adicional, la mutación de Fc no efectora es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

Aún en una modalidad adicional, la invención proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y de cadena ligera, en donde:

(a) la secuencia de cadena pesada tiene una identidad de secuencia de al menos 85% para la secuencia de cadena pesada: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISP YGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDY WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 20) o

(b) la secuencia de cadena ligera tiene una identidad de secuencia de al menos 85% para la secuencia de cadena ligera: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY SASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKV EIKR (SEQ ID NO: 21).

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

un aspecto adicional, la secuencia marco de cadena pesada es una estructura de consenso del subgrupo III de VH. Aún en un aspecto adicional, una o más de las secuencias marco de cadena pesada 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 WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 7).

Aún en un aspecto adicional, las secuencias marco de cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo I, II, III o IV Kabat kappa. Aún en un aspecto adicional, las secuencias marco de cadena ligera son la estructura de consenso kappa I de VL. Aún en un aspecto adicional, una o más de las secuencias marco de cadena ligera es la siguiente:

LC-FR1 es DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 11)

LC-FR2 es WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 12)

LC-FR3 es GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 13)

LC-FR4 es FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 14).

Aún en un aspecto específico adicional, el anticuerpo comprende además una región constante humana o murina. Aún en un aspecto adicional, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste de IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Aún en un aspecto adicional específico, la región constante humana es IgG1. Aún en un aspecto adicional, la región constante murina se selecciona del grupo que consiste de IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Aún en un aspecto adicional, la región constante murina es IgG2A. Aún en un aspecto adicional específico, el anticuerpo tiene una función efectora reducida o mínima. Aún en un aspecto adicional específico la mínima función efectora resulta de la producción en células procarióticas. Aún en un aspecto adicional específico, la mínima función efectora resulta de una "mutación de Fc no efectora" o aglicosilación. Aún en una modalidad adicional, la mutación de Fc no efectora es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

Aún en una modalidad adicional, la invención proporciona composiciones que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 en combinación con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Aún en una modalidad adicional, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica para una secuencia de región variable de cadena

pesada y de cadena ligera de un anticuerpo anti-PD-L1, en donde:

(a) la secuencia de cadena pesada comprende además una secuencia HVR-H1, HVR-H2 y una HVR-H3 que tiene una identidad de secuencia de al menos 85% para GFTFSDSWIH (SEQ ID NO: 15), AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 16) y RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 3), respectivamente, o

(b) la cadena ligera comprende además una secuencia HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que tiene una identidad de secuencia de al menos 85% para 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 de 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%. En otro aspecto, la región variable de cadena pesada comprende una o más secuencias marco yuxtapuestas entre las HVRs como: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4) y la región variable de cadena ligera comprende una o más secuencias marco yuxtapuestas entre las HVRs como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Aún en otro aspecto, las secuencias marco se derivan de secuencias humanas de estructura de consenso. En un aspecto adicional, las secuencias marco de cadena pesada se derivan de la secuencia del subgrupo Kabat I, II o III. Aún en un aspecto adicional, la secuencia marco de cadena pesada es una estructura de consenso del subgrupo III de VH. Aún en un aspecto adicional, una o más de las secuencias marco de cadena pesada 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 WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 7).

Aún en un aspecto adicional, las secuencias marco de cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo I, II, III o IV Kabat kappa. Aún en un aspecto adicional, las secuencias marco de cadena ligera son la estructura de consenso kappa I de VL. Aún en un aspecto adicional, una o más de las secuencias marco de cadena ligera es la siguiente:

LC-FR1 es DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 11)

LC-FR2 es WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 12)

LC-FR3 es GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID

NO: 13)

LC-FR4 es FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 14).

Aún en un aspecto específico adicional, el anticuerpo comprende además una región constante humana o murina. Aún en un aspecto adicional, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste de IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Aún en un aspecto adicional específico, la región constante humana es IgG1. Aún en un aspecto adicional, la región constante murina se selecciona del grupo que consiste de IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Aún en un aspecto adicional, la región constante murina es IgG2A. Aún en un aspecto adicional específico, el anticuerpo tiene una función efectora reducida o mínima. Aún en un aspecto adicional específico, la mínima función efectora resulta de la producción en células procarióticas. Aún en un aspecto adicional específico la mínima función efectora resulta de una "mutación de Fc no efectora" o aglicosilación. Aún en un aspecto adicional, la mutación de Fc no efectora es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

Aún en un aspecto adicional, el ácido nucleico comprende además un vector adecuado para la expresión del ácido nucleico que codifica para cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 previamente descritos. Aún en un aspecto adicional, el vector comprende además una célula huésped adecuada para la expresión del ácido nucleico. Aún en un aspecto específico, la célula huésped es una célula eucariótica o una célula procariótica. Aún en un aspecto adicional específico, la célula eucariótica es una célula de mamífero, tal como de ovario de hámster Chino (CHO).

Aún en una modalidad adicional, la invención proporciona un proceso para producir un anticuerpo anti-PD-L1 o fragmento de enlace al antígeno del mismo, que comprende cultivar una célula huésped que contiene un ácido nucleico que codifica para cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 o fragmento de enlace al antígeno previamente descritos en una forma adecuada para la expresión, bajo condiciones adecuadas para producir tal anticuerpo o fragmento, y recuperar el anticuerpo o fragmento.

Aún en una modalidad adicional, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-PD-L1 o fragmento de enlace al antígeno del mismo como se proporciona en la presente y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Aún en una modalidad adicional, la invención proporciona un artículo de manufactura que comprende un contenedor que contiene una cantidad

terapéuticamente efectiva de una composición descrita en la presente y un inserto de empaque indicando el uso para el tratamiento de un trastorno disfuncional de células T.

Aún en una modalidad adicional, la invención proporciona un artículo de manufactura que comprende cualquiera de las composiciones anti-PD-L1 antes descritas en combinación con al menos una molécula BNCA. En un aspecto, la molécula BNCA es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de enlace al antígeno, oligopéptido BNCA, ARNi BNCA o molécula pequeña BNCA. En otro aspecto, la molécula co-estimuladora B7 negativa se selecciona del grupo que consiste de: CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, B7.1, B7-H3 y B7-H4.

Aún en una modalidad adicional, el artículo de manufactura comprende cualquiera de las composiciones anti-PD-L1 antes descritas en combinación con un agente quimioterapéutico. En un aspecto, el agente quimioterapéutico es gemcitabina.

Aún en una modalidad adicional, la invención proporciona un artículo de manufactura que comprende cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 antes descritos en combinación con uno o más agonistas de una molécula co-estimuladora positiva. En un aspecto, una molécula co-estimuladora positiva es una molécula co-estimuladora de la familia B7. En otro aspecto, la molécula co-estimuladora positiva se selecciona del grupo que consiste de: CD28, CD80, CD86, ICOS/ICOSL. Aún en otro aspecto, la molécula co-estimuladora positiva es una molécula co-estimuladora de la familia TNFR. En un aspecto adicional, la molécula co-estimuladora TNFR se selecciona del grupo que consiste de: OX40/OX40L, 4-1BB/4-1BBL, CD27/CD27L, CD30/CD30L y HVEM/LIGHT y fragmentos, construcciones y anticuerpos agonistas solubles de los mismos.

Aún en una modalidad adicional, la invención proporciona un artículo de manufactura que comprende cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 antes descritos en combinación con uno o más antibióticos. En un aspecto, el antibiótico se selecciona del grupo que consiste de un agente anti-viral, un agente anti-bacteriano, un agente anti-fungal, un agente anti-protozoarios.

En otro aspecto, el agente antiviral se selecciona del grupo que consiste de inhibidores de transcriptasa inversa, inhibidores de proteasa, inhibidores de integrasa, inhibidores de entrada o de fusión, inhibidores de maduración, inhibidores de liberación viral, mejoradores de respuesta inmune, mejoradores sinergísticos antivirales, vacunas, agonistas hepáticos y terapias herbales. Aún en otro aspecto, la combinación comprende una o más categorías

de agentes antivirales.

Aún en una modalidad adicional, la invención proporciona un artículo de manufactura que comprende cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 antes descritos en combinación con una o más vacunas.

Aún en una modalidad adicional, la invención proporciona un método para mejorar la función de las células T que comprende administrar una cantidad efectiva de cualquiera de los anticuerpos o composiciones anti-PD-L1 antes descritos. En un aspecto, el anticuerpo o composición anti-PD-L1 hace las células T disfuncionales, no disfuncionales.

Aún en una modalidad adicional, la invención proporciona un método para tratar un trastorno disfuncional de célula T que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de cualquiera de los anticuerpos o composiciones anti-PD-L1 antes descritos. En un aspecto específico, el trastorno disfuncional de células T es infección o inmunidad tumoral. En otro aspecto la infección es aguda o crónica. En otro aspecto, la infección crónica es persistente, latente o lenta. Aún en otro aspecto, la infección crónica resulta de un patógeno seleccionado del grupo que consiste de bacterias, virus, hongos y protozoarios. En un aspecto adicional, el nivel del patógeno en el huésped es reducido. Aún en un aspecto adicional, el método comprende además el tratamiento con una vacuna. Aún en un aspecto adicional, el método comprende además el tratamiento con antibióticos. Aún en un aspecto adicional, el patógeno es una bacteria, y el método comprende además la administración de un agente antibacteriano. Aún en un aspecto adicional, la bacteria se selecciona del grupo que consiste de: *Mycobacterium spp., Salmonella spp., Listeria spp., Streptococcus spp., Haemophilus spp., neisseria spp., klebsiella spp., Borrelia spp., Bacterioides fragillis, Treponema spp., y Helicobacter pylori.* Aún en un aspecto adicional, el patógeno es un virus, y el método comprende además la administración de un agente antiviral. Aún en un aspecto adicional, el virus se selecciona del grupo que consiste de: hepatitis B, C, virus I y II de herpes simple, virus I y II de inmunodeficiencia humana, citomegalovirus, virus Eppstein Barr, virus de papiloma humano, virus I y II T linfotróficos humanos, varicalla zoster. Aún en un aspecto adicional, el patógeno es un hongo, y el método comprende además la administración de un agente anti-fungal. Aún en un aspecto adicional, el trastorno se selecciona del grupo que consiste de: aspergilosis, blastomicosis, candidiasis albicans, coccidioiodmicosis immitis, histoplasmosis, paracoccidioiomicosis, microsporidiosis. Aún en un aspecto adicional, el patógeno

es un protozoario y el método comprende además la administración de un agente anti-protozoarios. Aún en un aspecto adicional, el trastorno se selecciona del grupo que consiste de: leishmaniasis, plasmodiosis (i.e., malaria), criptosporidiosis, toxoplasmosis, tripanosomiasis e infecciones helminth, incluyendo aquellas que resultan de trematodos (e.g., esquistosomiasis), cestodos (e.g., (e.g., equinococosis) y nematodos (e.g., triquinosis, ascariasis, filariosis y estrongilodiosis).

Aún en un aspecto adicional, el trastorno disfuncional de células T es inmunidad tumoral. Aún en un aspecto adicional, el anticuerpo o composición de PD-L1 se combina con un régimen de tratamiento que comprende además una terapia tradicional seleccionada del grupo que consiste de terapia de radiación, quimioterapia, terapia dirigida, inmunoterapia, terapia hormonal, inhibición de angiogénesis y cuidados paliativos. Aún en un aspecto específico adicional, el tratamiento de quimioterapia se selecciona del grupo que consiste de: gemcitabina, ciclofosfamida, doxorubicina, paclitaxel, cisplatina. Aún en un aspecto adicional específico, la inmunidad tumoral resulta de un cáncer seleccionado del grupo que consiste de: cáncer de mama, pulmón, colon, ovario, melanoma, vejiga, riñón, hígado, salival, estomacal, gliomas, tiroides, tímico, epitelial, cánceres de cabeza y cuello, gástrico y pancreático.

Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1 es una ilustración gráfica que representa la co-estimulación de las células T por medio de la familia B7 de moléculas de superficie celular.

La Figura 2 es una esquemática que muestra el diseño experimental del ensayo de estimulación de células T PMEL/B16.

La Figura 3 es una gráfica de barras que muestra el efecto de un anticuerpo anti-PD-L1 en una función de la célula T específica para antígeno a través de la producción mejorada de IFN-γ en células T PMEL CD8+ en respuesta al péptido de melanocito gp100. Tanto el porcentaje de células T CD8+ que producen IFN-γ como sus niveles de producción de IFN-γ se incrementan durante la estimulación en presencia del anticuerpo anti-PD-L1.

La Figura 4 es una gráfica de barras que muestra el efecto del anticuerpo anti-PD-L1 en la función de la célula T específica para antígeno a través del mejoramiento en la proliferación de células T CD4+ específicas de Ova mediante el anticuerpo anti-PD-L1 YW243.55.S1 en una estimulación secundaria

con células B A20 impulsadas por Ova/APCs mPD-L1.

La Figura 5 es una serie de diagramas FACS que muestra el mejoramiento en la proliferación de células T CD8 humanas mediante el anticuerpo anti-PD-L1 YW243.55.S1 en una reacción de linfocitos mezclada. También se reporta el porcentaje de las células que proliferan, medido por medio de la dilución en intensidad de CFSE.

La Figura 6 es una esquemática del diseño experimental del tratamiento de LCMV crónica con la forma quimérica del anticuerpo anti-PD-L1 YW243.55.S70. Las flechas designan el cronometraje de las 6 dosis de anti-PD-L1 iniciado 14 días después de la infección con 2 x 10^6 de pfu Clone 13 LCMV.

Las Figuras 7A y 7B son gráficas que muestran la función efectora mejorada de CD8 en células ex vivo después del tratamiento in vivo de la infección LCMV crónica por medio del anticuerpo anti-PD-L1 YW243.55.S70. El bloqueo de PD-L1 mediante YW243.55.S70 incrementó la desgranulación de las células T CD8+ (medido por el incremento en CD107A de superficie) (Figura 7A) e incrementó el % de células productoras de IFN-gamma en respuesta al péptido LCMV gp33 (Figura 7B). La frecuencia de las células específicas de gp33 se revela mediante manchado con pentámeros de gp33 H2-Db.

Las Figuras 8A y 8B muestran la reducción en las titulaciones de LCMV en sangre y tejidos en la infección LCMV crónica después del tratamiento in vivo con anticuerpo anti-PD-L1. En la Figura 8A, las titulaciones virales de los diversos tejidos indicados se analizan en los días 21 y 28, una y dos semanas después del tratamiento con anticuerpo, respectivamente. En la Figura 8B las titulaciones virales en suero se analizan en los días 0, 7, 14, 21 y 28, con inoculación de LCMV presentándose en el día 0 y tratamiento comenzando en el día 14.

La Figura 9A muestra una significativa reducción en el crecimiento del tumor de carcinoma de colon MC38.Ova como resultado de la aplicación del anticuerpo anti-PD-L1 después del tratamiento terapéutico de los tumores establecidos (el tratamiento comenzó en el día 14, cuando el tumor era de 250 mm^3). La Figura 9B es un histograma que muestra los niveles de superficie de la expresión de PD-L1 en células MC38.Ova en cultivo celular, medidos mediante citometría de flujo. PD-L2 no se expresa por las células MC38.Ova.

La Figura 10 es una gráfica que muestra el efecto del tratamiento de bloqueo de PD-L1 solo y en combinación ya sea con anti-VEGF o gemcitabina en el crecimiento e tumores MC38.Ova en ratones C57BL/6.

Las Figuras 11A-B son las secuencias de región variable de cadena ligera, respectivamente, de 11 anticuerpos anti-PD-L1 identificados mediante despliegue de fago. Las barras sombreadas muestran las CDRs con diversas definiciones, mientras que las áreas encasilladas muestran la extensión de las HVRs.

Descripción Detallada de la Modalidad Preferida

Todas las referencias mencionadas en la presente se incorporan específicamente mediante la referencia.

Técnicas Generales.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otra manera, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican totalmente en la literatura, tal como, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Clonación molecular: un manual de laboratorio), segunda edición (Sambrook et al., 1989); *Oligonucleotide Synthesis* (Síntesis de oligonucleótidos) (M.J. Gaite d., 1984); *Animal Cell Culture* (Cultivo celular animal) (R.I. Freshney ed., 1987); *Methods in Enzymology* (Métodos en enzimología) (Academic Press, Inc.); *Current Protocols in Molecular Biology* (Protocolos actuales en biología molecular) (F.M. Ausubel et al., eds., 1987, y actualizaciones periódicas); *PCR: The Polymerase Chain Reaction* (PCR: la reacción en cadena de polimerasa) (Mullis et al., ed., 1994); *A Practical Guide to Molecular Cloning* (Una guía práctica para la clonación molecular) (Perbal Bernard V., 1988); *Phage Display: A Laboratory Manual* (Despliegue de fago: un manual de laboratorio) (Barbas et al., 2001).

I. Inmunidad al Huésped

A. Desarrollo y activación de linfocito

Los dos principales tipos de linfocitos en humanos son T (derivados del timo) y B (derivados de médula ósea). Estas células se derivan de células precursoras hematopoyéticas en la médula ósea y en el hígado fetal que se han internado en la trayectoria de desarrollo linfoide. La progenie de estas células precursoras sigue diferentes trayectorias para madurar en linfocitos ya sea B o T. el desarrollo en linfocitos B humanos tiene lugar totalmente dentro de la médula ósea. Las células T, por otra parte, se desarrollan a partir de precursores inmaduros que dejan la médula y viajan a través de la corriente sanguínea hacia el

timo, en donde proliferan y se diferencian en linfocitos T maduros.

Los linfocitos maduros que emergen del timo o médula ósea están en un estado quieto o "reposado", i.e., son mitóticamente inactivos. Cuando se dispersan en la corriente sanguínea, estos linfocitos "no tratados" o "vírgenes", viajan hacia varios órganos linfoides secundarios o periféricos, tales como el bazo, nodos linfáticos o amígdalas. La mayoría de los linfocitos vírgenes tienen una extensión de vida inherentemente corta y mueren dentro de pocos días después de dejar la médula o el timo. Sin embargo, si tales células reciben señales que indican la presencia de un antígeno, éstas pueden activarse y experimentar rondas sucesivas de división celular. Algunas de las células progenie resultantes se revierten entonces al estado de reposo para convertirse en células B y T – linfocitos de memoria que se preparan esencialmente para el siguiente encuentro con el alérgeno estimulante. La otra progenie de linfocitos vírgenes activados son células efectoras que sobreviven solamente algunos días, pero que llevan a cabo actividades defensivas específicas.

La activación de linfocitos se refiere a una serie de eventos ordenados a través de los cuales pasa un linfocito en reposo a medida que se estimula para dividirse y producir progenie, de la cual algunos se convierten en células efectoras. Una respuesta total incluye tanto la inducción de la proliferación celular (mitogénesis) como la expresión de funciones inmunológicas. Los linfocitos se inactivan cuando se enlazan ligandos específicos a los receptores en sus superficies. Los ligandos son diferentes para las células T y las células B, pero los mecanismos fisiológicos intracelulares resultantes son similares.

Algunos antígenos externos por sí mismos pueden inducir la activación de linfocitos, especialmente grandes antígenos poliméricos que reticulan inmunoglobulinas de superficie en células B, u otras glicoproteínas en células T. Sin embargo, la mayoría de los antígenos no son poliméricos e incluso el enlace directo a las células B en grandes números falla en dar como resultado la activación. Estos antígenos más comunes activan las células B cuando éstas se co-estimulan con linfocitos T auxiliares activados cercanos. Tal estimulación puede presentarse a partir de linfosinas secretadas por la célula T, pero se transmite más eficientemente mediante el contacto directo de la célula B con proteínas de superficie de célula T que interactúan con ciertos receptores de superficie de célula B para generar una señal secundaria.

B. Células T

Los linfocitos T no expresan inmunoglobulinas, pero, en su lugar,

detectan la presencia de sustancias externas por medio de proteínas de superficie llamadas receptores de célula T (TCR). Estos receptores reconocen antígenos ya sea mediante contacto directo o a través de la influencia de la actividad de otras células inmunes. Junto con los macrófagos, las células T son del tipo de células primarias implicadas en la inmunidad mediada por células.

A diferencia de las células B, las células T pueden detectar sustancias externas solamente en contextos específicos. En particular, los linfocitos T reconocerán una proteína externa solamente si ésta se divide primero en pequeños péptidos que después se despliegan sobre la superficie de una segunda célula huésped, llamada una célula que presenta el antígeno (APC). Muchos tipos de células huésped pueden presentar antígenos bajo algunas condiciones, pero ciertos tipos están adaptados más específicamente para este propósito y son particularmente importantes en el control de la actividad de las células T, incluyendo macrófagos y otras células B. La presentación del antígeno depende en parte de las proteínas específicas, llamadas proteínas de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), sobre la superficie de las células que se presentan. Por tanto, para estimular la inmunidad mediada por células, los péptidos externos deben presentarse a las células T en combinación con péptidos MHC y esta combinación debe reconocerse por un receptor de célula T.

Existen dos subconjuntos significativos de células T: linfocitos T citotóxicos (células T_c o CTLs) y células T auxiliares (T_H) que pueden identificarse aproximadamente en base a la expresión de superficie celular del marcador CD8 y CD4. Las células T_c son importantes en la defensa viral y pueden destruir virus directamente reconociendo ciertos péptidos virales expresados de superficie celular. Las células T_H promueven la proliferación, maduración y función inmunológica de otros tipos celulares, e.g., la secreción de linfosina para controlar las actividades de las células B, los macrófagos y las células T citotóxicas. Los linfocitos T tanto vírgenes como de memoria permanecen ordinariamente en el estado de reposo y en este estado no exhiben una actividad auxiliar o citotóxica significativa. Cuando se activan, estas células experimentan varias rondas de división mitótica para producir células hijas. Algunas de estas células hijas regresan al estado de reposo como las células de memoria, pero otras se convierten en células efectoras que expresan activamente la actividad auxiliar o citotóxica. Estas células hijas se asemejan a sus progenitoras: las células CD4+ solamente pueden producir progenie CD4+, mientras que las células CD8+ producen solamente progenie CD8+. Las células T efectoras expresan

marcadores de superficie celular que no están expresados en las células T en reposo, tales como CD25, CD28, CD29, CD40L, receptores de transferencia y proteínas MHC clase II. Cuando se retiran los estímulos de activación, la actividad citotóxica o auxiliar disminuye gradualmente durante un período de varios días a medida que las células efectoras ya sea mueren o se revierten al estado en reposo.

Similar a la activación de célula B, las respuestas del linfocito T a la mayoría de los antígenos requieren también dos tipos de estímulos simultáneos. El primero es el antígeno que, si se despliega apropiadamente por medio de proteínas MHC en una célula que presenta el antígeno, puede reconocerse y enlazarse por medio de los receptores de célula T. Aunque este complejo de antígeno-MHC envía una señal al interior de la célula, éste es comúnmente insuficiente para dar como resultado la activación de la célula T. la activación total, tal como la que se presenta con las células T auxiliares, requiere la co-estimulación con otros ligandos específicos llamados co-estimuladores que están expresados en la superficie de la célula que presenta el antígeno. La activación de una célula T citotóxica, por otra parte, requiere generalmente IL-2, una citosina secretada por células T auxiliares activadas.

C. La Respuesta Inmune

Las tres propiedades funcionales primarias del sistema inmune de mamífero que lo distinguen de las otras defensas del cuerpo incluyen: (1) *especificidad* – la capacidad para reconocer y responder o no responder individualmente entre un vasto número de moléculas objetivo, (2) *discriminación* – la capacidad para determinar autónomo de no autónomo fin de coexistir pacíficamente con todas las innumerables proteínas y otro material orgánico, y aún responder vigorosamente contra material externo introducido al cuerpo, y (3) *memoria* - la capacidad para moldearse por experiencia de tal manera que los encuentros subsecuentes con un patógeno externo particular provocarán una respuesta más rápida y vigorosa que la presentada en el encuentro inicial. Cuando una o más de estas funciones se frustran, da como resultado una condición patológica.

Continuamente se liberan linfocitos vírgenes desde los órganos linfoides primarios hacia la periferia, transportando cada uno receptores de superficie que permiten el enlace al antígeno. El enlace al antígeno en las células B es mediado a través de inmunoglobulinas enlazadas a la superficie, mientras que en las células T es mediado por receptores de célula T. Cuando se activan

los linfocitos vírgenes, éstos proliferan produciendo células hijas que después pueden experimentar ciclos de activación y proliferación adicionales. La velocidad y la intensidad de respuesta de un antígeno dado se determina en gran medida por la selección clonal: entre más grande sea la población de células hijas o de clones específicos para un antígeno particular, es mayor el número de células que pueden reconocer y participar en la respuesta inmune. Cada respuesta inmune es una compleja e intrincadamente regulada secuencia de eventos que involucran varios tipos de células. Ésta se activa cuando un inmunógeno se introduce al cuerpo y encuentra una clase de células especializadas llamadas células que presentan el antígeno (APCs). Estas APCs capturan una pequeña cantidad del inmunógeno y lo despliegan en una forma que puede reconocerse por los linfocitos T auxiliares específicos del antígeno. Las células T auxiliares se activan entonces y, a su vez, promueven la activación de otras clases de linfocitos, tales como las células B o las células T citotóxicas. Los linfocitos activados proliferan entonces y llevan a cabo funciones efectoras específicas. En cada etapa en este proceso, los linfocitos y APCs se comunican uno con el otro a través de contacto directo o secretando citosinas reguladoras.

Los antígenos exógenos que se capturan por una APC experimentan una serie de alteraciones llamadas procesamiento del antígeno. Tal procesamiento, especialmente de los inmunógenos proteináceos implica la desnaturalización y digestiones proteolíticas parciales, de manera que el inmunógeno se divide en péptidos cortos. Un número limitado de los péptidos resultantes se asocian entonces de manera no covalente con proteínas MHC clase II y se transportan a la superficie de la APC, un proceso conocido como presentación del antígeno. Un linfocito T auxiliar CD4+ que se pone en contacto con una APC puede activarse, pero lo hará solamente si expresa una proteína receptora de célula T que pueda reconocer y enlazarse al complejo particular de péptido-MHC presentado por la APC.

Las células T auxiliares (T_H) son los orquestadores principales de la respuesta inmune debido a que son necesarias para la activación de las otras dos células efectoras linfáticas: células T citotóxicas (Tc) y células de plasma que secretan anticuerpo. La activación de T_H se presenta tempranamente en una respuesta inmune y requiere al menos dos señales. Una señal se proporciona enlazando el receptor de antígeno de célula T al complejo antigénico de péptido-MHC en la superficie de la APC que se transmite a través del complejo de proteína CD3, mientras que la segunda señal co-estimuladora a través de la APC, se cree

que resulta del enlace de una proteína separada que transmite la señal sobre la superficie de la célula T con un ligando específico en la APC. Una interacción tal conocida es la CD28 de proteína de célula T y la de la familia de proteínas de superficie de APC conocida como B7. Otros pares de proteínas de superficie también pueden mediar la co-estimulación. El proceso de co-estimulación se describe en mayor detalle subsecuentemente. Se cree que los anticuerpos anti-PD-L1 de la presente invención mejoran la co-estimulación a través del antagonismo de una señal co-estimuladora negativa proporcionada por la señalización a través de PD-L1.

Juntas, las dos señales inducen a la célula T auxiliar a comenzar a secretar la citosina interleucina-2 (IL-2) y también a comenzar a expresar receptores IL-2 de alta afinidad específicos en su superficie. IL-2 es un factor mitogénico altamente potente para los linfocitos T y es esencial para la respuesta proliferativa de las células T activadas. El efecto de IL-2 en la célula de la cual se secreta es un fenómeno conocido como efecto autócrino. Además se ha demostrado que incluso si una célula T ha recibido ambas señales, no proliferará si sus propios receptores IL-2 de superficie están bloqueados. IL-2 también puede actuar en las células en cercanía inmediata, en un llamado efecto parácrino. Este efecto es especialmente importante para activar las células Tc, que generalmente no producen IL-2 suficiente para estimular su propia proliferación. Además de IL-2, las células T_H activadas secretan otras citosinas y promueven el crecimiento, la diferenciación y las funciones de células B, macrófagos y otros tipos de células.

El contacto entre una APC y una célula T_H específica para antígeno también tiene efectos en la APC – de los cuales uno de los más importantes es la liberación de IL-1. Se cree que esta citosina actúa de una manera autócrina para incrementar la expresión de superficie de las proteínas MHC de clase II y de varias moléculas de adhesión reforzando así el enlace de la célula T_H y mejorando la presentación del antígeno. Al mismo tiempo, IL-1 funciona de manera parácrina en la célula T_H para promover la secreción de IL-2 y la expresión del receptor de IL-2.

Durante la activación de las células T_H de la manera previamente descrita, algunas célula B también pueden haberse acoplado al inmunógeno a través de sus receptores de antígeno, que son formas enlazadas a membrana de los anticuerpos que más tarde secretarán. A diferencia de las células T, las células B reconocen un inmunógeno en su forma libre no procesada. El enlace al antígeno específico proporciona un tipo de señal que puede conducir a la

activación de la célula B. Un segundo tipo se proporciona por las células T_H activadas, que expresan proteínas que ayudan a activar la célula B mediante el enlace a receptores no inmunoglobulina en su superficie. Estas señales derivadas de T_H, que actúan en cualquier célula B sin importar su especificidad al antígeno, se conocen como factores auxiliares. Estos factores auxiliares incluyen IL-2, IL-4 e IL-6. Sin embargo, la ayuda se logra más eficientemente a través del contacto de célula a célula, que permite que las proteínas en la superficie de la célula T se pongan directamente en contacto con aquellas en la célula B. La forma de ayuda mediada por contacto más efectiva se presenta cuando una proteína llamada ligando CD40 (CD40L), que se expresa en células T_H solamente después de que éstas se activan, se enlaza a una proteína llamada CD40 en células B. En un proceso conocido como activación por colocación, el contacto con una célula B activada puede ser incluso suficiente para activar las células B en reposo aunque sus inmunoglobulinas de superficie no se hayan acoplado en el antígeno.

Los linfocitos T_c funcionan para erradicar las células que expresan antígenos externos en sus superficies, tales como células huésped infectados por virus. La mayoría de las células T_c expresan CD8 más que CD4 y por tanto reconocen antígenos en asociación con proteínas MHC clase I más que clase II. Cuando una célula somática se infecta por un virus, algunas proteínas virales inmunogénicas pueden experimentar el procesamiento dentro de la célula y los péptidos resultantes pueden aparecer entonces como complejos de superficie con moléculas MHC clase I. Estos complejos de péptido-MHC pueden reconocerse entonces por el receptor de células T de un clon específico del antígeno, proporcionando una de las dos señales necesarias para la activación de la célula T_c. Esta primera señal sola induce receptores IL-2 de alta afinidad en la célula T_c. La segunda señal se forma por el IL-2 secretado de un linfocito T_H activado cercano. Al recibir ambas señales, la célula T_c activada adquiere actividad citotóxica, que le permite destruir la célula a la cual está enlazada, así como muchas otras células que contienen los mismos complejos clase I de péptido-MHC. En algunos casos, la destrucción se presenta debido a que la T_c libera toxinas específicas sobre la célula objetivo; en otros, la T_c induce a la célula objetivo a cometer suicidio mediante apoptosis. La célula T_c activada también prolifera, dando lugar a células T_c adicionales con la misma especificidad al antígeno.

D. Co-estimulación por medio de la Superfamilia de Inmunoglobulina:

1. B7.1/B7.2 – CD28/CTLA-4

Tal vez la trayectoria co-estimuladora de células T mejor caracterizada es aquella que se señala a través de B7.1(CD80)/B7.2(CD86) – CD28/CTLA-4(CD152). Esta trayectoria de señalización es crítica para la activación y la tolerancia de las células T. Karandikar et al., J. Neuroimmunol., 89:10-18 (1998); Oosterwegal et al., Curr. Opin. Immunol., 11:294-300 (1999); Salomon et al., Annu. Rev. Immunol., 19:225-252 (2001); Sansom, D.M. Immunol., 101:169-177 (2000); Chambers et al., Annu. Rev. Immunol., 19:565-592 (2001).

B7.1 [Freeman et al., J. Exp. Med., 174:625-631 (1991); Freeman et al., J. Immunol. 137:3260-3267 (1987); Yokochi et al., J. Immunol. 128:823-827 (1982)] y B7.2 [Freeman et al., Science 262:909-911 (1993); Freeman et al., J. Exp. Med., 178:2185-2192 (1993); Azuma et al., Nature 366: 76.79 (1993)] tienen especificidad doble para los dos receptores estimuladores CD28 y CTLA-4. Aruffo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 84:8573-8577 (1987); Gross et al., J. Immunol., 144:3201-3210 (1990). CD28 se expresa constitutivamente en la superficie de las células T [Gross et al., J. Immunol., 149:380-388 (1992)], mientras que CTLA-4, el receptor con más alta afinidad, tiene una expresión que se sobre-regula rápidamente después de la activación de la célula T. Peach et al., J. Exp. Med., 180:2049-2058 (1994); Linsley et al., J. Exp. Med., 176:1595-1604 (1992); Kinsley et al., Immunity 1: 793-801 (1994); Linsley et al., Immunity 4:535-543 (1996). La mayoría de las poblaciones de APC expresan B7.2 constitutivamente a bajos niveles, el cual se sobre-regula rápidamente, mientras que B7.1 se expresa de manera inducible más tarde después de la activación. Freeman et al., Science 262:909-911 (1993); Hathcock et al., J. Exp. Med. 180:631-640 (1994). La expresión previa de B7.2 y los datos en ratón knock-out sugieren que B7.2 es la molécula co-estimuladora más importante para iniciar las respuestas inmunes, pero de otra manera, las dos moléculas tienen funciones extensamente traslapadas. McAdam et al., Immuno. Rev. 165:631-640 (1994).

CD28 interactúa con B7.1 y B7.2 para transmitir una señal que se sinergiza con la señal TCR para promover la activación de células T. Lenschow et al., Annu. Rev. Immunol., 165:233-258 (1996); Lanzavecchia et al., Cell 96:1-4 (1999). En ausencia de una señal TCR, la señalización de CD28 no tiene significación fisiológica. La señalización de CD28 regula el umbral para la activación de células T y disminuye significativamente el número de acoplamientos de TCR necesario para la activación de células T. Viola et al., Science 273:104-106 (1996). La activación de CD28 sostiene las respuestas de las células T promoviendo la supervivencia de las células T, permitiendo así que las citosinas

inicien la expansión y la diferenciación clonal de las células T. Thompson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 86:1333-1337 (1989); Lucas et al., J. Immunol., 154:5757-5768 (1995); Shahinian et al., Science 261: 609-612 (1993); Sperling et al., J. Immunol., 157: 3909-3917 (1996); Boise et al., Immunity 3: 87-98 (1995). CD28 también optimiza las respuestas de las células T previamente activadas, promoviendo la producción de interleucina 2 (IL-2) y la supervivencia de las células T. aunque algunas respuestas son independientes de CD28, aún no es claro si esta independencia de co-estimulación resulta de fuertes estímulos antigénicos o es el resultado de la dependencia de otras trayectorias co-estimuladoras desconocidas.

La activación de CTLA-4 ocasiona una señal negativa que inhibe la transducción de señal mediada por TCR y CD28. El acoplamiento de CTLA-4 da como resultado la inhibición de la síntesis de IL-2 y el progreso a través del ciclo celular y la terminación de las respuestas de las células T. Walunas et al., Immunity 1: 405-413 (1994); Walunas et al., J. Exp. Med., 183: 2541-2550 (1996); Krummel et al., J. Exp. Med., 182: 459-466 (1995); Brunner et al., J. Immunol., 162:5813-5820 (1999); Greenwald et al., Immunity 14: 145-155 (2001). CTLA-4 juega un importante papel en la regulación de las respuestas de células T, incluyendo tolerancia de células T periféricas. Aunque no es claro cómo se coordina la señalización a través de CTLA-4 y CD28, algunas posibilidades incluyen hacer competir el CD28 por el enlace a B7, mediante la inducción de citosinas inmunosupresoras, antagonismo directo de la señalización de CD28 y/o de la señalización mediada por TCR.

Como resultado, el antagonismo de CTLA-4 (e.g., anticuerpos anti-CTLA antagonistas) y o la agonismo de B7.1/B7.2/CD28 pueden ser útiles para mejorar la respuesta inmune en el tratamiento de infección (e.g., aguda y crónica) e inmunidad tumoral.

2. Señalización de ICOS/ICOSL:

Otra trayectoria de interacción entre las APCs y las células T se presenta a través de ICOS (CD278) e ICOSL (B7-H2, CD275). La señalización de ICOS/ICOSL promueve la diferenciación y la función efectora de la célula T auxiliar y es particularmente importante para la producción de interleucina-10 (IL-10), pero juega un papel más modesto en la regulación de la expansión de las células T y en la producción de IL-2 incluyendo células T reguladoras, tolerancia y autoinmunidad de la célula T.

En contraste con CD28, ICOS no se expresa constitutivamente en

células T no tratadas, sino que se induce rápidamente en las células T después del acoplamiento de TCR. Hutloff et al., Nature 397:263-266 (1999); Yoshinaga et al., Nature 402:827-832 (1999); Beier et al., Eur. J. Immunol., 30: 3707-3717 (2000); Coyle et al., Immunity 13: 95-105 (2000); Mages et al., Eur. J. Immunol., 30: 1040-1047 (2000); McAdam et al., J. Immunol. 165: 5035-5040 (2000). Esto sugiere que ICOS proporciona una señal co-estimuladora a las células T activadas. Aunque la co-estimulación mediante CD28 mejora la expresión de ICOS, y la expresión de ICOS se reduce en ausencia de B7.1 y B7.2, ICOS no es totalmente dependiente de las señales de CD28. McAdam et al., J. Immunol., 165: 5035-5040 (2000); Aicher et al., J. Immunol., 164: 4689-4696 (2000); Kopf et al., J. Exp. Med. 192: 53-61 (2000). ICOS se sobre-regula en células T auxiliares tanto tipo 1 como 2 (T_H1 y T_H2) durante la fase inicial de diferenciación, pero los niveles permanecen altos en células T_H2 y disminuyen en células T_H1. El patrón de expresión de ICOS en células T en los centros terminales, (Beier et al., Eur. J. Immunol., 30: 3707-3717 (2000); Mages et al., Eur. J. Immunol., 30: 1040-1047 (2000)), indica un papel para ICOS en la ayuda de las células T para las células B. Estudios funcionales han confirmado esto e incluso la expresión de ICOS se ha confirmado en células B de rata, aunque no en otras especies. Tezuka et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 276:335-345 (2000); McAdam et al., Nature 409; 102-105 (2001); Dong et al., Nature 409: 97-101 (2001); Dong et al., J. Immunol., 166: 3659-3662 (2001); Tafuri et al., Nature 409: 105-109 (2001).

Un papel de la señalización de ICOS/ICOSL parece ser el de regular la producción de citosina (e.g., IL-4, IL-3) mediante células T recientemente activadas así como efectoras. Hutloff et al., Nature 397: 263-266 (1999); Coyle et al., Immunity 13: 95-105 (2000); Dong et al., Nature 409: 97-101 (2001). En estudios de enfermedad aérea alérgica, la función efectora de T_H2, pero no la diferenciación de T_H2, se proporciona mediante el bloqueo de ICOS. Tesciuba et al., J. Immunol., 167: 1996-2003 (2001). Indicando que ICOS también puede regular la función efectora de T_H1, la producción de citosinas tanto T_H1 como T_H2 puede suprimirse mediante la proteína de fusión ICOS-Ig a la reactivación in vitro. Kopf et al., J. Exp. Med., 192: 53-61 (2000).

Otro papel potencial para ICOS se refiere a sostener las respuestas de T_H1. En un modelo experimental de encefalomielitis autoinmune (EAE) para esclerosis múltiple, una enfermedad de T_H1 mediada por células T CD4+ específicas de mielina, muestra que el resultado del bloqueo de ICOS podría ser distinto cuando la co-estimulación se bloquea durante la preparación de las células

T, después durante la fase efectora de EAE. Dong et al., Nature 409: 97-101 (2001); Rottman et al., Nature Immunol., 2: 605-611 (2001); Sporici et al., Clin. Immunol., 100: 277-288 (2001). La EAE inducida por la glicoproteína de oligodendrocito de mielina (MOG) se exacerba en gran medida en ratones knock-out $ICOS^{-1-}$, con incrementada producción de IFN-γ en comparación con el tipo silvestre. De manera similar, el bloqueo de ICOS durante la inducción de EAE, exacerbó la enfermedad dando también como resultado una producción incrementada de IFN-γ. En consecuencia, el bloqueo de ICOS durante la preparación conduce a una polarización de la respuesta de T_H1. De manera interesante, la preparación de células T transgénicas TCR específicas de mielina in vitro en presencia de ICOS-Ig inhibió su capacidad para inducir EAE, en violento contraste con los resultados del bloqueo de ICOS-Ig observado in vivo. Sporici et al., supra. La diferencia de los resultados opuestos in vitro e in vivo no es clara, pero podría reflejar un papel de ICOS en las células T reguladoras que producen IL-10, así como en las células T efectoras durante el bloqueo de ICOS in vivo. La co-estimulación a través de IL-10 es muy efectiva en el mejoramiento de la producción de IL-10 y es más efectiva que la co-estimulación a través de CD28. Hutloff et al., supra. El circuito regulatorio de IL-10, IL-12 es crítico en la regulación de EAE debido a que los ratones IL-10 -/-, pero no los IL-4 -/- desarrollan EAE exacerbada. Segal et al., J. Exp. Med., 187: 537-546 (1998).

Aún otro papel potencial para ICOS es el mejoramiento de las respuestas humorales de las células B dependientes de células T. los ratones $ICOS^{-/-}$ e $ICOSL^{-/-}$ han demostrado que ICOS se requiere para las respuestas de células B dependientes de células T. Hutloff et al., Nature 397: 263-66 (1999); Chapoval et al., Nat. Immunol., 2:269-74 (2001); Coyle et al., Immunity 13: 95-105 (2000); MaAdam et al., Nature 409: 102-5 (2001); Tafuri et al., Nature 409: 105-9 (2001); Suh et al., Nat. Immunol., 4: 899-906 (2003). Los ratones $ICOS^{-/-}$ también muestran centros germinales reducidos en respuesta a la inmunización primaria, profundos defectos en la formación del centro germinal en respuesta al desafío secundario y defectos en el intercambio de clase IgG. El papel de ICOS en la interacción de las células T:B se validó además por la identificación de la pérdida homózigua de ICOS en células T en pacientes con enfermedad de inmunodeficiencia variable común de inicio adulto. Grimbacher et al., Nat. Immunol., 4: 261-68 (2003).

Como resultado, el agonismo de ICOS/ICOSL (e.g., anticuerpos anti-ICOS agonistas, ligando soluble de ICOS/ICOSL) puede ser útil para mejorar la

respuesta inmune en el tratamiento de infección (e.g., aguda y crónica) y/o inmunidad tumoral.

3. Trayectoria PD-1:

Una importante activación de células T reguladora de la señal co-estimuladora negativa se proporciona por el receptor 1 de muerte programada (PD-1) (CD279) y sus socios de enlace de ligando PD-L1 (B7-H1, CD274) y PD-L2 (B7-DC, CD273). El papel regulador negativo de PD-1 se reveló por los knock-out PD-1 (*Pdcd1*$^{-/-}$) que están propensos a la autoinmunidad. Nishimura et al., Immunity 11: 141-51 (1999); Nishimura et al., Science 291: 319-22 (2001). PD-1 está relacionado con CD28 y CTLA-4, pero carece de la cisteína proximal de membrana que permite la homodimerización. El dominio citoplásmico de PD-1 contiene un motivo de inhibición en base al inmunorreceptor tirosina (ITIM, V/IxYxxL/V). PD-1 se enlaza solamente a PD-L1 y a PD-L2. Freeman et al., J. Exp. Med., 192: 1-9 (2000); Dong et al., Nature Med. 5: 1365-1369 (1999); Latchman et al., Nature Immunol., 2: 261-268 (2001); Tseng et al., J. Exp. Med., 193: 839-846 (2001).

PD-1 puede expresarse en células T, células B, células T destructoras naturales, monocitos activados y células dendríticas (DCs). PD-1 se expresa mediante células T CD4+ y CD8+, células B y células mieloides humanas activadas, pero no por las no estimuladas. Esto se toma en contraste con la expresión más restringida de CD28 y CTLA-4. Nishimura et al., Int. Immunol., 8:773-80 (1996); Boettlet et al., J. Virol. 80: 3532-40 (2006). Existen al menos 4 variantes de PD-1 que se han clonado a partir de células T humanas activadas, incluyendo transcripciones que carecen de (i) exón 2, (ii) exón 3, (iii) exones 2 y 3 o (iv) exones 2 a 4. Nielsen et al., Cell. Immunol., 235: 109-16 (2005). Con la excepción de PD-1Δex3, todas las variantes se expresan en niveles similares como PD-1 de longitud total en células mononucleares de sangre periférica en reposo (PBMCs). La expresión de todas las variantes se induce significativamente a la activación de las células T humanas con anti-CD3 y anti-CD28. La variante PD-1Δex3 carece de un dominio transmembrana y se asemeja al CTLA-4 soluble, que juega un importante papel en la autoinmunidad. Ueda et al., Nature 432: 506-11 (2003). Esta variante está enriquecida en el fluido sinovial y en suero de pacientes con artritis reumatoide. Wan et al., J. Immunol., 177: 8844-50 (2006).

Los dos ligandos PD-1 difieren en sus patrones de expresión. PD-L1 se expresa constitutivamente en células T y B de ratón, CDs, macrófagos, células precursoras mesenquimales y mastocitos derivados de médula ósea. Yamazaki et

al., J. Immunol., 169: 5538-45 (2002). PD-L1 se expresa en un amplio rango de células no hematopoyéticas (e.g., de córnea, pulmón, epitelio vascular, células hepáticas no parenquimales, células precursoras mesenquimales, isletas pancreáticas, sinctiotrofoblastos de placenta, queratinocitos, etc.) [Keir et al., Annu. Rev. Immunol., 26: 677-704 (2008)], y está sobre-regulado en un número de tipos celulares después de la activación. Los interferones tanto tipo I como tipo II (IFNs) sobre-regulan PD-L1, Eppihimer et al., Microcirculation 9: 133-45 (2002); Schreiner et al., J. Neuroimmunol., 155: 172-82 (2004). La expresión de PD-L1 en líneas celulares disminuye cuando se inhibe MyD88, TRAF6 y MEK. Liu et al., Blood 110: 296-304 (2007). También se ha implicado a JAK2 en la inducción de PD-L1. Lee et al., FEBS Lett., 580: 755-62 (2006); Liu et al., Blood 110: 296-304 (2007). La pérdida de inhibición del homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), una fosfatasa celular que modificó la señalización de fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y Akt, incrementó la expresión de PD-L1 post-transcripcional en cánceres. Parsa et al., Nat. Med. 13: 84-88 (2007).

La expresión de PD-L2 está más restringida que la de PD-L1. PD-L2 se expresa de manera inducible en DCs, macrófagos, y mastocitos derivados de médula ósea. PD-L2 también se expresa en aproximadamente de la mitad a dos tercios de las células B1 peritoneales en reposo, pero no en células B B2 convencionales. Zhong et al., Eur. J. Immunol., 37: 2405-10 (2007). Las células B1 PD-L2+ se enlazan a fosfatidilcolina y pueden ser importantes para las respuestas inmunes innatas contra antígenos bacterianos. La inducción de PD-L2 mediante IFN-γ depende parcialmente de NF-κB. Liang et al., Eur. J. Immunol., 33: 2706-16 (2003). PD-L2 también puede inducirse en monocitos y macrófagos mediante GM-CF, IL-4 e IFN-γ. Yamazaki et al., J. Immunol., 169:5538-45 (2002); Loke et al., PNAS 100:5336-41 (2003).

La señalización de PD-1 tiene típicamente un mayor efecto en la producción de citosina que en la proliferación celular, con efectos significativos en la producción de IFN-γ, TNF-α e IL-2. La señalización inhibidora mediada por PD-1 también depende de la intensidad de la señalización de TCR, con mayor inhibición suministrada a bajos niveles de estimulación TCR. Esta reducción puede superarse mediante la co-estimulación a través de CD28 [Freeman et al., J. Exp. Med. 192: 1027-34 (2000)] o mediante la presencia de IL-2 [Carter et al., Eur. J. Immunol., 32: 634-43 (2002)].

Se coloca la evidencia de que la señalización a través de PD-L1 y PD-L2 puede ser bidireccional. Es decir, además de modificar la señalización de

TCR o BCR, la señalización también puede suministrarse de nuevo hacia las células que expresan PD-L1 y PD-L2. Aunque no se encontró que el tratamiento de las células dendríticas con un anticuerpo anti-PD-L2 naturalmente humano aislado de un paciente con macroglobulinemia de Waldenstrom sub-regulara las moléculas co-estimuladoras MHC II o B7, tales células produjeron mayor cantidad de citosinas pro-inflamatorias, particularmente TNF-α e IL-6, y estimularon la proliferación de células T. Nguyen et al., J. Exp. Med. 196: 1393-98 (2002). El tratamiento de ratones con este anticuerpo también (1) mejoró la resistencia al melanoma b16 trasplantado e indujo rápidamente CTL específico del tumor (Radhakrishnan et al., J. Immunol., 170:1830-38 (2003); Radhakrishnan et al., Cancer Res. 64: 4965-72 (2004); Heckman et al., Eur. J. Immunol., 37: 1827-35 (2007)); (2) bloqueó el desarrollo de la enfermedad inflamatoria aérea en un modelo de ratón de asma alérgica. Radhakrishnan et al., J. Immunol., 173: 1360-65 (2004); Radhakrishnan et al., J. Allergy Clin. Immunol., 116: 668-74 (2005).

Evidencia adicional de la señalización inversa en células dendríticas ("DCs") resulta de estudios e DCs derivadas de médula ósea cultivadas con PD-1 soluble (dominio EC de PD-1 fusionado a la región constante de Ig – "s-PD-1"). Kuipers et al., Eur. J. Immunol., 36: 2472-82 (2006). Este s-PD-1 inhibió la activación de la DC e incrementó la producción de IL-10, de una manera reversible a través de la administración de anti-PD-1.

Adicionalmente, varios estudios muestran un receptor para PD-L1 y PD-L2 que es independiente de PD-1. B7.1 también se ha identificado como un socio de enlace para PD-L1. Butte et al., Immunity 27: 111-22 (2007). Estudios de reticulación química sugieren que PD-L1 y B7.1 pueden interactuar a través de sus dominios similares a IgV. Las interacciones de B7.1:Pd-L1 pueden inducir una señal inhibidora hacia las células T. la ligación de PD-L1 en células T CD4+ mediante B7.1, o la ligación de B7.1 en células T CD4+ mediante PD-L1 suministra una señal inhibidora. Las células T que carecen de CD28 y CTLA-4 muestran una proliferación y producción de citosina disminuidas cuando se estimulan mediante gránulos recubiertos con anti-CD3 más B7.1. En células T que carecen de todos los receptores para B7.1 (i.e., CD28, CTLA-4 y PD-L1), la proliferación de células T y la producción de citosina ya no se inhibieron por medio de gránulos recubiertos con anti-CD3 más B7.1. Esto indica que B7.1 actúa específicamente a través de PD-L1 en la célula T en ausencia de CD28 y CTLA-4. De manera similar, las células T que carecen de PD-1 mostraron una proliferación y una producción de citosina disminuidas cuando se estimularon en presencia de

gránulos recubiertos con anti-CD3 más PD-L1, demostrando el efecto inhibidor de la ligación de PD-L1 en B7.1 en células T. Cuando las células T carecieron de todos los receptores conocidos para PD-L1 (i.e., sin PD-1 ni B7.1), la proliferación de células T ya no se dañó por los gránulos recubiertos con anti-CD3 más PD-L1. Por tanto, PD-L1 puede ejercer un efecto inhibidor en las células T ya sea a través de B7.1 o de PD-1.

La interacción directa entre B7.1 y PD-L1 sugiere que lo que se entiende actualmente como co-estimulación es incompleto y sub-valúa la significancia de la expresión de estas moléculas en células T. Los estudios de células T PD-L1$^{-/-}$ indican que el PD-L1 en células T puede sub-regular la producción de citosina de células T. Latchman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 101: 10691-96 (2004). Debido a que tanto PD-L1 como B7.1 se expresan en células T, células B, CDs y macrófagos, existe el potencial para interacciones direccionales entre B7.1 y PD.L1 en estos tipos de células. Adicionalmente, el PD-L1 en células no hematopoyéticas puede interactuar con B7.1 así como el PD-1 en células T, haciendo surgir la pregunta de si PD-L1 está implicado en su regulación. Una explicación posible para el efecto inhibidor de la interacción de B7.1:PD-L1 es que el PD-L1 de las células T puede atrapar o segregar APC B7.1 de la interacción con CD28.

Como resultado, es probable que el antagonismo de la señalización a través de PD-L1, incluyendo el bloqueo de PD-L1 de la interacción ya sea con PD-1, B7.1 o ambos, evitando así que el PD-L1 envíe una señal co-estimuladora negativa a las células T y a otras células que presentan el antígeno, mejore la inmunidad en respuesta a la infección (e.g., aguda y crónica) y a la inmunidad tumoral. Además, los anticuerpos anti-PD-L1 de la presente invención pueden combinarse con antagonistas de otros componentes de la señalización de PD-1:PD-L1, por ejemplo, anti-PD-1 antagonista y anticuerpos anti-PD-L2.

4. B7-H3

Las señales co-estimuladoras también se proporcionan a través de B7-H3 (B7RP-2, CD276, PRO352), que se expresa ampliamente en tejidos linfoides y no linfoides. Chapoval et al., Nat. Immunol. 2: 269-74 (2001). En humanos, B7-H3 tiene una variante tanto 41g como una 21g, predominando la forma 41g, mientras que la variante 21g predomina en el ratón. Sun et al., J. Immunol. 168: 6294-97 (2002); Steinberger et al., J. Immunol. 172: 2352-59 (2004); Ling et al., Genomics 82: 365-77 (2003).

Estudios recientes han demostrado que B7-H3 es tanto un

estimulador como un inhibidor de las respuestas de la célula T. la evidencia de activación estimuladora se proporciona por lo siguiente: (1) En combinación con anti-CD3, las fusiones B7-H3/Ig co-estimularon la proliferación de células T CD4+ y Cd8+ y estimularon la actividad lítica de IFN-γ y CD8. Chapoval et al., Nat. Immunol., 2: 269-74 (2001); y (2) La inyección del plásmido de expresión B7-H3 en tumores de un modelo de linfoma EL-4 dio como resultado una regresión completa del 50% de los tumores, que fue dependiente de las células CD8+ y las células NK. Sin embargo, varios estudios recientes han mostrado un papel inhibidor para esta molécula. Los knock-out de APC B7-H3$^{-/-}$ muestran un incremento de dos veces en la proliferación alorreactiva de células T en una respuesta MLR. La activación de las células T CD4 mediante anti-CD3 y anti-CD28 se inhibió en HLA-DR2 transfectado con cualquier forma de B7-H3. Ling et al., Genomics 82: 365-77 (2003). El resultado fue proliferación y producción reducidas de IFN-γ, TNF-α, IL-10 y GM-CSF. La reconciliación de estos estudios podría basarse en la existencia de dos receptores para B7-H3 con funciones opuestas, similar a cómo el CD28 y CTLA-4 regulan la señalización a través de B7.1 y B7.2.

Como resultado, el bloqueo de la señalización de B7-H3 puede contribuir a mejorar la respuesta inmune a la infección y a la inmunidad tumoral cuando se combina con los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención.

5. B7-H4

La más reciente adición de la familia B7 es B7-H4 (B7x, B7-S1, B7-H5, VTCN1, PRO1291), que es un regulador negativo de las respuestas de células T. Zang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 100(18), 10388-10392 (2003); Watanabe et al., Nat. Immunol., 4(7), 670.679 (2003); Prasad et al., Immunity 18(6), 863-873 (2003); Sica et al., Immunity 18(6), 849-861 (2003). El B7-H4 tanto humano como de ratón se expresa ampliamente en órganos tanto linfoides (bazo y timo) como no linfoides (incluyendo pulmón, hígado, testis, ovario, placenta, músculo esquelético, páncreas e intestino delgado). El B7-H4 no se detecta en tejidos humanos normales mediante IHC o regulación de B7-H4 en el nivel translacional. La IHC muestra que el B7-H4 está altamente expresado en tumores de pulmón y ovario, y el análisis de reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real indica que el B7-H4 de ratón está también altamente expresado en línea celulares de carcinoma de próstata, pulmón y colon. El B7-H4 se enlaza a un receptor aún desconocido al activarse, pero no a células T no tratadas que son distintas a CTLA-4, ICOS, PD-1 y al receptor para B7-H3. Aunque BTLA se

reportó inicialmente como el ligando para B7-H4, el enlace reportado de las fusiones B7-H4/Ig a células de tipo silvestre, pero no $BTLA^{-/-}$ obliga a la conclusión de que HVEM, y no BTLA, es el único ligando para B7-H4. Sedy et al., Nat. Immunol., 6: 90-98 (2004).

Estudios con transfectantes B7-H4 y fusiones inmovilizadas de B7-H4/Ig demuestran que el B7-H4 suministra una señal que inhibe la proliferación de células T CD4+ y CD8+ mediada por TCR, progresión del ciclo celular en la fase G0/G1 y producción de IL-2. Sica et al., Immunity 18: 849-61 (2003); Zang et al., PNAS 100: 10388-92 (2003); Prasad et al., Immunity 18: 863-73 (2003). La co-estimulación de B7.1 no puede superar la inhibición inducida por B7-H4/Ig. El bloqueo del anticuerpo anti-B7-H4 incrementó la proliferación de células T y la producción de IL-2 in vitro. La administración in vivo del anticuerpo anti-B7-H4 proporcionado con la administración de hemocianina de lapa keyhole (KLH) en adyuvante completo de Freund (CFA) condujo a un modesto incremento en la producción de IgM del anticuerpo anti-KLH y un incremento de dos a tres veces en la proliferación de células T y en la producción de IL-2 a la re-estimulación in vitro con KLH, sugiriendo una mayor preparación de células T in vivo en presencia de anti-B7-H4. El anticuerpo de bloqueo anti-B7-H4 aceleró marcadamente el inicio y la severidad de EAE en células T CD4+ y CD8+ incrementadas y macrófagos CD11b+ en el cerebro de un modelo de ratón autoinmune tratado con anti-B7-H4. Los datos experimentales combinados disponibles en B7-H4 sugieren que éste puede sub-regular las respuestas inmunes en tejidos periféricos y juegan un papel en la regulación de la tolerancia de las células T. la expresión de B7-H4 también puede jugar un papel en la evasión de las respuestas inmunes del huésped en la inmunidad tumoral. Choi et al., J. Immunol., 171: 4650-54 (2003). Como resultado, el antagonismo de B7-H4 puede ser útil para mejorar la respuesta inmune a la infección y a la inmunidad tumoral al combinarse con los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención.

6. BTLA:

El miembro de la familia B7 BTLA (CD272, BTLA-1) es funcionalmente similar a PD-1 y CTLA. Inicialmente identificado como un marcador selectivo para células Th1, el BTLA se expresa solamente en linfocitos. Similar al CTLA-4, ICOS y PD-1, el BTLA se induce en células T durante la activación. Sin embargo, en contraste con ICOS, que permanece elevado en las células Th2, pero está sub-regulado en células Th1, el BTLA permanece expresado en las células Th1, pero no en las células Th2. Similar al PD-1, el

BTLA también se expresa en células B. Gavrieli et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 312: 1236-43 (2003). Sin embargo, el BTLA se expresa en células tanto en reposo como activadas, mientras que PD-1 está sobre-regulado en células B activadas. El BTLA tiene dos motivos ITIM.

El BTLA ejerce efectos inhibidores en linfocitos tanto B como T. Watanabe et al., Nat. Immunol., 4: 670-79 (2003). Las células B de $BLTA^{-/-}$ muestran una modesta respuesta a anti-IgM, pero una respuesta incrementada a anti-CD3 in vitro. Las células Th1 de $BTLA^{-/-}$ polarizadas muestran aproximadamente un incremento de dos veces en la proliferación en respuesta a la exposición al antígeno, in vitro. In vivo, los ratones $BTLA^{-/-}$ muestran un incremento de tres veces en las respuestas al anticuerpo específicas del hapteno y una susceptibilidad mejorada a EAE. El fenotipo de ratones $BTLA^{-/-}$ se asemeja al fenotipo de ratones $PD\text{-}1^{-/-}$ que exhibe susceptibilidad incrementada a la autoinmunidad, pero fenotipos más sutiles que los ratones $CTLA\text{-}4^{-/-}$. Sin embargo, dado su papel como un regulador negativo, el bloqueo de BTLA puede probar ser útil para mejorar la respuesta inmune en la infección y en la inmunidad anti-tumor al combinarse con los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención.

De manera interesante, se ha demostrado recientemente que el miembro de la superfamilia de Ig BTLA también interactúa con el miembro HVEM de la familia de TNFR. Sedy et al., Nat. Immunol., 6: 90-98 (2005); Gonzalez et al., Proc. Natl. Acad. Sci., EUA 102: 1116-1121 (2005). El HVEM se revisa más adelante bajo Co-estimuladores de la Familia TNFR.

E. Co-estimuladores de la Familia TNFR

1. OX40/OX40L (CD134)

Los ratones deficientes en OX40 (CD134, TXPG1L, TNFRSF4) y OX40L, (CD134L, CD252, GP34, TNFSF4, TXGP1) tienen reducidas respuestas primarias de célula T CD4+ a antígenos de proteína tanto virales como comunes y en reacciones de sensibilidad de contacto. Chen et al., Immunity 11: 689-698 (1999); Kopf et al., Immunity 11: 699-708 (1999); Murata et al., J. Exp. Med. 191: 365-374 (2000); Gramaglia et al., J. Immunol., 165: 3043-3050 (2000). Se generan frecuencias más bajas de las células T efectoras específicas del antígeno posteriormente en la respuesta primaria y se desarrollan menos células T de memoria. Gramaglia et al., supra. En contraste con las células T deficientes en CD27, la proliferación temprana no se daña en poblaciones de células T CD4+ no tratadas que son deficientes en OX40. Sin embargo, la proliferación reducida y la marcada muerte celular apoptótica se presentan de 4 a 5 días después de la

activación, con el resultado de que pocas células T sobreviven a largo plazo. Rogers et al., Immunity 15: 445-455 (2001). Con las células T CD8+ deficientes en OX40, no se afecta la división celular inicial, pero la acumulación de células efectoras primarias se reduce marcadamente de 3 a 6 días después del encuentro con el antígeno. Croft et al., Nat. Immunol., 3: 609-620 (2003).

La expresión transgénica de OX40L por células dendríticas o células T incrementó el número de células T CD4+ que responden al antígeno y produce síntomas similares a la autoinmunidad que están asociados con la activación aberrante de células T. Brocker et al., Eur. J. Immunol., 29: 1610-1616 (1999); Murata et al., J. Immunol., 169: 4628-4636 (2002). Después de la inmunización, la inyección de anticuerpos anti-OX40 agonistas da como resultado la acumulación de un mayor número de células T CD4+ reactivas al antígeno en el pico de la respuesta primaria y un mejoramiento concomitante en el número de células T de memoria que se generan. Gramaglia et al., supra. Bansai-Pakala et al., Nature Med. 7: 907-912 (2001). Maxwell et al., J. Immunol., 164: 107-112 (2000=; Weatherill et al., Cell Immunol., 209: 63-75 (2001). La acumulación mejorada de CTLs efectoras primarias se presenta cuando se trata a los ratones preparados con antígeno con un anticuerpo agonista específico para OX40. De Smedt et al., J. Immunol., 168: 661-670 (2002).

Se cree que OX40 proporciona una señal de acción tardía que permite la supervivencia de células efectoras recién generadas en el pico de la respuesta inmune primaria. También existe buena evidencia de que OX40 funciona corriente abajo desde CD28 – además de la expresión incrementada de OX40 mediada por señales CD28, el análisis funcional de deficiencia de CD28 contra la deficiencia de OX40 ha demostrado que las respuestas tempranas primarias de las células T se dañan marcadamente en ausencia de señales CD28, pero las respuestas tardías se dañan solamente en ausencia de señales de OX40. Rogers et al., Immunity 15: 445-455 (2001); Bertram et al., J. Immunol., 168: 3777-3785 (2002).

Como resultado, es probable que la activación de OX40/OX40L, tal como a través de la aplicación de anticuerpos agonistas, pueda ser útil al combinarse con los anticuerpos anti-PD-1 de la invención para tratar trastornos disfuncionales de células T.

2. 4-1BB(CD137)/4-1BBL

Similar a OX40/OX40L, las células T que son deficientes en 4-1BB (CD137, TNFRSF9) y 4-1BBL (TNFSF9), muestran menos células T CD8+

reactivas al antígeno acumuladas en las respuestas primarias cuando 4-1BBL está ausente y se desarrollan menos células T de memoria. DeBenedette et al., J. Immunol., 163: 4833-4841 (1999); Tan et al., J. Immunol., 163: 4859-4868 (1999); Tan et al., J. Immunol., 164: 2320-2325 (2000). Además, el bloqueo de 4-1BBL no altera la respuesta proliferativa inicial de las células Y CD8+, sino que suprime la acumulación de CTLs efectoras en el pico de la respuesta primaria después de 3 a 6 días, debido a la apoptosis de las células que se han dividido varias veces. Cooper et al., Eur. J. Immunol., 32: 521-529 (2002). Los anticuerpos agonistas anti-4-1BB y las APCs anti-4-1BBL transfectadas también han producido resultados similares: las respuestas de células T CTL y CD4+ aumentan marcadamente in vivo. Melero et al., Nature Med., 3: 682-685 (1997); Melero et al., Eur. J. Immunol., 28: 1116-1121 (1998); Takahashi et al., J. Immunol., 162: 5037-5040 (1999); Guinn et al., J. Immunol., 162: 5003-5010 (1999); Halstead et al., Nature Immunol., 3: 536-541 (2002); Takahashi et al., Immunol. Lett., 76: 183-191 (2001); Bansal-Pakala et al., J. Immunol., 169: 5005-5009 (2002). El anticuerpo específico de 4-1BB no altera la respuesta proliferativa inicial, soportando las conclusiones de los experimentos de bloqueo de 4-1BBL y apuntando a la actividad tardía de 4-1BB para suministrar señales de supervivencia celular.

Como OX40, se cree que 4-1BB proporciona una señal de acción tardía que permite la supervivencia de células efectoras recién generadas en el pico de la respuesta inmune primaria. También existe buena evidencia de que 4-1BB funciona más tardíamente que CD28 – además de la expresión incrementada de OX40 y 4-1BB mediada por señales CD28, el análisis funcional de la deficiencia de CD28 contra la deficiencia de 4-1BB ha demostrado que las respuestas tempranas primarias de las células T se dañan marcadamente en ausencia de señales CD28, pero las respuestas tardías se dañan solamente en ausencia de señales OX40. Roger et al., Immunity 15: 445-455 (2001); Bertram et al., J. Immunol., 168: 3777-3785 (2002).

El anticuerpo agonista anti-CD137 puede inducir la regresión del tumor en cáncer en donde las CTLs CD8+ juegan un papel central. Melero et al., Nat. Med. 3: 682-5 (1997); Hirano et al., Cancer Res. 65(3): 1089-96 (2005). La expresión constitutiva e inducible de PD-L1 confiere resistencia en tales tumores, la cual es reversible al bloqueo de PD-L1. Hirano et al.

Como resultado, es probable que la activación e 4-1BB/4-1BBL, tal como a través de la aplicación de anticuerpos agonistas, particularmente en

combinación con antagonistas PD-L1 (e.g., anticuerpo anti-PD-L1) pueda ser útil para tratar trastornos disfuncionales de células T.

3. CD27/CD27L (CD70)

La importancia de la señalización de CD27 (TNFRSF7, S152) y CD27L (CD70, TNFSF7) en las etapas iniciales de una respuesta de célula T se ha demostrado en estudios de bloqueo in vitro, en donde se rompieron las interacciones de CD27/CD70. Oshima et al., Int. Immunol., 10: 517-526 (1998); Agematsu et al., J. Immunol., 153: 1421-1429 (1994); Hintzen et al., J. Immunol., 154: 2612-2623 (1995). Las células T que carecen de CD28 inicialmente se dividen normalmente, pero después proliferan escasamente 3 o más días después de la activación. Hendriks et al., Nature Immunol., 1: 433-440 (2000). Esto indica que CD27 participa en la promoción de la expansión inicial de la población de células T no tratadas, ya sea mediante la supresión temprana de la muerte de la célula T o actuando en el ciclo celular para permitir una división sostenida de 2 a 3 días después de la activación. Esto se refuerza por estudios in vivo de ratones deficientes en CD27, en los cuales se desarrollan números menores de respuestas específicas al antígeno (días 4 a 8) y menos células T de memoria durante 3 o más semanas. Hendriks et al., supra. La expresión de CD27 se sobre-regula tempranamente después de la activación de las células T, sugiriendo que ésta suministra principalmente señales que mantienen la proliferación temprana, antes del pico de la respuesta de efector.

Como resultado, es probable que la activación de CD27/CD27L, incluyendo a través de la aplicación de anticuerpos agonistas, particularmente en combinación con los anticuerpos anti-PD-L1 descritos en la presente, pueda ser útil para tratar trastornos disfuncionales de células T.

4. CD30/CD30L (CD153)

La señalización de CD30 (TNFRSF8, Ki-1) y CD30L (CD153, TNFSF8) es co-estimuladora para varias funciones de células T in vitro. Del Prete et al., J. Exp. Med., 182: 1655-1661 (1995), Bowen et al., J. Immunol., 156: 442-449 (1995). Los reactivos de bloqueo para CD30L suprimieron el desarrollo de células Th2 y mejoraron el desarrollo de células Th1 in vitro. Esta actividad concuerda con los datos que demuestran que CD30 se expresa preferencialmente por células Th2 y células Tc2 citotóxicas tipo 2. Del Prete et al., supra, Nakamura et al., J. Immunol., 158: 2090-2098 (1996). CD30 se expresa de 3 a 4 días después de la activación de células T no tratadas en respuestas primarias no polarizadas. Nakamura et al., supra, indicando que este papel no está restringido

a las respuestas dominadas por citosina tipo 2.

Aunque no son claros los mecanismos exactos de la señalización de CD30/CD30L, se ha sugerido que podrían ser similares a OX40 y 4-1BB. Cuando las células Y CD8+ específicas al antígeno transferidas de manera adoptiva se transfieren en ratones deficientes en CD30L, éstas no se acumulan en altos números en el pico de una respuesta primaria y se desarrollan menos células T de memoria. Como resultado, CD30 también podría proporcionar señales de proliferación y/o supervivencia para permitir la generación de altos números de células T específicas al antígeno en el pico de las respuestas primarias.

Como resultado, es probable que la activación de CD27/CD27L, incluyendo a través de la aplicación de anticuerpos agonistas, particularmente en combinación con los anticuerpos anti-PD-L1 descritos en la presente, pueda ser útil para tratar trastornos disfuncionales de células T.

5. HVEM/LIGHT

El efecto de HVEM (HVEA, ATAR, LIGHTR, TNFRSF14, PRO509) y LIGHT (CD258, HVEML, TR2, TNFSF14, PRO726) en la co-estimulación de las células T se complica por 1) la capacidad de LIGHT para enlazarse también al receptor de linfotoxina β (LTβR) y 2) de HVEM para enlazarse a Ltα3 soluble. Por tanto, cualquier estudio del efecto de HVEM/LIGHT también debe tomar en cuenta el efecto de otros socios de enlace para este sistema de señalización. El bloqueo de LIGHT puede inhibir la proliferación temprana de las células T y la secreción de citosina en reacciones alogénicas mezcladas de linfocito (MLRs). Tamada et al., J. Immunol., 164: 4105-4110 (2000), Kwon et al., J. Biol. Chem., 272: 14272-14276 (1997); Harrop et al., J. Immunol., 161: 1786-1794 (1998); Tamada et al., Nature Med., 6: 283-289 (2000). La producción de citosinas pro-inflamatorias se suprime cuando LIGHT se bloquea en aloinjertos de corazón no emparejados con MHC. Ye et al., J. Exp. Med., 195: 795-800 (2002). Además, los injertos de piel alogénicos se rechazan con cinética retardada en recipientes deficientes tanto en LIGHT como en CD28. Scheu et al., J. Exp. Med., 195: 1613-1624 (2002). La sugerencia del rechazo de injerto retrasado podría indicar una supresión temprana de la expansión clonal de las células T o de la producción de citosina. Esta conclusión se soporta por (i) estudios in vivo que demuestran que los esplenocitos deficientes en LIGHT que responden al aloantígeno tienen una producción reducida de citosinas tanto TH1 como TH2 y débil generación de actividad del linfocito T citotóxico (CTL) [Sheu et al., supra] y (ii) estudios in vivo que demuestran que el bloqueo de LOGHT reduce la generación de CTLs

alorreactivas. Tamada et al., Nature Med., 6: 283-289 (2000).

Como resultado, el HVEM/LIGHT, tal como a través de la aplicación de anticuerpos agonistas, particularmente en combinación con los anticuerpos anti-PD-L1 descritos en la presente, puede ser útil para tratar trastornos disfuncionales de células T.

II. Definiciones

Un "alérgeno" o "inmunógeno" es cualquier molécula que pueda activar una respuesta inmune. Como se utiliza en la presente, el término cubre ya sea la molécula antigénica en sí, o su fuente, tal como granos de polen, bilis de animal, veneno de insecto o producto alimenticio. Este se contrasta con el término antígeno, que se refiere a una molécula que puede reconocerse específicamente por un receptor de inmunoglobulina o de célula T. Cualquier sustancia externa capaz de inducir una respuesta inmune en un alérgeno potencial. Se sabe que muchos químicos diferentes de origen tanto natural como sintético son alergénicos. Es probable que complejos químicos orgánicos naturales, especialmente proteínas, ocasionen alergia mediada por anticuerpos, mientras que los compuestos orgánicos simples, los químicos inorgánicos y los metales, más preferentemente, ocasionan alergia mediada por células T. En algunos casos, el mismo alérgeno puede ser responsable de más de un tipo de alergia. La exposición al alérgeno puede ser a través de inhalación, inyección, o contacto con la piel.

"Disfunción" en el contexto de la disfunción inmune, se refiere a un estado de respuesta inmune reducida a la estimulación antigénica. El término incluye los elementos comunes de agotamiento y/o de anergia en los cuales puede presentarse el reconocimiento del antígeno, pero la respuesta inmune que sobreviene es inefectiva para controlar la infección o el crecimiento del tumor.

"Tolerancia" o "tolerancia inmunológica" es la falla del sistema inmune para instalar una respuesta inmune defensiva para un antígeno en particular. La tolerancia puede ser natural o autónoma, en donde el cuerpo no ataca a sus propias proteínas y antígenos, o puede ser inducida, resultante de la manipulación del sistema inmune. La tolerancia central se presenta durante el desarrollo de linfocitos y opera en el timo y la médula ósea. Durante este proceso, los linfocitos T y B que reconocen los auto-antígenos se suprimen antes de que se desarrollen en células totalmente inmunocompetentes. Este proceso es más activo durante el desarrollo fetal, pero continúa a través de toda la vida ya que se generan linfocitos inmaduros. La tolerancia de células T periféricas se refiere a la

falta de respuesta funcional a los auto-antígenos que están presentes en tejidos periféricos, y se presenta después de que las células T y B maduran y entran a la periferia. Estos procesos incluyen la supresión de células auto-reactivas por medio de células T "reguladoras" y la generación de hipo-respuesta (anergia) en linfocitos que encuentran el antígeno en ausencia de las señales co-estimuladoras que acompañan la inflamación. "Tolerancia adquirida" o "inducida" se refiere a la adaptación del sistema inmune a antígenos externos caracterizada por una no-reactividad específica de los tejidos linfoides a un antígeno dado que, en otras circunstancias, sería probable que indujera una inmunidad mediada por célula o humoral. En adultos, la tolerancia puede inducirse clínicamente mediante la administración repetida de muy grandes dosis del antígeno, o de pequeñas dosis que están por debajo del umbral requerido para la estimulación de una respuesta inmune, tal como a través de la administración intravenosa o sublingual de antígenos solubles. La inmunosupresión también facilita la inducción de tolerancia. La desactivación de la auto-tolerancia puede conducir a la autoinmunidad.

"Mejorar la función de las células T" significa inducir, ocasionar o estimular a que una célula T tenga una función biológica sostenida o amplificada o renovar o reactivar las células T agotadas o inactivas. Ejemplos de mejoramiento de función de células T incluyen: secreción incrementada del interferón γ de células T CD8+, proliferación incrementada, respuesta al antígeno incrementada (e.g., limpieza viral o de patógenos) relativa a los niveles antes de la intervención. En una modalidad, el nivel de mejoramiento es de al menos 50%, alternativamente 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 120%, 150%, 200%. La manera de medir este mejoramiento se conoce por los de experiencia ordinaria en la técnica.

Un "trastorno disfuncional de células T" es un trastorno o condición de las células T caracterizado por una respuesta disminuida a la estimulación antigénica. En una modalidad particular, un trastorno disfuncional de células T es un trastorno que está específicamente asociado con una señalización incrementada inapropiada a través de PD-1. En otra modalidad, el trastorno disfuncional de células T es uno en el cual las células T son anérgicas o han disminuido su capacidad para secretar citosinas, proliferar, o ejecutar una actividad citolítica. En un aspecto específico, la respuesta disminuida da como resultado un control no efectivo de un patógeno o tumor que expresa un inmunógeno. Ejemplos de trastornos disfuncionales de células T caracterizados por la disfunción de células T incluyen infección aguda no resuelta, infección

crónica e inmunidad tumoral.

"Infección crónica" se refiere a una infección en la cual un agente infeccioso (e.g., patógenos tales como virus, bacteria, parásitos protozoarios, hongos o lo similar) ha inducido una respuesta inmune en el huésped infectado, pero no se ha limpiado o eliminado de ese huésped como durante una infección aguda. Las infecciones crónicas pueden ser persistentes, latentes o lentas. Aunque las infecciones agudas se resuelven típicamente por el sistema inmune dentro de pocos días o semanas (e.g., influenza), las infecciones persistentes pueden persistir a un nivel relativamente bajo por meses, años, décadas o de por vida (e.g., hepatitis B). en contraste, una infección latente se caracteriza por un largo período de actividad asintomática puntualizada por un período de infección de alto grado que se incrementa rápidamente y niveles elevados de patógeno (e.g., herpes simple). Finalmente, una infección lenta es una caracterizada por un incremento gradual y continuo en los síntomas de enfermedad, tal como un largo período de incubación seguido por un curso clínico prolongado y progresivo que comienza después del inicio de los síntomas clínicos. A diferencia de las infecciones latentes y persistentes, la infección lenta puede no comenzar con un período agudo de multiplicación viral (e.g., infección por picornavirus, visnavirus, encefalopatía espongiforme, enfermedad Creutzfeldt-Jakob). Los agentes infecciosos ejemplares capaces de inducir una infección crónica incluyen virus (e.g., citomegalovirus, virus Epstein Barr, virus de hepatitis B, virus de hepatitis C, virus de herpes simple, virus de inmunodeficiencia humana tipos I y II, virus de papiloma humano tipos 1 y 2, virus linfotróficos T humanos tipos 1 y 2, virus de varicela zoster y lo similar), bacterias (e.g., *Mycobacterium tuberculosis, Listeria spp., Klebsiella pneumoniae, Streptococcus pneumoniae, staphylococcus aureus, Borrelia spp., Helicobacter pylori* y lo similar), parásitos protozoarios (e.g., *Leishmania spp., Plasmodium falciparum, Schistosoma spp., Toxoplasma spp., Tripanosoma spp., Taenia carssiceps* y lo similar) y hongos (e.g., *Aspergillus spp., Candida albicans, Coccidioides immitis, Histoplasma capsulatum, Pneumocystis carinii* y lo similar). Los agentes infecciosos adicionales incluyen priones o proteínas no plegadas que afectan el cerebro o la estructura de las neuronas propagando además el no plegado de las proteínas en estos tejidos dando como resultado la formación de placas amiloides que ocasionan la muerte celular, el daño al tejido y la muerte eventual. Ejemplos de enfermedad resultante de la infección de prion incluyen: enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y sus variedades, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), insomnio familiar fatal (sFI),

kuru, encefalopatía espongiforme, encefalopatía espongiforme bovina (BSE) en ganado (enfermedad aka "vacas locas") y varias otras formas animales de encefalopatía [e.g., encefalopatía de mink transmisible (TME), enfermedad de desgaste crónico (CWD) en venados de cola blanca, alces y ciervos, encefalopatía espongiforme felina, encefalopatía exótica ungulada (EUE) en nyala, oryx y kudu mayor, encefalopatía espongiforme de avestruz].

"Inmunidad tumoral" se refiere al proceso en el cual los tumores evaden el reconocimiento y la limpieza inmune. Por tanto, como un concepto terapéutico, la inmunidad tumoral se "trata" cuando tal evasión se atenúa y los tumores se reconocen y son atacados por el sistema inmune. Ejemplos de reconocimiento del tumor incluyen, enlace del tumor, encogimiento del tumor y limpieza del tumor.

Un "antagonista co-estimulador negativo a B7" ("BNCA") es un agente que disminuye, bloquea, inhibe, abroga o interfiere con la señal co-estimuladora negativa mediada por o a través de proteínas de superficie celular expresadas en linfocitos T mediadas por un miembro de la familia B7. En un aspecto, un BNCA, solo o en combinación con los anticuerpos anti-PD-1 de la invención, puede convertir una célula T disfuncional en no disfuncional. En otro aspecto, un BNCA puede ser un agente que inhibe la síntesis del ácido nucleico o de la proteína, la expresión, señalización, y/o procesamiento post-expresión de una molécula co-estimuladora negativa a B7. Aún en otro aspecto, un BNCA es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de enlace al antígeno, oligopéptido de BNCA, ARNi de BNCA o molécula pequeña de BNCA que disminuye, bloquea, inhibe, abroga o interfiere con la transducción de señal por medio de una molécula co-estimuladora negativa a B7. Ejemplos de moléculas co-estimuladoras negativas a B7 incluyen: CTLA-4, PD-L1, PD-1, B7.1 (expresada en células T), PD-L2, B7-H3 y B7-H4.

Un "agonista co-estimulador positivo" es una molécula que incrementa, mejora, aumenta o facilita la señal co-estimuladora mediada por o a través de proteínas de superficie celular expresadas en linfocitos T. En un aspecto, una molécula co-estimuladora positiva puede ser un dominio extracelular, construcción soluble o anticuerpo agonista que activa una trayectoria co-estimuladora positiva. Ejemplos de moléculas co-estimuladoras positivas incluyen las moléculas de la superfamilia B7, e.g., B7.1, B7.2, CD28 e ICOS/ICOSL. Ejemplos adicionales incluyen las moléculas co-estimuladoras de la familia TNFR, e.g., OX40/OX40L, 41-BB/41-BBL, CD27/CD27L, CD30/CD30L y HVEM/LIGHT.

Una "molécula pequeña" o "molécula orgánica pequeña" es una que tiene un pero molecular por debajo de aproximadamente 500 Daltons.

Un "ARN de interferencia", "ARNi" es un ARN de 10 a 50 nucleótidos de longitud que reduce la expresión de un gen objetivo, en donde las porciones de la cadena son suficientemente complementarias (e.g., tienen al menos 80% de identidad con el gen objetivo). El método de interferencia de ARN se refiere a la supresión específica al objetivo de la expresión del gen (i.e., "silenciado del gen") que se presenta a nivel post-transcripcional (e.g., translación) e incluye todos los mecanismos post-transcripcionales y transcripcionales de la inhibición mediada por el ARN de la expresión del gen, tales como los descritos en P.D. Zamore, Science 296: 1265 (2002) y Hannan y Rossi, Nature 431: 371-378 (2004). Como se utiliza en la presente, el ARNi puede estar en forma de ARN pequeño de interferencia (ARNsi), ARN de capilar corto (ARNsh), y/o micro ARN (ARNmi). Tales moléculas de ARNi son frecuentemente complejos de ARN bicatenario que pueden expresarse en forma de cadenas de ARN separadas complementarias o parcialmente complementarias. Se conocen bien en la técnica los métodos para diseñar complejos de ARN bicatenario. Por ejemplo, el diseño y la síntesis de ARNsh y ARNsi adecuados puede encontrarse en Sandy et al., BioTechniques 39: 215-224 (2005).

Un "ARN pequeño de interferencia" o ARNsi es un ARN bicatenario (ARNds) doble de 10 a 50 nucleótidos de longitud que reduce la expresión de un gen objetivo, en donde las porciones de la primera cadena son suficientemente complementarias (e.g., tienen al menos 80% de identidad con el gen objetivo). Los ARNsis están diseñados específicamente para evitar la respuesta anti-viral caracterizada por elevada síntesis de interferón, inhibición no específica de la síntesis de proteínas y la degradación del ARN que frecuentemente dan como resultado el suicidio o la muerte de la célula asociada con el uso del ARNi en células de mamífero. Paddison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 99(3):1443-8 (2002).

El término "capilar" se refiere a una estructura de ARN en bucle de 7 a 20 nucleótidos. Un "ARN de capilar corto" o ARNsh es un ARN monocatenario de 10 a 50 nucleótidos de longitud caracterizado por una vuelta de capilar que reduce la expresión de un gen objetivo, en donde las porciones de la cadena de ARN son suficientemente complementarias (e.g., tienen al menos 80% de identidad con el gen objetivo). El término "bucle precursor" se refiere a una formación de pares entre dos regiones del mismo par base de la molécula para

formar una doble hélice que termina en un bucle corto no emparejado, proporcionando una estructura en forma de paleta.

Un "micro ARN" o "ARNmi" (previamente conocido como ATNst) es un ARN monocatenario de aproximadamente 10 a 70 nucleótidos de longitud que se transcribe inicialmente como pre-ARNmi caracterizado por una estructura de "bucle precursor" que se procesa subsecuentemente en un ARNmi maduro después de un procesamiento adicional a través del complejo de silenciado inducido por ARN (RISC).

Un "ARN de interferencia de BNCA" o "ARNi BNCA" se enlaza, preferentemente de manera específica, a un ácido nucleico de BNCA y reduce su expresión. Esto significa que la expresión de la molécula co-estimuladora negativa a B7 es menor con el ARNi de BNCA presente en comparación con la expresión de la molécula co-estimuladora negativa a B7 en un control en donde el ARNi de BNCA no está presente. El ARNi de BNCA puede identificarse y sintetizarse utilizando métodos conocidos (Shi Y., Trends in Genetics 19(1): 9-12 (2003), WO 2003056012, WO 2003064621, WO 2001/075164, WO 2002/044321.

Un "oligopéptido de BNCA" es un oligopéptido que se enlaza, preferentemente de manera específica, a un polipéptido co-estimulador negativo a B7, incluyendo un receptor, ligando o componente de señalización, respectivamente, como se describe en la presente. Tales oligopéptidos pueden sintetizarse químicamente utilizando metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o pueden prepararse y purificarse utilizando tecnología recombinante. Tales oligopéptidos son comúnmente de al menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, alternativamente de al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 1000 aminoácidos de longitud o más. Tales oligopéptidos pueden identificarse sin experimentación indebida utilizando técnicas muy conocidas. A este respecto, se anota que las técnicas para seleccionar bibliotecas de oligopéptidos por oligopéptidos que son capaces de enlazarse específicamente a un polipéptido objetivo son muy conocidas en la técnica (ver, e.g., Patentes de E.U. Nos. 5,556,762, 5,750,373, 4,708,871, 4,833,092, 5,223,409, 5,403,484, 5,571,689, 5,663,143; Publicaciones PCT Nos. WO 84/03506 y WO 84/03564; Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 81: 3998-4002 (1984); Geysen et al.,

Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 82: 178-182 (1985); Geysen et al., en Synthetic Peptides as Antigens (Péptidos sintéticos como antígenos) 130-149 (1986); Geysen et al., J. Immunol. Meth. 102: 259-274 (1987); Schoofs et al., J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla S.E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 87:6378 (1990); Lowman H.B. et al., Biochemistry, 30: 10832 (1991); Clackson T. et al., Nature, 352: 624 (1991); Marks J.D. et al., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991); Kang A.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 88: 8363 (1991) y Smith G.P. Current Opin. Biotechnol., 2: 668 (1991).

Un "antagonista de molécula pequeña de BNCA" o "molécula pequeña de BNCA" es una molécula orgánica diferente a un oligopéptido o anticuerpo como se define en la presente que inhibe, preferentemente de manera específica, un polipéptido co-estimulador negativo a B7. Tal inhibición de la señalización co-estimuladora negativa a B7 preferentemente hace a una célula T disfuncional responsiva a la estimulación del antígeno. Ejemplos de moléculas pequeñas de BNCA pueden identificarse y sintetizarse químicamente utilizando metodología conocida (ver, e.g., Publicaciones PCT Nos. WO 2000/00823 y WO 2000/39585). Tales moléculas pequeñas de BNCA son comúnmente de menos de aproximadamente 2000 daltons en tamaño, alternativamente de menos de aproximadamente 1500, 750, 500, 250 o 200 daltons en tamaño, son capaces de enlazarse, preferentemente de manera específica, a un polipéptido estimulador negativo a B7 como se describe en la presente, y pueden identificarse sin experimentación indebida utilizando técnicas conocidas. A este respecto, se anota que las técnicas para seleccionar bibliotecas de moléculas orgánicas por moléculas que son capaces de enlazarse a un polipéptido objetivo son muy conocidas en la técnica (ver, e.g., las Publicaciones PCT Nos. WO 00/00823 y WO 00/39585).

El término "antibiótico" incluye cualquier molécula que inhibe o abole específicamente el crecimiento de microorganismos, tales como virus, bacterias, hongos o protozoarios, pero que no es letal para el huésped en la concentración e intervalo de dosis administrados. Como se utiliza en la presente, el término antibiótico incluy6e un agente anti-bacteriano, un agente anti-viral, un agente anti-fungal y un agente anti-protozoarios. En un aspecto específico, un antibiótico es no tóxico al huésped en la concentración e intervalo de dosis administrados. Los antibióticos anti-bacterianos o antibacterianos pueden clasificarse ampliamente ya sea como bactericidas (i.e., que matan directamente) o bacteriostáticos (i.e., evitan la división). Los antibióticos anti-bactericidas pueden sub-clasificarse además

como de espectro estrecho (i.e., solamente afectan una pequeña clase del subconjunto de bacterias, e.g., gram-negativas, etc.) o de amplio espectro (i.e., afecta a una amplia clase). Los ejemplos de antibióticos incluyen: (i) aminoglicósidos, e.g., amikacin, gentamicina, canamicina, neomicina, netilmicina, estreptomicina, tobramicina, paromicina, (ii) ansamicinas, e.g., geldanamicina, herbimicina, (iii) carbacefemos, e.g., loracarbef, (iv), carbapenemos, e.g., ertapenum, doripenem, imipenem/cilastatina, meropenem, (v) cefalosporinas (primera generación), e.g., cefadroxil, cefazolin, cefalotin, cefalexin, (vi) cefalosporinas (segunda generación), e.g., ceflaclor, cefamandol, cefoxitin, cefprozil, (vi) cefalosporinas (tercera generación), e.g., cefixime, cefdinir, cefditoren, cefoperazona, cefotaxime, cefpodoxima, ceftazidima, ceftibuten, ceftizoxima, ceftriaxona, (vii) cefalosporinas (cuarta generación), e.g., cefepima, (viii), cefalosporinas (quinta generación), e.g., ceftobiprole, (ix) glicopéptidos, e.g., teicoplanin, vancomicin, (x) macrolidas, e.g., axitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina, troleandomicina, telitromicina, espectinomicina, (xi) monobactamos, e.g., axetronam, (xii) penicilinas, e.g., amoxicilina, ampicilina, axlocilina, carbenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, mezlocilina, meticilinas, nafcilina, oxacilina, penicilina, peperacilina, ticarcilina, (xiii) polipéptidos antibióticos, e.g., bacitracina, colistina, polimixina B, (xiv) quinolonas, e.g., ciprofloxacina, enoxacina, gatifloxacina, levofloxacina, lemefloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, orfloxacina, trovafloxacina, (xv) sulfonamidas, e.g., mafenida, prontosil, sulfacetamida, sulfametizol, sulfanilamida, sulfasalazina, sulfisoxazol, trimetoprima, trimetoprima-sulfametoxazol (TMP-SMX), (xvi) tetraciclinas, e.g., demeclociclina, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina y (xvii) otros tales como arspenamina, cloranfenicol, clindamicina, lincomicina, etanbutol, fosfomicina, ácido fusí9dico, furazolidona, isoniazida, linezolida, metronidazol, mupirocina, nitrofurantoina, platensimicina, pirazinamida, quinupristina/dalfopristina, rifampina/rifampicina o tinidazol.

El término "agente antiviral" incluye cualquier molécula que inhibe o abole el crecimiento, la morbidez y/o la supervivencia de virus. Éste incluye fármacos anti-retrovirales tales como (1) inhibidores de transcriptasa inversa incluyendo por ejemplo: (a) inhibidores de transcriptasa inversa análogos de nucleósido (NRTIs) (e.g., Aciclovir/Aciclovir (ZOVIRAX®, ZOVIR®), cidofovir, azidotimidina/zidovudina (AZT, RETROVIR®, didanosina (ddI, VIDEX®; zalcitabina (ddC, HIVID®); stavudina (d4T, ZERIT®; lamivudina (3TC, EPIVIR®); abacavir (ZIAGEN®); emtricitabina (EMTRIVA®); brivudina (HELPIN®); entecavir

(BARACLUDE®); idoxuridina; viramidina (taribavirina por Valeant Pharmaceuticals), inhibidor de polimerasa análogo de nucleósido de cirtidina PCI-6130 y variantes de profármaco (e.g., R7128) por Pharmasset/Roche; inhibidor análogo de nucleósido por Merck/Isis Pharmaceuticals – MK-0608, (b) inhibidores de transcriptasa inversa análogos de nucleótido (NtRTIs) (e.g., tenofovir (VIREAD®); adefovir (PREVEON®, HEPSERA®); fomivirsen (VITRAVENE®); (c) inhibidores de transcriptasa inversa no nucleósido, (NNRTIs), efavirenz (SUSTIVA®, STOCRIN®); nevirapine (VIRAMUNE®), delavirdina (RESCRIPTOR®), etravirina (INTELENCE®), lovirida; inhibidor no nucleósido de ARN polimerasa dependiente de ARN de HCV por ViroChem Pharma – VCH-759, inhibidor no nucleósido de inhibidor de polimerasa de HCV por Pfizer – PF-868554; y (d) inhibidores de polimerasa incluyendo: ARN polimerasa dependient5e de ARN del virus de hepatitis C por Boehringer Ingelheim – BILB-1941, inhibidor de ARN polimerasa por Roche –R1626; ACH-0137171 un inhibidor de replicasa por Achillion Pharmaceuticals, R7128 – inhibidor de polimerasa por Roche/Pharmaset, ABT-333 y ABT-072 – inhibidores de polimerasa por Abbott, B1 207127 – inhibidor de polimerasa por Boehringer Ingelheim, PSI-7851 – inhibidor de polimerasa por Pharmasset, ANA598 – inhibidor de polimerasa por Anadys Pharmaceuticals, MK-3281 – inhibidor de polimerasa por Merck, IDX184 – inhibidor de polimerasa por Idenix, GSK 625433 – inhibidor de polimerasa por Glaxo Smith Kline, INX-189 – inhibidor de polimerasa por Inhibitex, NM283 – inhibidor de polimerasa por Idenix, HCV796 – inhibidor de polimerasa por Wyeth, GL60667 y GS9190 – inhibidores de polimerasa por Gilead, PF-00868554 – inhibidor de polimerasa por Pfizer, VCH759, VCH916, VX222 y VX759 – inhibidores de polimerasa por Virochem, IDX184 e IDX375 – inhibidores de polimerasa por Idenix, BMS650032 – inhibidor de polimerasa por Bristol Myers Squibb; (2) inhibidores de prote5asa incluyendo por ejemplo: saquinavir (FOROVASE®/INVIRASE®), ritonavir (NORVIR®), indinavir (CRIXIVAN®), nelfinavir (VIRACEPT®), amprenavir (AGENERASE®), lopinavir (KALETRA®), atazanavir (REYATAZ®), fosamprenavir (LEXIVA®), tipranavir (APTIVUS®), darunavir (PREZISTA®), telapravir (VX-950); los inhibidores de proteasa de HCV de segunda generación por Vertex Pharmaceuticals – VX-500 y VX-813; el inhibidor de proteasa NS3/4ª por Intermine/Roche – ITMN-191/R-7227, boceprevir, el inhibidor de proteasa por Schering-Plough-SCN 503034, el inhibidor de proteasa NS3/4A de HCV por Medivir/Tibotec – TMC435/TMC435350, el inhibidor de proteasa ACH-1625 por Achillion Pharmaceuticals, inhibidor de proteasa ACH-806

por Achillion/Gilead, B1201335 e inhibidores de proteasa BILN 2061 por Boehringer Ingelheim, inhibidor de proteasa SCH 900518/SP900518 (narlaprevir) por Schering-Plough, MK-7009 – inhibidor de proteasa por Schering-Plough, MK-7009 – inhibidor de proteasa por Merck, BMS-650032, BMS-790052 y BMS-791325 – inhibidores de proteasa por Bristol Myers Squibb, R7227 – inhibidor de proteasa por Roche, PHX1766 – inhibidor de proteasa por Phenomix, AVL-181 – inhibidor de proteasa por Avila Therapeutics, Biliverdin, CTS-1027 – inhibidor de proteasa por Roche Biosciences, VX985 – inhibidor de proteasa por Vertex, VCH-759 y VCH-917 – inhibidores de proteasa por Virochem/Vertex, IDX-136 y 316 – inhibidores de proteasa por Idenix, ABT-450 – inhibidor de proteasa por Abbott, VBY 376 – inhibidor de proteasa por Virobay; (3) inhibidores de integrasa incluyendo por ejemplo: raltegravir (ISENTRESS®), elvitegravir; (4) terapias combo de inhibidores análogos de nucleósido/análogos de nucleótido, atripla (tenofovir + embricitabina + efavirenz), combivir (lamivudeina + zidovudina), (5) inhibidores de entrada o de fusión incluyendo por ejemplo: maraviroc, enfuvirtida, docosanol, anticuerpo anti-CD4, anticuerpo anti-gp120, anticuerpo anti-CCR5, antagonistas NS5a de HCV: (a) A-831, A-689 y AZD 2836 por Arrow Therapeutics, (b) BMS-790052 y BMS-824393 por Bristol Myers Squibb, (c) GSK-625433 por Glaxo Smith Kline, (d) antagonistas NS4a ACH-1095; (5) inhibidores de maduración incluyendo por ejemplo: bevirimat y vivecon; (6) inhibidores de liberación viral incluyendo por ejemplo: zanamivir (RELENZA®), oseltamivir (TAMIFLU®), arbidol; (7) mejoradores de respuesta inmune incluyendo por ejemplo interferón α (e.g., BLX-883 y BLX 883 CR por Biolex Therapeutics, belerofon por Nautilus Biotech, IFN-α de larga acción, IFN-α SR por LG Life Sciences, IFN-α2b CR de larga acción e IFN-α2b XL por Flamel Technologies, IFN-α pegilado (e.g., PEG-IFN-α-2ª, PEGASYS®; PEG-IFN-α2b, PEGINTRON®), proteína de fusión de albúmina de suero humana IFN-a2b (ALBUFERON®); interferón-β incluyendo IFN-β-1b (BETASERON®), interferón-γ, interferón-λ, interferón-λ pegilado (e.g., PEG-rIL-29 por ZymoGenetics/Novo Nordisk), interferón-ω/interferón de leucocito II (e.g., Intarcia Therapeutics), agonistas del receptor 7 similares a toll incluyendo imiquimod, isatoribina y variantes de profármaco de los mismos (e.g., ANA-975 y ANA-971) por Anadys Pharmaceuticals, Oglufanide (IM862, L-Glu-L-Trp-OH) y variantes conjugadas de lípido o glicosilo de los mismos por Implicit Bioscience, NOV-205 (e.g., Molixan® - un antiviral peptídico por Novelos Therapeutics, Inc.), el antiviral EHC18 por Enzo Biochem, gamma-D-glutamil-L-triptofan (e.g., SCV-07, SciClone

Pharmaceuticals/Verta), aloferon (e.g., aloferon-1-HGVSGHGQHGVHG, aloferon-2-GVSGHGQHGVHG), CPG 10101 – un agonista de TLR-9 por Coley Pharmaceuticals/Actilon; (8) mejoradores sinergísticos antivirales, i.e., pocas o ninguna propiedad antiviral solos, pero mejoran el efecto de otros antivirales – e.g., cloroquina, jugo de uva, hidroxiurea, leflunomida, ácido micofenólico, resveratrol, ritonavir así como otros fármacos antivirales tales como amantadina, edoxudina, famciclovir (FAMVIR®), peciclovir, fascarbet, fosfonet, ganciclovir (CYTOVENE®, CYMEVENE®, VITRASERT®), gardasil, ibacitabina, imunovir, moroxidine, nexavir, peramivir, pleconaril, podophyllotoxin, ribavirin, rimantadina, trifluridina, trizivir, tromantadina, truvada, valaciclovir, valganciclovir, vidarabina y mejoradores de interferón tales como EMZ702 por Transition Therapeutics, dihidrocloruro de histamina (e.g., Ceplene® + IFN-α); y (9) antivirales misceláneos o no clasificados tales como: KPE-02003002 (Artenimol) por Kemin Pharmaceuticals, mitoquinona – un agonista antioxidante de co-enzima Q10 por Antipodean Pharmaceuticals, inhibidores de alfa-glucosidasa I (e.g., MX-3253 celgosivir por Migenix Pharmaceuticals, castanospermina, antagonistas de glucocorticoide (e.g., inhibidores IRES de HCV, mifepristona, VGX-410C por VGX Pharmaceuticals), agonistas hepáticos (e.g., PYN17 por Phynova Pharmaceuticals), agentes antivirales derivados de terapias herbales tradicionales, e.g., PYN18 por Phynova Pharmaceuticals, inhibidores de caspasa (e.g., LB-84451 por LG Life Sciences, emricasan PF-03491390/IDN-6556 por Pfizer), análogos de ciclosporina que inhiben la replicación viral previniendo el enlace a ciclofilina A (e.g., SDZ NIM 911 por Novartis, Debio-025 por Debiopharm).

El término "agente anti-fungal" incluye cualquier molécula que inhibe o abole el crecimiento, la morbidez y/o la supervivencia de hongos. Este incluye por ejemplo, (1) anti-fungal de polieno tales como natamiín, rimocidin, filipin, nistatin, Amphotericin B, candicin; (2) imidazoles tales como miconazol, cetoconazol (LOTRIMIN®), econazol, bifonazol, butoconazol, fenticonazol, isoconazol, oxiconazol, sertaconazol (ERTACZO®), sulconazol, tioconazol, (3) triazoles tales como fluconazol, itraconazol, isavuconazol, ravuconazol, posaconazol, voriconazol, terconazol; (4) alilaminas tales como terbinafina (LAMISIL®), amorolfina, naftifina (Naftin®), butenafina (LOTRIMIN ULTRA®); (5) equinocandinas, tales como anidulafungin, caspofungin, micafungin y otras sustancias con propiedades anti-fungal tales como ácido benzoico, ciclopix, flucitosina, grisefulvin, violeta de genciana, haloprogrin, tolnaftato (TINACTIN®, DESENEX®, AFTATO®), ácido undecilénico, aceite de árbol de té – ISO 4730

(Aceite de Melaleuca, tipo Terpinen-4-ol) aceite de citronela, hoja de limón, aceite de naranja, aceite de palmarrosa, pachuli, arrayán de limón, aceite de semilla de neem, aceite de coco.

El término "agente anti-protozoarios" o "agente anti-protozoo" incluye cualquier molécula que inhibe o abole el crecimiento, la morbidez y/o la supervivencia de organismos protozoarios. Ejemplos de agentes anti-protozoarios incluyen, (1) agentes anti-malaria, e.g., quinina, quinimax, quinidina, quinimax, cloroquina (ARALEN®, hidroxicloroquina (PLAQUENIL®), amodiaquina, primetamina (DARAPRIM®), sulfadoxina, proguanil, mefloquina (LARIAM®), halofantrina, primaquina, artemesinina y sus derivados (e.g., artemeter, artensunato, dihidroartemisinina, arteéter), clindamicina y combinaciones de las mismas; (2) inhibidores de proteasa y los fármacos, benznidazol, buparvacuona, carbasona, clioquinol, disulfiram, eflornitina, emetina, furazolidina, antimoniato de meglumina, melarsoprol, metronidazol (FLAFYL®), miltefosina, nifurtimox, nitazoxanida, ornidazol, sulfato de paromicina, pentamidina, pirimetamina (DARAPRIM®), secnidazol, tinidazol.

El término "vacuna" como se utiliza en la presente incluye cualquier inmunógeno no patógeno que, cuando se inocula en un huésped, induce inmunidad protectora contra un patógeno específico. Las vacunas pueden tomar muchas formas. Las vacunas pueden ser organismos completos que comparten importantes antígenos con el patógeno pero que no son patogénicos en sí (e.g., viruela). Las vacunas también pueden prepararse a partir de destruidos (vacuna Salk de polio) o atenuados (perdieron su capacidad de producir la enfermedad – e.g., vacuna Sabin de polio). Las vacunas también pueden prepararse a partir de macromoléculas purificadas aisladas del organismo patogénico. Por ejemplo, vacunas toxoides (e.g., de tétanos y difteria) que contienen la forma inactiva de la toxina bacteriana soluble – que dan como resultado la producción de anticuerpos anti-toxina, pero no inmunidad a la bacteria intacta. Las vacunas de subunidad (e.g., de hepatitis B) contienen solamente una proteína inmunogénica única aislada del patógeno de interés. Las vacunas conjugadas a hapteno unen ciertos epítopes de carbohidrato o polipéptido aislados del patógeno de interés a vehículos inmunogénicos, tales como el toxoide de tétanos. Estas estrategias utilizan los epítopes como haptenos para inducir la producción de anticuerpos, que después reconocen al mismo epítope en el patógeno original. Sin embargo, para ser máximamente efectivas, tales vacunas deben incorporar epítopes tanto de célula B como de célula T y los epítopes de célula T deben seleccionarse para

asegurar que pueden ser reconocidos, presentados y respondidos por los sistemas inmunes de los individuos huésped.

Las vacunas de ADN explotan la capacidad de las células huésped para absorber y expresar el ADN que codifica para las proteínas patogénicas que se inyectan intramuscularmente.

Ejemplos de vacunas antivirales que pueden utilizarse en combinación con los anticuerpos anti-PD-L1 para los métodos descritos en la presente incluyen: vacuna de HCV (virasome) por Pevion Biotech., TG4040 (MVA-HCV por Transgene virón diseñado para mejorar la respuesta inmune celular (linfocitos T citotóxicos CD4+ y CD8+) contra NS3, NS4 y NS5B, CHRONVAC® - una vacuna de ADN NS3/4a optimizada por codón por Inovio Biomedical, vacunas HCV/CpG por Novartis, GI-5005 – una vacuna de HCV por Globeimmune, IC41 una mezcla de péptidos sintéticos que tienen epítopes T de HCV CD4 y CD8 en combinación con poli-L-arginina por Intercell.

Las respuestas del huésped a inmunógenos puede mejorarse si se administran como una mezcla con adyuvantes. Los adyuvantes inmunes funcionan en una o más de las siguientes formas: (1) prolongando la retención del inmunógeno, (2) incrementando el tamaño efectivo del inmunógeno (y por tanto promoviendo la fagocitosis y la presentación a macrófagos), (3) estimulando el influjo del macrófago u otras células inmunes al sitio de inyección, o (4) promoviendo la producción local de citosina y otras actividades inmunológicas. Los adyuvantes ejemplares incluyen: adyuvante completo de Freund (CFA), sales de aluminio y proteínas micobacterianas derivadas tales como di o tripéptidos de muramil.

El término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales, (incluyendo anticuerpos de longitud total que tienen una región de Fc de inmunoglobulina) composiciones con especificidad poliepitópica, anticuerpos multiespecíficos (e.g., anticuerpos biespecíficos, diabodies, y moléculas monocatenarias), así como fragmentos de anticuerpo (e.g., Fab, $F(ab')_2$ y Fv). El término "inmunoglobulina" (Ig) se utiliza de manera intercambiable con "anticuerpo" en la presente.

La unidad básica de anticuerpo de 4 cadenas es una glicoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Un anticuerpo de IgM consiste de 5 de las unidades básicas de heterotetrámero junto con un polipéptido adicional llamado una cadena J, y contiene 10 sitios de enlace al antígeno, mientras que los anticuerpos de IgA

comprenden de 2 a 5 de las unidades básicas de 4 cadenas que pueden polimerizarse para formar ensamblajes polivalentes en combinación con la cadena J. En el caso de las IgGs, la unidad de 4 cadenas es generalmente de aproximadamente 150,000 Daltons. Cada cadena L está enlazada a una cadena H mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están enlazadas entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. cada cadena H y L también tiene puentes disulfuro intracadena regularmente separados. Cada cadena H tiene, en la terminal N, un dominio variable (V_H) seguido por tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ, y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ε. Cada cadena L tiene, en la terminal N, un dominio variable (V_L) seguido por un dominio constante en su otro extremo. El V_L está alineado con el V_H y el C_L está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_H1). Se cree que residuos particulares de aminoácido forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada. La formación de pares de un V_H y un V_L juntos forman un sitio único de enlace al antígeno. Para la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, ver, e.g., Basic and Clinical Immunology (Inmunología básica y clínica), 8ª edición, Daniel P. Sties, Abba I. Terr y Tristram G., Parslow (eds.) Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y Capítulo 6. La cadena L de cualquier especie vertebrada puede asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa y lambda, en base a las secuencias de aminoácido de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácido del dominio constante de sus cadenas pesadas (CH), las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas designadas, α, δ, ε, γ, y μ, respectivamente. Las clases γ y α se dividen además en subclases en base a las relativamente menores diferencias en la secuencia y función de la CH, e.g., los humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado, separado y/o recuperado de un componente de su ambiente de producción (e.g., natural o recombinante). Preferentemente, el polipéptido aislado está libre de asociación con todos los otros componentes provenientes de su ambiente de producción. Los componentes contaminantes de su ambiente de producción, tales como los resultantes de las células transfectadas recombinantes, son materiales que típicamente interferirían con la investigación, el diagnóstico o los usos terapéuticos

del anticuerpo y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En modalidades preferidas, el polipéptido se purificará: (1) a más de 95% por peso del anticuerpo como se determina, por ejemplo, por el método Lowry y, en algunas modalidades, a más del 99% por peso; (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos de terminal N o interna mediante el uso de un secuenciador de cuba giratoria, o (3) a homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferentemente, tintura de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de células recombinantes dado que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, comúnmente, un polipéptido o anticuerpo aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

La "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios de terminal amino de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera pueden referirse como "VH" y "VL" respectivamente. Estos dominios son generalmente las partes más variables del anticuerpo (en relación a otros anticuerpos de la misma clase) y contienen los sitios de enlace al antígeno.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertos segmentos de los dominios variables difieren extensamente en secuencia entre los anticuerpos. El dominio V media el enlace al antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variablidad no está uniformemente distribuida a través de la extensión total de los dominios variables. Por el contrario, ésta se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables (HVRs) en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan las regiones de estructura (FR). Los dominios variables de cadenas nativas pesada y ligera comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en su mayoría una configuración de lámina beta, conectadas por tres HVRs, que forman bucles que conectan, y en algunos casos, forman parte de, la estructura de lámina beta. Las HVRs en cada cadena se mantienen juntas en cercana proximidad por medio de las regiones FR y, con las HVRs de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de enlace al antígeno de los anticuerpos (ver Kabat et al., Sequences of Immunological Interest (Secuencias de interés inmunológico), Quinta Edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en el enlace

del anticuerpo a un antígeno, pero exhiben diversas funciones de efector, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente del anticuerpo.

El término "anticuerpo monoclonal" como se utiliza en la presente, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, i.e., los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones de origen natural y/o modificaciones post-translación (e.g., isomerizaciones, amidaciones) que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigidos contra un solo sitio antigénico. En contraste con las preparaciones de anticuerpo policlonal que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra una sola determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en que están sintetizados por el cultivo de hibridoma, no contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo siendo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse que requiere la producción del anticuerpo mediante algún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a utilizarse de acuerdo con la presente invención pueden producirse mediante una variedad de técnicas incluyendo, por ejemplo, el método de hibridoma (e.g., Kohler y Milstein, Nature, 256: 495-97 (1975); Hongo et al., Hybridoma, 13(3): 251-260 (1995), Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual (Anticuerpos: un manual de laboratorio) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed., 1988); Hammerling et al., en Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas (Anticuerpos monoclonales e hibridomas de células T) 563-681 (Elsevier N.Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (ver, e.g., Patente de E.U. No. 4,816,567), tecnologías de despliegue de fago (ver, e.g., Clackson et al., Natura, 352:624-628 (1991); Mark et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1992); Sidhu et al., J. Mol. Biol., 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 101(34): 1267-12472 (2004); y Lee et al., J. Immunol. Methods., 284(1-2): 119-132 (2004) y tecnologías para producir anticuerpos humanos o tipo humano en animales que tienen parte o todos los sitios de inmunoglobulina humana o genes que codifican para secuencias de inmunoglobulina humana (ver, e.g., WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 90: 2551 (1993); Jakobovits et al.,

Nature 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immunol.,. 7:33 (1993); Patentes de E.U. Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; y 5,661,016; Marks et al., BioTechnology 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnol., 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol., 14: 826 (1996); y Lonberg y Huzar, Intern. Rev. Immunol., 13: 65-93 (1995).

El término "anticuerpo desnudo" se refiere a un anticuerpo que no está conjugado a un residuo citotóxico o radioetiqueta.

Los términos "anticuerpo de longitud total", "anticuerpo intacto" o "anticuerpo completo" se utilizan de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, opuesto a un fragmento de anticuerpo. Específicamente, los anticuerpos completos incluyen aquellos con cadenas pesada y ligera que incluyen una región Fc. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (e.g., dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos. En algunos casos, el anticuerpo intacto puede tener una o más funciones de efector.

Un "fragmento de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente el enlace al antígeno y/o la región variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fab, Fab', $F(ab')_2$ y fragmentos Fv; diabodies; anticuerpos lineales (ver Patente de E.U. 5,641,870, Ejemplo 2: Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo monocatenario y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpo. La digestión de papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de enlace al antígeno llamados fragmentos "Fab, y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja su capacidad para cristalizarse fácilmente. El fragmento Fab consiste de una cadena L completa junto con el dominio de región variable de la cadena H (V_H) y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_H1). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto al enlace al antígeno, i.e., tiene un solo sitio de enlace al antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo produce un solo fragmento $F(ab')_2$ que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab enlazados por disulfuro que tienen diferente actividad de enlace al antígeno y aún son capaces de reticular el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por tener algunos residuos en la terminal carboxi del dominio C_H1 incluyendo una o más cisteínas de la región de articulación del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente

para Fab' en la cual el(los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes contienen un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de articulación entre los mismos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

El fragmento Fc comprende las porciones de terminal carboxi de ambas cadenas H mantenidos juntos mediante disulfuros. Las funciones de efector de los anticuerpos se determinan por las secuencias en la región Fc, la región que también se reconoce por los receptores de Fc (FcR) encontrados en ciertos tipos de células.

"Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de enlace al y de reconocimiento del antígeno. Este fragmento consiste de un dímero de un dominio de región variable de una cadena pesada y una ligera en estrecha asociación no covalente. A partir del doblamiento de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (3 bucles cada uno desde la cadena H y L) que contribuyen a los residuos de aminoácido para el enlace al antígeno y confieren especificidad de enlace al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres HVRs específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y enlazarse al antígeno, aunque a una afinidad más baja que el sitio de enlace completo.

"Fv monocatenario" también abreviado como "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo conectados en una sola cadena de polipéptidos. Preferentemente, el polipéptido scFv comprende además un enlazador de polipéptido entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para el enlace al antígeno. Para una revisión del sFv, ver, Pluckthün, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies (La farmacología de anticuerpos monoclonales) vol. 113, Rosenburg y Moore eds., (Springer-Verlag, New York; 1994), pp. 269-315 (1994).

Los "fragmentos funcionales" de los anticuerpos de la invención comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que incluye generalmente la región de enlace al antígeno o variable del anticuerpo intacto o la región Fc de un anticuerpo que retiene o que ha modificado su capacidad de enlace a FcR. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen anticuerpo lineal, moléculas de anticuerpo monocatenario y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpo.

El término "diabodies" se refiere a pequeños fragmentos de

anticuerpo preparados construyendo fragmentos sFv (ver el párrafo precedente) con enlazadores cortos (aproximadamente de 5 a 10 residuos) entre los dominios V_H y V_L de tal manera que se logra la formación de pares inter-cadena pero no intra-cadena de los dominios V, dando como resultado un fragmento bivalente, i.e., un fragmento que tiene dos sitios de enlace al antígeno. Los diabodies biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv de "cruce" en los cuales los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas de polipéptido. Los diabodies se describen en mayor detalle, por ejemplo, en la EP 404,097; la WO 93/01161; y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 90:6444-6448 (1993).

Los anticuerpos monoclonales en la presente incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con, u homóloga a las secuencias correspondientes en los 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 con u homólogo a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (Patente de E.U. No. 4,816,567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci EUA 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en la presente incluyen anticuerpos PRIMATIZED® en donde la región de enlace al antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido e.g., inmunizando monos macaco con el antígeno de interés. Como se utiliza en la presente "anticuerpo humanizado" se utiliza como un subconjunto de "anticuerpos quiméricos".

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (e.g., murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen mínima secuencia derivada de inmunoglobulina no humana. En una modalidad, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo recipiente) en la cual los residuos de una HVR (anteriormente definida) del recipiente se reemplazan por residuos de una HVR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como de ratón, rata, conejo, o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. En algunos ejemplos, los residuos de estructura ("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 recipiente o en el anticuerpo

donante. Estas modificaciones pueden efectuarse para refinar adicionalmente el desempeño del anticuerpo, tal como la afinidad de enlace. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno y, típicamente dos dominios variables en los cuales todos o sustancialmente todos los circuitos hipervariables corresponden a aquellos de una secuencia de inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana, aunque las regiones FR pueden incluir una o más sustituciones individuales del residuo de FR que mejoran el desempeño del anticuerpo, tal como la afinidad de enlace, la isomerización, la inmunogenicidad, etc. El número de estas sustituciones de aminoácido en la FR es típicamente de no más de 6 en la cadena H y, en la cadena L, no más de 3. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, ver, e.g., 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). Ver también, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol., 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions., 23:1035-1038 (1995); Hurle y Gross, Curr. Op. Biotech., 5:428-433 (1994); y Patentes de E.U. Nos. 6,982,321 y 7,087,409.

Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un humano y/o que se ha elaborado utilizando cualquiera de las técnicas para producir anticuerpos humanos como se describe en la presente. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de enlace al antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos pueden producirse utilizando diversas técnicas conocidas en la técnica incluyendo bibliotecas de despliegue de fago. 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 métodos descritos en Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (Anticuerpos monoclonales y terapia de cáncer), Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991). Ver también van Dijk y van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5:368-74 (2001). Los anticuerpos humanos pueden prepararse administrando el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir tales anticuerpos en respuesta a pruebas antigénicas, pero cuyos sitios endógenos se han deshabilitado, e.g., xeno-ratones inmunizados

(ver, e.g., Patentes de E.U. Nos. 6,075,181 y 6,150,584 referentes a la tecnología XENOMOUSE™). Ver también, por ejemplo, Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci., EUA 103:3557-3562 (2006) referente a anticuerpos humanos generados a través de una tecnología de hibridoma de célula B humana.

El término "región hipervariable", "HVR" o "HV", cuando se utiliza en la presente, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o que forman circuitos estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVRs; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). En anticuerpos nativos, H3 y L3 despliegan la mayor diversidad de las seis HVRs y se cree que H3 en particular juega un papel único en conferir especificidad fina a los anticuerpos. Ver, e.g., Xu et al., Immunity, 13:37-45 (2000); Johnson y Wu Methods in Molecular Biology, 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). Realmente, los anticuerpos camelid de origen natural que consisten de solo una cadena pesada son funcionales y estables en ausencia de la cadena ligera. Ver, e.g., Hamers-Casterman et al., Nature, 363:446-448 (1993) y Sheriff et al., Nature Struct. Biol., 3:733-736 (1996).

Un número de delineaciones de HVR están en uso y se abarcan en la presente. Las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las más comúnmente utilizadas (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (Secuencias de proteínas de interés inmunológico), 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Chothia se refiere por el contrario a la ubicación de los circuitos estructurales (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987)). Las HVRs de AbM representan un compromiso entre las HVRs Kabat y los circuitos estructurales Chothia y se utilizan por el software de modelado de anticuerpo AbM de Oxford Molecular. Las HVRs de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas del complejo disponibles. Los residuos de cada una de estas HVRs se anotan a continuación.

Circuito Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1 L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2 L50-L56	L50-L56	L-50-L52	L46-L55
L3 L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1 H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35
(Numeración Kabat)			
H1 H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35

(Numeración Chothia)			
H2 H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3 H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las HVRs pueden comprender "HVRs 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 de dominio variable están numerados de acuerdo con Kabat et al., supra, para cada una de estas definiciones.

La expresión "numeración del residuo de dominio variable como en Kabat" o "numeración de la posición de aminoácido como en Kabat" y variaciones de las mismas, se refiere al sistema de numeración utilizado para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat et al., supra. Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o adicionales correspondientes a un acortamiento de, o a una inserción en, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un solo inserto de aminoácido (residuo 52a de acuerdo con Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (e.g., los residuos 82a, 82b y 82c, etc., de acuerdo con Kabat) después del residuo 82 de FR de cadena pesada. La numeración Kabat de residuos puede determinarse para un anticuerpo dado mediante la alineación en las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada Kabat "estándar".

Los residuos de "estructura" o "FR" son aquellos residuos de dominio variable diferentes a los residuos de HVR como se definen en la presente.

Una "estructura de consenso humana" o "estructura humana aceptor" es una estructura que representa los residuos de aminoácido que se presentan más comúnmente en una selección de secuencias marco VL o VH de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest., 5ª edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Los ejemplos incluyen para el VL, el subgrupo que puede ser el subgrupo kappa I, kappa II, kappa III o kappa IV como en Kabat et al., supra. Adicionalmente, para el VH, el

subgrupo puede ser el subgrupo I, el subgrupo II o el subgrupo III como en Kabat et al., supra. Alternativamente, una estructura de consenso humana puede derivarse de las anteriores en los residuos particulares, tal como cuando se selecciona un residuo de estructura humana en base a su homología para la estructura donante, alineándose a la secuencia marco donante con una recolección de varias secuencias marco humana. Una estructura humana aceptor "derivada de" una estructura de inmunoglobulina humana o de una estructura de consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma o puede contener cambios de secuencia de aminoácidos pre-existentes. En algunas modalidades, el número de cambios de aminoácido pre-existentes es de 10 o menos, 9 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos.

Una "estructura de consenso del subgrupo III de VH" comprende la secuencia de consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo III pesado variable de Kabat et al., supra. En una modalidad, la secuencia de aminoácidos de estructura de consenso del subgrupo III de VH comprende al menos una porción de todas de cada una de las siguientes secuencias: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (HC-FR1) (SEQ ID NO: 4), WVRQAPGKGLEWV (HC-FR2) (SEQ ID NO: 5), RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (HC-FR3) (SEQ ID NO: 6), WGQGTLVTVSA (HC-FR4) (SEQ ID NO: 7).

Una "estructura de consenso kappa I de VL" comprende la secuencia de consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo I kappa ligero variable de Kabat et al., supra. En una modalidad, la secuencia de aminoácidos de estructura de consenso del subgrupo I de VH comprende al menos una porción de todas de cada una de las siguientes secuencias: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (LC-FR1) (SEQ ID NO: 11), WYQQKPGKAPKLLIY (LC-FR2) (SEQ ID NO: 12), GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (LC-FR3) (SEQ ID NO: 13), FGQGTKVEIKR (LC-FR4) (SEQ ID NO: 14).

Una "modificación de aminoácido" en una posición especificada, e.g., de la región Fc, se refiere a la sustitución o supresión del residuo especificado o la inserción de al menos un residuo de aminoácido adyacente al residuo especificado. La inserción "adyacente" a un residuo especificado significa la inserción dentro de uno a dos residuos del mismo. La inserción puede ser de terminal N o de terminal C al residuo especificado. La modificación de

aminoácidos preferida en la presente es una sustitución.

Un anticuerpo "madurado por afinidad" es uno con una o más alteraciones en una o más de sus HVRs lo cual da como resultado un mejoramiento en la afinidad del anticuerpo para el antígeno, en comparación con un anticuerpo de origen que no posee esa(s) alteración(es). En una modalidad, un anticuerpo madurado por afinidad tiene afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno objetivo. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992) describen la maduración por afinidad mediante arrastre del dominio VH y VL. La mutagénesis aleatoria de HVR y/o de los residuos de estructura se describe, por ejemplo, por: Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 91:3809-3813 (1994); Schier et al., Gene, 169:147-155 (1995); Yelton et al., J. Immunol., 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol., 154(7):3310-3319 (1995); y Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992).

Como se utiliza en la presente, el término "se enlaza específicamente a" o es "específico para" se refiere a interacciones medibles y reproducibles tales como el enlace entre un objetivo y un anticuerpo, que determina la presencia del objetivo en presencia de una población heterogénea de moléculas que incluyen moléculas biológicas. Por ejemplo, un anticuerpo que se enlaza específicamente a un objetivo (que puede ser un epítope) es un anticuerpo que se enlaza a este objetivo con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración de lo que se enlaza a otros objetivos. En una modalidad, el grado de enlace de un anticuerpo a un objetivo no relacionado es menos que aproximadamente 10% del enlace del anticuerpo al objetivo medido, e.g., mediante un radioinmunoanálisis (RIA). En ciertas modalidades, un anticuerpo que se enlaza específicamente a un objetivo tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq$ 1 µM, $\leq$ 100 nM, $\leq$ 10 nM, $\leq$ 1 nM, o $\leq$ 0.1 nM. En ciertas modalidades, un anticuerpo se enlaza específicamente a un epítope en una proteína conservada entre las proteínas de diferentes especies. En otra modalidad, el enlace específico puede incluir, pero no requiere, enlace exclusivo.

Un anticuerpo de "bloqueo" o un anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce una actividad biológica del antígeno al que se enlaza. En algunas modalidades, 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 a fin de restaurar una respuesta funcional por las células T de un estado disfuncional a

una estimulación del antígeno.

Un "agonista" o anticuerpo de activación es uno que mejora o inicia la señalización por el antígeno al cual se enlaza. En algunas modalidades, los anticuerpos agonistas ocasionan o activan la señalización sin la presencia del ligando natural.

El término "fase sólida" describe una matriz no acuosa a la cual puede adherirse el anticuerpo de la presente invención. Ejemplos de fases sólidas abarcadas en la presente incluyen aquellas formadas parcial o totalmente de vidrio (e.g., vidrio de poro controlado), polisacáridos (e.g., agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En ciertas modalidades, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pozo de una placa de ensayo; en otras, es una columna de purificación (e.g., una columna de cromatografía de afinidad). Este término incluye también una fase sólida discontinua de partículas discretas, tales como las descritas en la Patente de E.U. No. 4,275,149.

Las "funciones efectoras de anticuerpo" se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo, y varían con el isotipo del anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: enlace de Clq y citotoxicidad dependiente del complemento; enlace del receptor Fc; citotoxicidad mediada por la célula dependiente del anticuerpo (ADCC); fagocitosis; sub-regulación de receptores de superficie celular (e.g., receptores de célula B); y la activación de célula B. La función efectora de anticuerpo "reducida o minimizada" significa que está reducida por al menos 50% (alternativamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) del anticuerpo de tipo silvestre o no modificado. La determinación de la función efectora del anticuerpo se determina y se mide fácilmente por el de experiencia ordinaria en la técnica. En una modalidad preferida, se afectan las funciones efectoras del anticuerpo de enlace al complemento, citotoxicidad dependiente del complemento y citotoxicidad dependiente del anticuerpo. En algunas modalidades de la invención, la función efectora se elimina a través de una mutación en la región constante que eliminó la glicosilación, e.g., "mutación sin efector". En un aspecto, la mutación sin efector es una mutación N297A o DANA (D265A ´N297A) en la región CH2. Shields et al., J. Biol. Chem., 276 (9): 6591-6604 (2001). Alternativamente, las mutaciones adicionales que dan como resultado una función efectora reducida o eliminada incluyen: K322A y L234A/L235A (LALA). Alternativamente, la función efectora puede reducirse o eliminarse a través de

técnicas de producción, tales como la expresión en células huésped que no se glicosilan (e.g., E. coli) o en las cuales resulta un patrón de glicosilación alterado que no es efectivo o es menos efectivo en la promoción de la función efectora (e.g., Shinkawa et al., J. Biol. Chem., 278(5): 3466-3473 (2003).

La "citotoxicidad mediada por la célula dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la cual la Ig secretada enlazada sobre receptores Fc (FcRs) presentes en ciertas células citotóxicas (e.g., células destructoras naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se enlacen específicamente a una célula objetivo que contiene el antígeno y subsecuentemente destruyan la célula objetivo con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" a las células citotóxicas y se requieren para la destrucción de la célula objetivo mediante este mecanismo. Las células primarias para mediar la ADCC, células NK, expresan solamente FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de Fc en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-492 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede llevarse a cabo un análisis ADCC in vitro, tal como el descrito en la Patente de E.U. No. 5,500,362, o 5,821,337. Las células efectoras útiles para tales análisis incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células destructoras naturales (NK). Alternativamente o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse in vivo, e.g., en un modelo animal tal como el descrito en Clynes et al., PNAS EUA, 95:652-656 (1998).

A menos que se indique de otra manera en la presente, la numeración de los residuos en una cadena pesada de inmunoglobulina es la del índice EU como en Kabat et al., supra. El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo EU de IgG1 humana.

El término "región Fc" en la presente se utiliza para definir una región de terminal C de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo las regiones Fc de secuencia nativa y las regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana se define comúnmente para estirarse desde un residuo de aminoácidos en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta la terminal carboxilo de la misma. La lisina de terminal C (residuo 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc puede retirarse, por ejemplo, durante la producción o la purificación del anticuerpo, o fabricando de manera

recombinante el ácido nucleico que codifica para una cadena pesada del anticuerpo. Por consiguiente, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los residuos K447 retirados, poblaciones de anticuerpos sin ningún residuo K447 retirado, y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447. Las regiones Fc de secuencia nativa adecuadas para su uso en los anticuerpos de la invención incluyen IgG1, IgG2 (IgG2Am IgG2B), IgG3 e IgG4 humana.

"Receptor Fc" o "FcR" describe un receptor que se enlaza a la región Fc de un anticuerpo. La FcR preferida es una FcR humana de secuencia nativa. Además, una FcR preferida es una que se enlaza a un anticuerpo de IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases de FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas alternativamente separadas de esos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor de activación") y FcγRIIB (un "receptor de inhibición"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo de activación en base al inmunorreceptor de tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor de inhibición FcγRIIB contiene un motivo de inhibición en base al inmunorreceptor de tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (ver, e.g., Daëron, Annu. Rev. Immuno., 15-203-234 (1997). Las FcRs se revisan, por ejemplo, en Ravetech y Kinet, Annu. Rev. Immuno., 9:457-92 (1991), Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); y de Hass et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995). Otras FcRs, incluyendo aquellas que van a identificarse en el futuro, están abarcadas por el término "FcR" en la presente.

El término "receptor Fc" o "FcR" también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgGs maternas al feto (Guyer et al., J. Immunol., 117:587 (1976) y Kim et al., J. Immunol., 24:249 (1994)). Se conocen métodos para medir el enlace a FcRn (ver, e.g., Ghetie y Ward, Immunol. Today, 18 (12):592-8 (1997); Ghetie et al., Nature Biotechnology, 15 (7):637-40 (1997); Hinton et al., J. Biol. Chem., 279(8):6213-6 (2004); WO 2004/92219 (Hinton et al.). El enlace a FcRn humano in vivo y la vida media en suero de los polipéptidos de enlace de alta afinidad a FcRn humana pueden analizarse, e.g., en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humana, o en primates a los cuales se administran los polipéptidos con una región Fc variante. La WO 2000/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpo con enlace mejorado o disminuido a FcRs. Ver también, e.g., Shields et al., J.

Biol. Chem., 9(2): 6591-6604 (2001).

Las "células efectoras" son leucocitos que expresan uno o más FcRs y llevan a cabo funciones de efector. En un aspecto, las células expresan al menos FcγRIII y llevan a cabo función(es) de efector ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células destructoras naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa, e.g., de sangre. Las células efectoras son generalmente linfocitos asociados con la fase efectora y funcionan para producir citosinas (células Y auxiliares), para destruir células infectadas con patógenos (células T citotóxicas) o para secretar anticuerpos (células B diferenciadas).

La "citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula objetivo en presencia de complemento. La activación de la trayectoria de complemento clásica se inicia por el enlace del primer componente del sistema de complemento (Clq) a anticuerpos (de la subclase apropiada), que están enlazados a su antígeno cognado. Para evaluar la activación de complemento puede llevarse a cabo un análisis CDC, e.g., como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996). Las variantes de polipéptido con secuencias de aminoácidos de región Fc alterada y capacidad de enlace a Clq aumentada o disminuida se describen, e.g., en la Patente de E.U. No. 6,194,551 y WO 99/51642. Los contenidos de estas publicaciones de patente se incorporan específicamente en la presente mediante la referencia. Ver también, e.g., Idusogie et al., J. Immunol. 164:4178-4184 (2000).

El sitio de glicosilación en IgG está en Asn297 en el dominio CH2. La presente invención proporciona también composiciones de un anticuerpo humanizado de enlace al antígeno que tienen una región Fc con reducida o ninguna función efectora. Una manera en la cual esto puede lograrse es una sustitución A297N, que ha demostrado previamente abolir el enlace al complemento y la función efectora ("mutante de Fc sin efector") en un anticuerpo anti-CD20. Idusogie et al., supra. Como resultado de esta mutación, la producción de anticuerpos anti-PD-L1 de la presente invención que contiene esta mutación Fc en células de mamífero tales como CHO, no tendrá ninguna glicosilación y a su vez da como resultado una reducida o mínima función efectora. Alternativamente, la función efectora del anticuerpo puede eliminarse sin sustitución de CH2 mediante la expresión en células no mamífero tales como E. coli.

"Afinidad de enlace" se refiere generalmente a la resistencia de la suma total de interacciones no covalentes entre un sitio único de enlace de una molécula (e.g., un anticuerpo) y su socio de enlace (e.g., un antígeno). A menos que se indique de otra manera, como se utiliza en la presente, "afinidad de enlace" se refiere a la afinidad de enlace intrínseca que refleja una interacción de 1:1 entre los miembros de un par de enlace (e.g., anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X para su socio Y puede representarse generalmente por medio de la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse mediante métodos comunes conocidos en la técnica incluyendo los descritos en la presente. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se enlazan al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad se enlazan generalmente al antígeno más rápido y tienden a permanecer enlazados más tiempo. Se conoce en la técnica una variedad de métodos para medir la afinidad de enlace, de los cuales cualquiera puede utilizarse para los propósitos de la presente invención. Las modalidades ilustrativas y ejemplares específicas para medir la afinidad de enlace se describen en lo siguiente.

"Kd" o "valor Kd" de acuerdo con esta invención, se mide, en una modalidad, mediante un ensayo de enlace al antígeno radioetiquetado (RIA) llevado a cabo con la versión Fab del anticuerpo y la molécula antígeno como se describe por el siguiente ensayo que mide la afinidad de enlace de la solución de Fabs por el antígeno equilibrando el Fab con una mínima concentración de antígeno etiquetado (^{125}I) en presencia de una serie de titulación de antígeno no etiquetado, después capturando el antígeno enlazado con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (Chen et al., (1999) J. Mol. Biol., 293:865-881). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren durante la noche las placas de microtitulación (DINEX) con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en 50 mM de carbonato de sodio (pH 9.6) y subsecuentemente se bloquean con albúmina de suero bovino al 2% (peso/volumen) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no adsorbente (Nunc #269620), 100 pM o 26 pM de antígeno [^{125}I] se mezclaron con diluciones en serie de un Fab de interés (consistente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., (1997) Cancer Res., 57:4593-4599). El Fab de interés se incuba entonces durante la noche, sin embargo, la incubación puede continuar durante un período más largo (e.g., 65 horas) para asegurar que se logre el equilibrio. Enseguida, las mezclas se transfieren a la placa de captura para su incubación a temperatura

ambiente durante una hora. La solución se retira entonces y la placa se lava ocho veces con surfactante TWEEN-20 al 0.1% en PBS. Cuando las placas se han secado, se agregan 150 µl/pozo de escintilador (MICROSCINT-20, Packard), y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que dan menos que o igual a 20% de enlace máximo se eligen para su uso en ensayos de enlace competitivo.

De acuerdo con otra modalidad, el Kd se mide utilizando ensayos de resonancia de plasmón de superficie utilizando un instrumento BIACORE®-2000 o BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 de antígeno inmovilizados a -10 unidades de respuesta (RU). Brevemente, se activan chips de biosensor de dextrano carboximetilados (CM5, BIAcore, Inc.) con hidrocloruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con 10 mM de acetato de sodio, pH 4.8, a 5 µg/ml (-0.2 µM) antes de la inyección a una tasa de flujo de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente diez unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta 1 M de etanolamina para bloquear los grupos no reactivados. Para las mediciones de cinética, se inyectan diluciones seriales de dos veces de Fab (de 0.78 nM a 500 nM) en PBS con surfactante TWEEN20™ al 0.05% (PBST) a 25°C a una tasa de flujo de aproximadamente 25 µl/minuto. Las tasas de asociación (k_{on}) y las tasas de disociación (k_{off}) se calculan utilizando un modelo de enlace Langmuir simple de uno-a-uno (BIAcore® Evaluation Software versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (Kd) se calcula como la relación k_{off}/k_{on}. Ver, e.g., Chen et al., J. Mol. Biol., 293:865-881 (1999). Si la tasa on excede 10^6 $M^{-1}s^{-1}$ por medio del ensayo de resonancia de plasmón de superficie anterior, entonces la tasa on puede determinarse utilizando una técnica de extinción fluorescente que mide el incremento o la disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm de paso de banda) a 25°C de un 20 nM de anticuerpo anti-antígeno (forma Fab) en PBS, pH 7.2, en presencia de concentraciones en incremento de antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrómetro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cuba agitada.

Una "tasa on", "tasa de asociación", "tasa de asociación" o "k_{on}" de

acuerdo con esta invención, también puede determinarse como se describió anteriormente utilizando un sistema BIACORE®-2000 o BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 de antígeno inmovilizados aproximadamente a 10 unidades de respuesta (RU). Brevemente, se activan chips de biosensor de dextrano carboximetilados (CM5, BIAcore, Inc.) con hidrocloruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con 10 mM de acetato de sodio, pH 4.8, a 5 mg/ml (=0.2 mM) antes de la inyección a una tasa de flujo de 5 ml/minuto para lograr aproximadamente diez unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta 1 M de etanolamina para bloquear los grupos no reactivados. Para las mediciones de cinética, se inyectan diluciones seriales de dos veces de Fab (de 0.78 nM a 500 nM) en PBS con surfactante TWEEN 20 (PBST) al 0.05% (PBST) a 25°C a una tasa de flujo de aproximadamente 25 µl/minuto. Las tasas de asociación (k_{on}) y las tasas de disociación (k_{off}) se calculan utilizando un modelo de enlace Langmuir simple de uno-a-uno (BIAcore® Evaluation Software versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (Kd) se calculó como la relación k_{off}/k_{on}. Ver, e.g., Chen et al., (1999) J. Mol. Biol., 293:865-881. Sin embargo, si la tasa on excede 10^6 $M^{-1}s^{-1}$ por medio del ensayo de resonancia de plasmón de superficie anterior, entonces la tasa on se determina preferentemente utilizando una técnica de extinción fluorescente que mide el incremento o la disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm de paso de banda) a 25°C de un 20 nM de anticuerpo anti-antígeno (forma Fab) en PBS, pH 7.2, en presencia de concentraciones en incremento de antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrómetro SLM-AMINCO serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cuba agitada.

La frase "sustancialmente reducido" o "sustancialmente diferente", como se utiliza en la presente, denota un grado de diferencia suficientemente alto entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado con una molécula y el otro asociado con una molécula de referencia/comparadora) de tal manera que el experto en la técnica consideraría que la diferencia entre los dos valores es de significancia estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (e.g., los valores Kd). La diferencia entre dichos dos valores,

por ejemplo, es mayor que aproximadamente 10%, mayor que aproximadamente 20%, mayor que aproximadamente 30%, mayor que aproximadamente 40% y/o mayor que aproximadamente 50%, como una función del valor de la molécula de referencia/comparadora.

El término "sustancialmente similar" o "sustancialmente el mismo" como se utiliza en la presente, denota un grado de similitud suficientemente alto entre dos valores numéricos (por ejemplo, uno asociado con un anticuerpo de la invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparador), de tal manera que el experto en la técnica consideraría que la diferencia entre los dos valores es de poca o ninguna significancia biológica y/o estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (e.g., los valores Kd). La diferencia entre dichos dos valores, por ejemplo, es menor que aproximadamente 50%, menor que aproximadamente 40%, menor que aproximadamente 30%, menor que aproximadamente 20%, y/o menor que aproximadamente 10%, como una función del valor de referencia/comparador.

"Identidad porcentual (%) de secuencia de aminoácidos" y "homología" con respecto a una secuencia de péptidos, polipéptidos o anticuerpos, se definen como el porcentaje de residuos de aminoácido en una secuencia candidato que son idénticos a los residuos de aminoácido en la secuencia de péptidos o polipéptidos específica, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr la máxima identidad porcentual de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación para propósitos de determinar la identidad porcentual de secuencia de aminoácidos, puede lograrse de varias formas que están en la capacidad de la técnica, por ejemplo, utilizando software públicamente disponible tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o MEGALIGN™ (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la máxima alineación sobre la longitud total de las secuencias que se comparan. Para los propósitos en la presente, sin embargo, los valores % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan utilizando el programa computarizado de comparación de secuencia ALIGN-2, de la autoría de Genentech Inc. El código de fuente de ALIGN-2 se ha presentado con la documentación del usuario en la U.S. Copyright Office, Washington, D.C., 20559, en donde está registrado bajo el U.S. Copyright Registration No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible a través de Genentech, Inc.,

South San Francisco, California. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencia se establecen mediante el programa ALING-2 y no varían.

En situaciones en las que se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencia de aminoácidos, la identidad % de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada a, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada (que alternativamente puede frasearse como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende cierta identidad % de secuencia de aminoácidos a, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula como sigue:

100 veces la fracción X/Y

en donde X es el número de residuos de aminoácido valorados como igualaciones idénticas por el programa de alineación de secuencia ALIGN-2 en la alineación de A y B de ese programa, y en donde Y es el número total de residuos de aminoácido en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, la identidad % de secuencia de aminoácidos de A a B no será igual a la identidad % de secuencia de aminoácidos de B a A.

A menos que se defina específicamente de otra manera, todos los valores de identidad % de secuencia de aminoácidos utilizados en la presente se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente utilizando el programa de computadora ALIGN-2.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" que codifica para los anticuerpos en la presente, es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la cual se asocia comúnmente en el ambiente en el que se produjo. Preferentemente, el ácido nucleico aislado está libre de asociación con todos los componentes asociados con el ambiente de producción. Las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican para los polipéptidos y anticuerpos en la presente están en una forma diferente a la forma o colocación en la cual se encuentran en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico aisladas, por tanto, se distinguen del ácido nucleico que codifica para los polipéptidos y anticuerpos en la presente que existen naturalmente en las células.

El término "secuencias de control" se refiere a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia de codificación

operablemente enlazada en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de enlace de ribosoma. Se sabe que las células eucarióticas utilizan promotores, señales de poliadenilación, y mejoradores.

El ácido nucleico está "operablemente enlazado" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para un guía de pre-secuencia o secretor está operablemente enlazado al ADN para un polipéptido si éste se expresa como una pre-proteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o mejorador está operablemente enlazado a una secuencia de codificación si éste afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de enlace al ribosoma está operablemente enlazado a una secuencia de codificación si éste está colocado a fin de facilitar la translación. Generalmente, "operablemente enlazado" significa que las secuencias de ADN que se enlazan son contiguas y, en el caso de un guía secretorio, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los mejoradores no tienen que estar contiguos. El enlace se logra mediante la ligación en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, los adaptadores o enlazadores de oligonucleótido sintético se utilizan de acuerdo con la práctica convencional.

El término "etiquetado por epítope" cuando se utiliza en la presente, se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido o anticuerpo descrito en la presente fusionado a un "polipéptido etiqueta". El polipéptido etiqueta tiene suficientes residuos para proporcionar un epítope contra el cual puede producirse un anticuerpo, y sin embargo es suficientemente corto para no interferir con la actividad del polipéptido al cual se fusiona. El polipéptido etiqueta también es preferentemente bastante único de manera que el anticuerpo no tiene una reacción cruzada sustancialmente con otros epítopes. Los polipéptidos etiqueta tienen generalmente al menos seis residuos de aminoácido y comúnmente entre aproximadamente 8 y 50 residuos de aminoácido (preferentemente, entre aproximadamente 10 y 20 residuos de aminoácido).

Como se utiliza en la presente el término "inmunoadhesina" designa moléculas similares al anticuerpo que combinan la especificidad de enlace de una proteína heteróloga (una "adhesión") con las funciones efectoras de los dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de enlace deseada que es diferente al reconocimiento de antígeno y al sitio de enlace

de un anticuerpo (i.e., es "heteróloga") y a una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte adhesina de una molécula de inmunoadhesina es típicamente una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de enlace de un receptor o un ligando. La secuencia de dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina puede obtenerse de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2 (incluyendo IgG2A e IgG2B), IgG-3, o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1, e IgA-2), IgE, IgD o IgM. Las fusiones de Ig incluyen preferentemente la sustitución de un dominio de un polipéptido o anticuerpo descrito en la presente en el lugar de al menos una región variable dentro de una molécula de Ig. En una modalidad particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulina incluye las regiones de articulación CH2 y CH3 o de articulación CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulina ver también la Patente de E.U. No. 5,428,130 expedida en Junio 27 de 1995. Por ejemplo, las inmunoadhesinas útiles como segundos medicamentos útiles para terapias de combinación en la presente incluyen polipéptidos que comprenden las porciones extracelulares o de enlace a PD-1 de PD-L1 o PD-L2, o viceversa, fusionadas a un dominio constante de una secuencia de inmunoglobulina.

Una "proteína de fusión" y un "polipéptido de fusión" se refieren a un polipéptido que tiene dos porciones covalentemente enlazadas entre sí, en donde cada una de las porciones es un polipéptido que tiene una propiedad diferente. La propiedad puede ser una propiedad biológica, tal como la actividad in vitro o in vivo. La propiedad también puede ser una simple propiedad química o física, tal como el enlace a una molécula objetivo, la catálisis de una reacción, etc. Las dos porciones pueden estar enlazadas directamente por un solo enlace de péptido o, a través de un enlazador de péptido, estarán en un marco de lectura una con la otra.

Una formulación "estable" es una en la cual la proteína en la misma retiene esencialmente su estabilidad e integridad física y química al almacenarse. Están disponibles en la técnica diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad de proteínas y se revisan en Peptide and Protein Drug Delivery (Suministro de fármacos de péptido y proteína) 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York, Publicaciones (1991) y Jones A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). La estabilidad puede medirse a una temperatura seleccionada durante un período de tiempo seleccionado. Para una rápida selección, la formulación puede mantenerse a 40°C durante 2 semanas a 1 mes, momento en el cual se mide la estabilidad. Cuando la formulación va a

almacenarse de 2 a 8°C, generalmente la formulación debe ser estable a 30°C o 40°C durante al menos 1 mes y/o estable a 2-8°C durante al menos 2 años. Cuando la formulación va a almacenarse a 30°C, generalmente la formulación debe ser estable durante al menos 2 años a 30°C y/o estable a 40°C durante al menos 6 meses. Por ejemplo, puede utilizarse el grado de agregación durante el almacenamiento como un indicador de la estabilidad de la proteína. Por tanto, una formulación "estable" puede ser una en donde esté presente menos de aproximadamente 10% y preferentemente menos de aproximadamente 5% de la proteína como un agregado en la formulación. En otras modalidades, puede determinarse cualquier incremento en la formación del agregado durante el almacenamiento de la formulación.

Una formulación "reconstituida" es una que se ha preparado disolviendo una formulación de proteína liofilizada o anticuerpo en un diluyente de manera que la proteína se disperse a través de la misma. La formulación reconstituida es adecuada para su administración (e.g., administración subcutánea) a un paciente para tratarse con la proteína de interés y, en ciertas modalidades de la invención, puede ser una que es adecuada para la administración parenteral o intravenosa.

Una formulación "isotónica" es una que tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas tendrán generalmente una presión osmótica de aproximadamente 250 a 350 mOsm. El término "hipotónica" describe una formulación con una presión osmótica por debajo de la de la sangre humana. Correspondientemente, el término "hipertónica" se utiliza para describir una formulación con una presión osmótica por arriba de la de la sangre humana. La isotonicidad puede medirse utilizando, por ejemplo, un osmómetro del tipo de presión de vapor o de congelamiento. Las formulaciones de la presente invención son hipertónicas como resultado de la adición de sal y/o amortiguador.

"Vehículos" como se utiliza en la presente, incluyen vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que son no tóxicos a la célula o al mamífero que se expone a los mismos en las dosis y a las concentraciones empleadas. Frecuentemente, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa de pH amortiguado. Ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen amortiguadores tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menor que aproximadamente 10 residuos); proteínas tales

como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o surfactantes no iónicos tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.

Un "inserto de empaque" se refiere a las instrucciones que se acostumbra incluir en los empaques comerciales de medicamentos, que contienen información acerca de las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones, otros medicamentos que se combinan con el producto empacado y/o advertencias referentes al uso de tales medicamentos, etc.

Un "ácido farmacéuticamente aceptable" incluye ácidos inorgánicos y orgánicos que son no tóxicos a la concentración y en la forma en la cual se formulan. Por ejemplo, los ácidos inorgánicos adecuados incluyen clorhídrico, perclórico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, sulfúrico, sulfónico, sulfínico, sulfanílico, fosfórico, carbónico, etc. Los ácidos orgánicos adecuados incluyen de alquilo de cadena recta o ramificada, aromático, cíclico, cicloalifático, arilalifático, heterocíclico, saturado, no saturado, mono, di y tri-carboxílico, incluyendo por ejemplo, fórmico, acético, 2-hidroxiacético, trifluoroácético, fenilacético, trimetilacético, t-butil acético, antranílico, propanoico, 2-hidroxipropanoico, 2-oxopropanoico, propandioico, ciclopentanopropiónico, ciclopentano propiónico, 3-fenilpropiónico, butanoico, butandioico, benzoico, 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, 2-acetoxi-benzoico, ascórbico, cinámico, lauril sulfúrico, esteárico, mucónico, mandélico, succínico, embónico, fumárico, málico, maleico, hidroximaleico, malónico, láctico, cítrico, tartárico, glicólico, glicónico, glucónico, pirúvico, glioxálico, oxálico, mesílico, succínico, salicílico, ftálico, palmoico, palméico, tiociánico, metanosulfónico, etanosulfónico, 1,2-etanodisulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, bencenosulfónico, 4-clorobencenosulfónico, naftaleno-2-sulfónico, p-toluenosulfónico, canforsulfónico, 4-metilbiciclo[2,2,2]-oct-2-eno-1-carboxílico, glucoheptónico, ácido 4,4'-metilenobis-3-(hidroxi-2-eno-1-carboxílico), hidroxinaftoico.

"Bases farmacéuticamente aceptables" incluyen bases inorgánicas y orgánicas que son no tóxicas a la concentración y en la forma en la cual se formulan. Por ejemplo, las bases adecuadas incluyen aquellas formadas a partir de metales formadores de base inorgánica tales como litio, sodio, potasio,

magnesio0, calcio, amonio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio, N-metilglucamina, morfolina, piperidina y bases orgánicas no tóxicas incluyendo, aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio de ion, [e.g., $N(R')_4^+$ (en donde R' es independientemente H o alquilo C_{1-4}, e.g., amonio, Tris)], por ejemplo, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dietilaminoetanol, trimetamina, diciclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilenodiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, resinas de poliamina y lo similar. Las bases orgánicas no tóxicas particularmente preferidas son isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetamina, diciclohexilamina, colina y cafeína. Los ácidos y bases farmacéuticamente aceptables útiles con la presente invención incluyen aquellos derivados de los aminoácidos, por ejemplo, histidina, glicina, fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y asparagina.

Los amortiguadores y sales "farmacéuticamente aceptables" incluyen aquellos derivados de sales de adición tanto de ácido como de base de los ácidos y bases anteriormente indicados. Los amortiguadores y/o sales específicos incluyen histidina, succinato y acetato.

Un "azúcar farmacéuticamente aceptable" es una molécula que, cuando se combina con una proteína de interés, previene o reduce significativamente la inestabilidad química y/o física de la proteína a su almacenamiento. Cuando la formulación está destinada para liofilizarse y después reconstituirse, los "azúcares farmacéuticamente aceptables" también pueden conocerse como "lioprotectores". Los azúcares ejemplares y sus correspondientes alcoholes de azúcar incluyen: un aminoácido tal como glutamato monosódico o histidina; una metilamina tal como betaína; una sal liotrópica tal como sulfato de magnesio; un poliol tal como alcoholes de azúcar trihídricos o de más alto peso molecular, e.g., glicerina, dextrano, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol, y manitol: propilenglicol; polietilenglicol; PLURONICS®; y combinaciones de los mismos. Los lioprotectores ejemplares adicionales incluyen glicerina y gelatina y los azúcares melibiosa, melezitosa, rafinosa, manotriosa y estaquiosa. Ejemplos de azúcares de reducción incluyen glucosa, maltosa, lactosa, maltulosa, iso-maltulosa y lactulosa. Ejemplos de azúcares no reductores incluyen glicósidos no reductores de compuestos de polihidroxi seleccionados de alcoholes de azúcar y otros polialcoholes de cadena recta. Los alcoholes de azúcar preferidos son

monoglicósidos, especialmente aquellos compuestos obtenidos mediante la reducción de disacáridos tales como lactosa, maltosa, lactulosa y maltulosa. El grupo del lado glicosídico puede ser ya sea glucosídico o galactosídico. Ejemplos adicionales de alcoholes de azúcar son glucitol, maltitol, lactitol e iso-maltulosa. Los azúcares farmacéuticamente aceptables preferidos se agregan a la formulación en una "cantidad protectora" (e.g., pre-liofilización) lo cual significa que la proteína esencialmente retiene su estabilidad e integridad física y química durante el almacenamiento (e.g., después de su reconstitución y almacenamiento).

El "diluyente" de interés en la presente es uno que es farmacéuticamente aceptable (seguro y no tóxico para su administración a un humano) y que es útil para la preparación de una formulación líquida, tal como una formulación reconstituida después de la liofilización. Los diluyentes ejemplares incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWFI), una solución de pH amortiguado (e.g., salina amortiguada con fosfato), una solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa. En una modalidad alternativa, los diluyentes pueden incluir soluciones acuosas de sales y/o amortiguadores.

Un "conservador" es un compuesto que puede agregarse a las formulaciones en la presente para reducir la actividad bacteriana. La adición de un conservador, por ejemplo, puede facilitar la producción de una formulación multi-usos (de dosis múltiple). Ejemplos de conservadores potenciales incluyen cloruro de octadecildimetilbencil amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en los cuales los grupos alquilo son compuestos de cadena larga) y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservadores incluyen alcoholes aromáticos tales como fenol, alcohol butílico y bencílico, alquil parabenos tales como metil o propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol, y m-cresol. El conservador más preferido en la presente es alcohol bencílico.

"Tratamiento" se refiere a una intervención clínica diseñada para alterar el curso natural del individuo o célula que se trata, y puede llevarse a cabo ya sea por profilaxis o durante el curso de una patología clínica. Los efectos de tratamiento deseables incluyen evitar la ocurrencia o recurrencia de la enfermedad, evitar la metástasis, disminuir la tasa de progresión de la enfermedad, mejorar o paliar el estado de la enfermedad y la remisión o prognosis mejorada. En algunas modalidades, los anticuerpos de la invención se utilizan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno. Un sujeto se "trata" con

éxito, por ejemplo, utilizando los anticuerpos anti-PD-L1 apoptóticos de la invención si se mitigan uno o más de los síntomas asociados con un trastorno disfuncional de células T.

Una "cantidad efectiva" se refiere a al menos una cantidad efectiva, en las dosis y por períodos de tiempo necesarios, para lograr el efecto deseado o indicado, incluyendo un resultado terapéutico o profiláctico. Por ejemplo, una cantidad efectiva de los anticuerpos anti-PD-L1 de la presente invención es al menos la concentración mínima que da como resultado la inhibición de la señalización de PD-L1, ya sea a través de PD-1 en las células T o de B7.1 en otras APCsd o ambas.

Una "cantidad terapéuticamente efectiva" es al menos la concentración mínima requerida para efectuar una mejoría o prevención medible de un trastorno particular. Una cantidad terapéuticamente efectiva en la presente puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo, y el peso del paciente, y con la capacidad del anticuerpo para emitir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva es una en la cual cualquier efecto tóxico o dañino del anticuerpo se compensa por los efectos terapéuticos benéficos. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente efectiva de los anticuerpos anti-PD-L1 de la presente invención es al menos la concentración mínima que da como resultado la inhibición de al menos un síntoma de un trastorno disfuncional de células T.

Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en las dosis y por períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Por ejemplo, una cantidad profilácticamente efectiva de los anticuerpos anti-PD-L1 de la presente invención es al menos la concentración mínima que evita o atenúa el desarrollo de al menos un síntoma de un trastorno disfuncional de células T.

Administración "crónica" se refiere a la administración de el(los) medicamento(s) en un modo continuo opuesto al agudo, a fin de mantener el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un extenso período de tiempo. Administración "intermitente" es un tratamiento que no se efectúa consecutivamente sin interrupción, sino que es de naturaleza cíclica.

"Mamífero" para los propósitos de tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero incluyendo humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, para deportes o mascotas, tales como perros, caballos, conejos, ganado, cerdos, hámster, gerbos, ratones, hurones, ratas,

gatos, etc. Preferentemente, el mamífero es humano.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en forma tal que permite que la actividad biológica del ingrediente activo sea efectiva y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos a un sujeto al cual se administra la formulación. Tales formulaciones son estériles.

Una formulación "estéril" es aséptica o está libre de microorganismos vivientes y sus esporas.

El término "aproximadamente" como se utiliza en la presente, se refiere al rango común de error para el valor respectivo fácilmente conocido por la persona experta en este campo técnico.

Un "trastorno autoinmune" es una enfermedad o trastorno que surge de y se dirige contra los tejidos u órganos propios del individuo o una co-segregación o manifestación de la misma o una condición resultante de la misma. Las enfermedades autoinmunes pueden ser una enfermedad específica de un órgano (i.e., la respuesta inmune se dirige específicamente contra un sistema de órganos tal como el sistema endocrino, el sistema hematopoyético, la piel, el sistema cardiopulmonar, los sistemas gastrointestinales y hepáticos, el sistema renal, la tiroides, los oídos, el sistema neuromuscular, el sistema nervioso central, etc.) o una enfermedad sistémica que puede afectar sistemas de órganos múltiples (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico (SLE), artritis reumatoide (RA), polimiositis, etc.). Tales enfermedades preferidas incluyen trastornos reumatológicos autoinmunes (tales como, por ejemplo, RA, síndrome de Sjögren, escleroderma, lupus tal como el SLE y lupus nefritis, polimiositis-dermatomiositis, crioglobulinemia, síndrome de anticuerpo anti-fosfolípidos, y artritis psoriática), trastornos autoinmunes gastrointestinales y hepáticos (tales como, por ejemplo, enfermedades inflamatorias intestinales (e.g., colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn), gastritis autoinmune y anemia perniciosa, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria y enfermedad celiaca), vasculitis (tal como, por ejemplo, vasculitis ANCA-negativa y vasculitis asociada a ANCA, incluyendo vasculitis Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener, y poliangitis microscópica), trastornos neurológicos autoinmunes (tales como, por ejemplo, esclerosis múltiple, síndrome opsoclonus myclonus, miastenia gravis, neuromielitis óptica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, y polineuropatías autoinmunes), trastornos renales (tales como, por ejemplo, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, y enfermedad de Berger), trastornos dermatológicos

autoinmunes (tales como, por ejemplo, psoriasis, urticaria, ronchas, pemphigus vulgaris, penfigoide bultoso, y lupus eritematoso cutáneo), trastornos hematológicos (tales como, por ejemplo, púrpura trombocitopénica, púrpura trombocitopénica trombótica, púrpura post-transfusión, y anemia hemolítica autoinmune), ateroesclerosis, uveítis, enfermedades auditivas autoinmunes (tales como, por ejemplo, enfermedad del oído interno y pérdida auditiva), enfermedad de Behcet, síndrome de Raynaud, trasplante de órgano, y trastornos endocrinos autoinmunes (tales como, por ejemplo, enfermedades autoinmunes relacionadas con diabetes tales como diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM), enfermedad de Addison, y enfermedad de tiroides autoinmune (e.g., enfermedad de Grave y tiroiditis)). Enfermedades tales más preferidas incluyen, por ejemplo, RA, colitis ulcerativa, vasculitis asociada a ANCA, lupus, esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren, enfermedad de Grave, IDDM, anemia perniciosa, tiroiditis, y glomerulonefritis.

El término "agente citotóxico" como se utiliza en la presente se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o que ocasiona la destrucción de células. El término incluye isótopos radiactivos (e.g., At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32} e isótopos radiactivos de Lu) y toxinas tales como las toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, de hongos, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes de alquilación tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®); alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocuona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metlamelaminas incluyendo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacin y bullatacinona); delta-9-tetrahidrocanabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapacona; lapacol; cloquicinas; ácido netulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®, acetilcampotecina, escopolectina y 9-aminocamtotecina); briostatin; pemetrexed; calistatin; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesin, carzelesin y bizelesin); podofilotoxina; ácido podofilínico; teniposida; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobin; pancratistatin; TLK-286; CDP323 un inhibidor de integrina alfa-4 oral; una saecodictina; espongistatina; mostazas de

nitrógeno tales como clorambucil, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloruro de óxido mecloretamina, melfalan, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilio; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (e.g., caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma II y caliqueamicina omega II (ver, e.g., Nicolaou et al., Agnew. Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluyendo dinemicina A, una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibiótico de cromoproteína enediina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, (incluyendo ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, inyección de liposoma de HCl de doxorubicina (DOXIL® y deoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato, gemicitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona y 5-fluoroacilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterin, metotrexato, pteropterin, trimetrexato,; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluiridina, enocitabina, floxuridina, e imatinib (un derivado de 2-fenilaminopirimidina), así como otros inhibidores c-Kit; anti adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; rellenador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminoleuvínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglucida; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazina; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxin; sizofiran; espirogermanio, ácido tenuazonico; triazicuona; 2,2',2''-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurin A, roridin A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®,

FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, e.g., paclitaxel (TAXOL™), formulación de nanopartículas fabricadas de albúmina de paclitaxel (ABRAXANE™) y docetaxel (TAXOTERE™); cloranbucil; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatin y carboplatin; vinblastina (VELBAN®); platino; etoposida (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatin; leucovovin; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidores de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatina (ELOXATIN™) combinada con 5-FU y leucovovin. Un agente quimioterapéutico particularmente preferido útil en combinación con los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención, especialmente en el tratamiento de la inmunidad tumoral es gemcitabina.

También se incluyen en esta definición los agentes anti-hormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer y frecuentemente están en forma de tratamiento sistémico o de cuerpo completo. Éstos pueden ser hormonas en sí. Los ejemplos incluyen anti-estrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERMs), incluyendo, por ejemplo, tamoxifen (incluyendo tamoxifen Novaldex®), raloxifeno (EVISTA®), droloxifeno, 4-hidroxitamoxifen, trioxifeno, queoxifeno, LY 117018, onapristona y toremifeno (Fareston®); anti-progesteronas; sub-reguladores del receptor de estrógeno (ERDs); antagonistas del receptor de estrógeno tales como fluvestrant (FASLODEX®); agentes que funcionan para suprimir o desactivar los ovarios, por ejemplo, la hormona liberadora de hormona leutinizante (LHRH), agonistas tales como acetato de leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterelina; anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas adrenales tales como, por ejemplo, 4-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol (MEGASE®), exemestano (AROMASIN®, formestanie, fadrozol, vorozol (RIVISOR®, letrozol (FEMARA®) y anastrozol (ARIMIDEX®). Además, tal definición de agentes quimioterapéuticos incluye

bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®, alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID® o risedronato (ACTONEL®);así como troxacitabina (un análogo de citosina de nucleósido 1,3-dioxolano); oligonucleótidos de anti-sentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en las trayectorias de señalización implicadas en la proliferación aberrante de células, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia del gen, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la vacuna VAXID®; inhibidor 1 de topoisomerasa (e.g., LURTOTECAN®); un anti-estrógeno tal como fulvestrant; un inhibidor Kit tal como imatinib o EXEL-0862 (un inhibidor de tirosina cinasa); inhibidor de EGFR tal como erlotinib o cetuximab; un inhibidor anti-VEGF tal como bevacizumab; arinotecan; rmRH (e.g., ABARELIX®); lapatinib y ditosilato de lapatinib (un inhibidor de molécula pequeña de tirosina cinasa doble de EGFR también conocido como GW572016); 17AAG (derivado de geldamicina que es un veneno 90 de proteína de choque térmico (Hsp)) y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Un "agente inhibidor del crecimiento" se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, cuyo crecimiento depende de la activación del receptor ya sea in vitro o in vivo. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento incluye uno que reduce significativamente el porcentaje de células dependientes del receptor en fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar diferente a la fase S), tales como los agentes que inducen el arresto de G1 y el arresto en fase M. Los bloqueadores de fase M clásicos incluyen los vincas y vinca alcaloides (vincristina y vinblastina), taxanos, inhibidores de topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etoposida y bleomicina. Los agentes que arrestan G1 también se esparcen hacia el arresto de la fase S, por ejemplo, los agentes de alquilación de ADN tales como tamoxifen, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatina, metotrexato, 5-fluoroacilo y ara-C. Puede encontrarse información adicional en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes and antineoplastic drugs" (Regulación del ciclo celular, oncogenes y fármacos antineoplásicos) por Murakami et al., (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anti-

cáncer derivados ambos del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo Europeo, es un análogo semi-sintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb).

El término "citosina" es un término genérico para las proteínas liberadas por una población de células que actúan en otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citosinas son las linfosinas, monosinas; interleucinas (ILs) tales como IL-1, IL-1α, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15...IL-35, incluyendo PROLEUKIN® rIL-2; un factor de necrosis de tumor tal como TNF-α o TNF-β; y otros factores del polipéptido incluyendo LIF y ligando kit (KL), aunque el término "interleucina" se ha convertido ahora esencialmente en un sinónimo de citosina. Como se utiliza en la presente el término citosina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citosinas de secuencia nativa, incluyendo entidades de molécula pequeña sintéticamente producidas y derivados y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Las citosinas pueden clasificarse en la ubicación proximal del objetivo pretendido, en donde autócrina se refiere a la acción en la misma célula de la cual se secreta, parácrina se refiere a la acción restringida a la inmediata cercanía en la cual se secreta la citosina, y endócrina se refiere a la acción en regiones distantes del cuerpo. Las citosinas inmunes también pueden clasificarse por mejorar una respuesta tipo I (e.g., IFN-γ, TGF-β etc.), lo cual favorece la inmunidad celular o una respuesta tipo II (IL-4, IL-10, IL-13 etc.) lo cual favorece la inmunidad del anticuerpo o humoral. Las citosinas inmunes juegan papeles en la co-estimulación, la maduración, la proliferación, la activación, la inflamación, el crecimiento, la diferenciación, la producción y secreción de citosinas, y la supervivencia de diversas células inmunes.

El término "hormona" se refiere a hormonas de polipéptido que se secretan generalmente por órganos glandulares con conductos. Incluidas entre las hormonas están, por ejemplo, la hormona de crecimiento tal como la hormona de crecimiento humana, la hormona de crecimiento humana de N-metionilo, y la hormona de crecimiento bovina; la hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; estradiol; terapia de reemplazo hormonal; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostano o testolactona; prorrelaxina; hormonas de glicoproteína tales como la hormona estimuladora de folículos (FSH), la hormona estimuladora de tiroides (TSH); y la hormona luteinizante (LH); prolactina, lactógeno placentario, péptido asociado con

gonadotropina de ratón, hormona liberadora de gonadotropina; inhibina; activina; sustancia inhibidora mulleriana; y trombopoyetina. Como se utiliza en la presente, el término hormona incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de la hormona de secuencia nativa, incluyendo entidades de molécula pequeña sintéticamente producidas y derivados y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

III. Modos para Llevar a cabo la Invención

A. Humanización Utilizando Despliegue de Fago

Las variantes injertadas de región hipervariable descritas en la presente fueron generadas por mutagénesis Kunkel del ácido nucleico que codifica para las secuencias aceptoras humanas, utilizando un oligonucleótido separado para cada región hipervariable. Kunkel et al., Methods Enzymol., 154: 367-382 (1987). Pueden introducirse los cambios apropiados dentro de la estructura y/o la región hipervariable utilizando técnicas de rutina, para corregir y restablecer las interacciones de región hipervariable-antígeno apropiadas.

Puede utilizarse el despliegue de fago (fagémido) (también referido en la presente como despliegue de fago) como un método conveniente y rápido para generar y seleccionar muchos anticuerpos variantes potenciales diferentes en una biblioteca generada por aleatorización de secuencia. Sin embargo, se encuentran disponibles otros métodos para producir y seleccionar anticuerpos alterados para las personas expertas.

El despliegue de fago (fagémido) (también referido en la presente como despliegue de fago en algunos contextos) puede utilizarse como un método conveniente y rápido para generar y seleccionar muchos anticuerpos variantes potenciales diferentes en una biblioteca generada por aleatorización de secuencia. Sin embargo, se encuentran disponibles otros métodos para producir y seleccionar anticuerpos alterados para las personas expertas.

La tecnología de despliegue de fago (fagémido) ha proporcionado una poderosa herramienta para generar y seleccionar nuevas proteínas que se enlazan a un ligando tal como un antígeno. El uso de las técnicas de despliegue de fago (fagémido) permite la generación de grandes bibliotecas de variantes de proteína que pueden clasificarse rápidamente por aquellas secuencias que se enlazan a una molécula objetivo con alta afinidad. Los ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos variantes están fusionados generalmente a una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína de cubierta viral, tal como la proteína del gen III y la proteína del gen VIII. Se han desarrollado

sistemas de despliegue de fagémido monovalentes en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína o polipéptido se fusiona a una secuencia de ácido nucleico que codifica para una porción de la proteína del gen III. (Bass S., Proteins, 8:309 (1990); Lowman y Wells, Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 3: 205 (1991)). En un sistema de despliegue de fagémido monovalente, la fusión del gen se expresa a bajos niveles y las proteínas del gen III de tipo silvestre también se expresan de manera que se retiene la inefectividad de las partículas. Los métodos para generar bibliotecas de péptido y para seleccionar esas bibliotecas se han descrito en muchas patentes (e.g., Patente de E.U. No. 5,723,286, Patente de E.U. No. 5,432,018, Patente de E.U. No. 5,580,717, Patente de E.U. No. 5,427,908 y Patente de E.U. No. 5,498,530).

Se han preparado bibliotecas de anticuerpos o polipéptidos de enlace al antígeno en numerosas formas incluyendo alterando un solo gen mediante la inserción de secuencias de ADN aleatorias o clonando una familia de genes relacionados. Se han descrito métodos para desplegar anticuerpos o fragmentos de enlace al antígeno utilizando despliegue de fago (fagémido) en las Patentes de E.U. Nos. 5,750,373, 5,733,743, 5,837,242, 5,969,108, 6,172,197, 5,580,717 y 5,658,727. La biblioteca se selecciona entonces por la expresión de anticuerpos o proteínas de enlace al antígeno con las características deseadas.

Los métodos para sustituir un aminoácido seleccionado en un ácido nucleico de plantilla están muy establecidos en la técnica, de los cuales algunos se describen en la presente. Por ejemplo, los residuos de región hipervariable pueden sustituirse utilizando el método Kunkel. Ver, e.g., Kunkel et al., Methods Enzymol., 154:367-382 (1987).

La secuencia de oligonucleótidos incluye uno o más de los conjuntos de codones designados para los residuos de región hipervariable que van a alterarse. Un conjunto de codones es un conjunto de diferentes secuencias triples de nucleótido utilizadas para codificar los aminoácidos variantes deseados. Los conjuntos de codones pueden representarse utilizando símbolos para designar los nucleótidos particulares o mezclas equimolares de nucleótidos como se muestra a continuación de acuerdo con el código IUB.

CÓDIGOS IUB

G (guanina)	Y (C o T)	H (A o C o T)
A (adenina)	M (A o C)	B (C o G o T)
T (timina)	K (G o T)	V (A o C o G)
C (citosina)	S (C o G)	D (A o G o T)
R (A o G)	W (A o T)	N (A o C o G o T)
Por ejemplo, en el conjunto de codones DVK, D puede ser los nucleótidos A o G o T; V puede ser A o G o C; y K puede ser G o T. Este conjunto de codones puede presentar 18 codones diferentes y pueden codificar para los aminoácidos Ala, Trp, Tyr, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly y Cys.		

Los conjuntos de oligonucleótidos o iniciador pueden sintetizarse utilizando métodos estándar. Un conjunto de oligonucleótidos puede sintetizarse, por ejemplo, mediante síntesis en fase sólida, conteniendo secuencias que representan todas las combinaciones posibles de tripletas de nucleótidos proporcionadas por el conjunto de codones y que codificarán para el grupo de aminoácidos deseado. La síntesis de oligonucleótidos con "degeneración" de nucleótido seleccionada en ciertas posiciones es muy conocida en la técnica. Tales conjuntos de nucleótidos que tienen ciertos conjuntos de codones pueden sintetizarse utilizando sintetizadores de ácido nucleico comerciales (disponibles de, por ejemplo, Applied Biosystems, Foster City, CA), o pueden obtenerse comercialmente (por ejemplo, de Life Technologies, Rockville, MD). En consecuencia, un conjunto de oligonucleótidos sintetizado teniendo un conjunto de codones particular incluirá típicamente una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, establecidas las diferencias por el conjunto de codones dentro de la secuencia completa. Los oligonucleótidos, utilizados de acuerdo con la invención, tienen secuencias que permiten la hibridación a una plantilla de ácido nucleico de dominio variable y también pueden incluir sitios de restricción de enzimas para propósitos de clonación.

En un método, las secuencias de ácido nucleico que codifican para aminoácidos variantes pueden crearse mediante mutagénesis mediada por oligonucleótido. Esta técnica es muy conocida en la técnica como se describe por Zoller et al., Nucleic Acids Res., 10: 6487-6504 (1987). Brevemente, las secuencias de ácido nucleico que codifican para aminoácidos variantes se crean hibridando un conjunto de oligonucleótidos que codifica para los conjuntos de codones deseados a una plantilla de ADN, cuando la plantilla está en la forma monocatenaria del plásmido que contiene la secuencia de plantilla de ácido nucleico de región variable. Después de la hibridación, se utiliza ADN polimerasa para sintetizar una segunda cadena complementaria completa de la plantilla que, por tanto, incorporará el iniciador de oligonucleótido, y contendrá los conjuntos de codones proporcionados por el conjunto de oligonucleótidos.

Generalmente, se utilizan oligonucleótidos de al menos 25 nucleótidos de longitud. Un oligonucleótido óptimo tendrá de 12 a 15 nucleótidos que son complementarios a la plantilla en cualquier lado de el(los) nucleótido(s) codificando para la(s) mutación(es). Esto asegura que el oligonucleótido se hibridará apropiadamente a la molécula de plantilla de ADN monocatenario. Los

oligonucleótidos se sintetizan fácilmente utilizando técnicas conocidas en la técnica tales como las descritas por Crea et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 75, 5765 (1978).

La plantilla de ADN se genera por aquellos vectores que ya sea se derivan de vectores M13 bacteriófagos (los vectores M13mp18 y M13mp19 comercialmente disponibles son adecuados), o aquellos vectores que contienen un origen de replicación de fago monocatenario como se describe en Viera et al., Meth. Enzymol., 153:3 (1987). Por tanto, el ADN que va a mutarse puede insertarse en uno de estos vectores a fin de generar una plantilla monocatenaria. La producción de la platilla monocatenaria se describe en las secciones 4.21-4.41 de Sambrook et al., anteriormente.

Para alterar la secuencia de ADN nativa, el oligonucleótido se hibrida a la plantilla monocatenaria bajo condiciones adecuadas de hibridación. Una enzima polimerizante de ADN, comúnmente T7 ADN polimerasa o el fragmento Klenow de ADN polimerasa I, se agrega entonces para sintetizar la cadena complementaria de la plantilla utilizando el oligonucleótido como un iniciador para la síntesis. Se forma, por tanto una molécula heteroduplex de tal manera que una cadena de ADN codifica para la forma mutada del gen 1, y la otra cadena (la plantilla original) codifica para la secuencia nativa no alterada del gen 1. Esta molécula heteroduplex se transforma entonces en una célula huésped adecuada, comúnmente un procariota tal como JM101 de E. coli. Después de cultivar las células, estas se colocan en placas en placas de agarosa y se seleccionan utilizando el iniciador de oligonucleótido radioetiquetado con un ^{32}-fosfato para identificar las colonias bacterianas que contienen el ADN mutado.

El método descrito inmediatamente arriba puede modificarse de tal manera que se cree la molécula homoduplex en donde ambas cadenas del plásmido contienen la(s) mutación(es). Las modificaciones son como sigue: El oligonucleótido monocatenario se hibrida a la plantilla monocatenaria como se describió anteriormente. Una mezcla de tres desoxirribonucleótidos, desoxirriboadenosina (dATP), desoxirriboguanosina (dGTP) y desoxirribotimidina (dTT), se combina con una tiodesoxirribocitosina modificada llamada dCTP-(aS) (que puede obtenerse de Amersham). Esta mezcla se agrega al complejo de plantilla-oligonucleótido. A la adición de ADN polimerasa a esta mezcla, se genera una cadena de ADN idéntica a la plantilla excepto por las bases mutadas. Además, esta nueva cadena de ADN contendrá dCTP-(aS) en lugar de dCTP, lo cual sirve para protegerla de la digestión de endonucleasa de restricción.

Después de que la cadena de plantilla de la heterodupla bicatenaria se ha cortado con una enzima de restricción apropiada, la cadena de plantilla puede digerirse con ExoIII nucleasa u otra nucleasa apropiada para cortar en una región diferente a la que contiene el(los) sitio(s) que van a mutagenizarse. La reacción se detiene entonces para dejar una molécula que es solo parcialmente monocatenaria. Una homodupla de ADN bicatenario completa se forma entonces utilizando ADN polimerasa en presencia de todos los cuatro trifosfatos de desoxirribonucleótido, ATP, y ADN ligasa. Esta molécula homoduplex puede entonces transformarse en una célula huésped adecuada.

Como se indicó previamente, la secuencia del conjunto de oligonucleótidos es de una longitud suficiente para hibridarse al ácido nucleico de plantilla y también puede contener, pero no necesariamente, sitios de restricción. La plantilla de ADN puede generarse por aquellos vectores que ya sea se derivan de vectores M13 de bacteriófago o de vectores que contienen un origen de replicación monocatenario como se describe por Viera et al., Meth. Enzymol., 153:3 (1987). Por tanto, el ADN que va a mutarse debe insertarse en uno de estos vectores a fin de generar una plantilla monocatenaria. La producción de la plantilla monocatenaria se describe en las secciones 4.21-4.41 de Sambrook et al., supra.

De acuerdo con otro método, puede generarse una biblioteca proporcionando conjuntos de oligonucleótidos en corriente ascendente y en corriente descendente, teniendo cada conjunto una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, establecidas las diferentes secuencias por los conjuntos de codones provistos dentro de la secuencia de los oligonucleótidos. Los conjuntos de oligonucleótidos en corriente ascendente y en corriente descendente, junto con una secuencia de ácido nucleico de plantilla de dominio variable, pueden utilizarse en una reacción en cadena de polimerasa para generar una "biblioteca" de productos de PCR. Los productos de PCR pueden referirse como "casetes de ácido nucleico", ya que pueden fusionarse con otras secuencias de ácido nucleico relacionadas o no relacionadas, por ejemplo, proteínas de cubierta viral y dominios de dimerización, utilizando técnicas establecidas de biología molecular.

La secuencia de los iniciadores de PCR incluye uno o más de los conjuntos de codones designados para las posiciones accesibles al solvente y altamente diversas en una región hipervariable. Como se describió anteriormente, un conjunto de codones es un conjunto de diferentes secuencias triples de

nucleótido utilizado para codificar para los aminoácidos variantes deseados. Los seleccionadores de anticuerpo que cumplen con los criterios deseados, seleccionados a través de etapas apropiadas de clasificación/selección, pueden aislarse y clonarse utilizando técnicas recombinantes estándar.

B. Preparación Recombinante

La invención también proporciona un ácidos nucleico aislado que codifica para los anticuerpos anti-PD-L1, vectores y células huésped que comprenden tal ácido nucleico, y técnicas recombinantes para la producción del anticuerpo.

Para la producción recombinante del anticuerpo, el ácido nucleico que lo codifica se aísla y se inserta en un vector replicable para su clonación posterior (amplificación del ADN) o para su expresión. El ADN que codifica para el anticuerpo monoclonal se aísla y se secuencia fácilmente utilizando procedimientos convencionales (e.g., utilizando sondas de oligonucleótido que son capaces de enlazarse específicamente a genes que codifican para las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. La selección del vector depende en parte de la célula huésped que va a utilizarse. Generalmente, las células huésped preferidas son de origen ya sea procariótico o eucariótico (generalmente de mamífero).

1. Producción de Anticuerpo en Células Procarióticas

a) Construcción del vector

Las secuencias de polinucleótidos que codifican para componentes de polipéptido de los anticuerpos de la invención pueden obtenerse utilizando técnicas recombinantes estándar. Las secuencias de polinucleótidos deseadas pueden aislarse y secuenciarse a partir de células productoras de anticuerpos tales como las células de hibridoma. Alternativamente, los polinucleótidos pueden sintetizarse utilizando un sintetizador de nucleótidos o técnicas PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican para los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en huéspedes procarióticos. Para el propósito de la presente invención pueden utilizarse muchos vectores que están disponibles y que se conocen en la técnica. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos que van a insertarse en el vector y de la célula huésped particular que va a transformarse con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión del polinucleótido heterólogo, o ambas) y de su compatibilidad con la célula huésped

particular en la cual reside. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero no se limitan a: un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de enlace al ribosoma (RBS), una secuencia de señal, el inserto de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de transcripción.

En general, los vectores de plásmido que contienen secuencias de replicón y de control que se derivan de especies compatibles con la célula huésped se utilizan en conexión con estos huéspedes. El vector contiene comúnmente un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, E. coli típicamente se transforma utilizando pBR322, un plásmido derivado de una especie de E. coli. pBR322 contiene genes que codifican para resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y, por tanto, proporciona medios fáciles para identificar células transformadas. pBR322, sus derivados, u otros plásmidos o bacteriófagos microbianos también pueden contener, o modificarse para contener, promotores que pueden utilizarse por el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas. Ejemplos de derivados de pBR322 utilizados para la expresión de anticuerpos particulares se describen en detalle en Carter et al., Patente de E.U. No. 5,648,237.

Además, los vectores de fago que contienen secuencias de replicón y de control que son compatibles con el microorganismo huésped, pueden utilizarse como vectores de transformación en conexión con estos huéspedes. Por ejemplo, puede utilizarse un bacteriófago tal como GEM.TM.-11 para producir un vector recombinante que puede utilizarse para transformar células huésped susceptibles tales como E- coli LE392.

El vector de expresión de la invención puede comprender dos o más pares de promotor-cistrón que codifican para cada uno de los componentes del polipéptido. Un promotor es una secuencia reguladora no trasladada ubicada en corriente ascendente (5') a un cistrón que modula su expresión. Los promotores procarióticos recaen típicamente en dos clases, inducibles y constitutivos. El promotor inducible es un promotor que inicia los niveles incrementados de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a los cambios en la condición del cultivo, e.g., la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura.

Se conoce un gran número de promotores reconocidos por una variedad de células huésped potenciales. El promotor seleccionado puede estar operablemente enlazado a un ADN cistrón que codifica para la cadena ligera o

pesada retirando el promotor del ADN fuente a través de digestión de la enzima de restricción e insertando la secuencia promotora aislada en el vector de la invención. Puede utilizarse tanto la secuencia promotora nativa como muchos promotores heterólogos para dirigir la amplificación y/o la expresión de los genes objetivo. En algunas modalidades, se utilizan promotores heterólogos, ya que generalmente permiten una mayor transcripción y más altos rendimientos del gen objetivo expresado en comparación con el promotor e polipéptido objetivo nativo.

Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procarióticos incluyen el promotor PhoA, los sistemas de promotor de galactamasa y lactosa, un sistema de promotor de triptófano y promotores híbridos tales como el promotor tac o el tcr. Sin embargo, también son adecuados otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacterianos o de fago conocidos). Sus secuencias de nucleótido se han publicado, permitiendo así que un trabajador experto los ligue operablemente a cistrones que codifican para las cadenas ligera y pesada objetivo (Siebenlist et al., (1980) Cell 20: 269) utilizando enlazadores o adaptadores para suministrar cualquier sitio de restricción requerido.

En un aspecto, cada cistrón dentro del vector recombinante comprende un componente de secuencia de señal de secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector o puede ser una parte del ADN del polipéptido objetivo que está insertada en el vector. La secuencia de señal seleccionada para el propósito de esta invención debe ser una reconocida y procesada (i.e., dividida por una peptidasa de señal) por la célula huésped. Para las células huésped procarióticas que no reconocen ni procesan las secuencias de señal nativas para los polipéptidos heterólogos, la secuencia de señal se sustituye por una secuencia de señal procariótica seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste de los guías de alcalina fosfatasa, penicilinasa, lpp, o enterotoxina II termo-estable (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En una modalidad de la invención, las secuencias de señal utilizadas en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencias de señal de STII o variantes de las mismas.

En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas de acuerdo con la invención puede presentarse en el citoplasma de la célula huésped y, en consecuencia, no requiere la presencia de secuencias de señal de secreción dentro de cada cistrón. A este respecto, las cadenas ligera y pesada de

inmunoglobulina se expresan, se doblan y se ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales dentro del citoplasma. Ciertas cepas huésped (e.g., las cepas trxB- de E. coli) proporcionan condiciones del citoplasma que son favorables para la formación del enlace disulfuro, permitiendo así un doblamiento y ensamblaje apropiados de las subunidades de proteína expresadas. Proba y Plückthun Gene, 159: 203 (1995).

La presente invención proporciona un sistema de expresión en el cual la proporción cuantitativa de los componentes de polipéptido expresados puede modularse a fin de maximizar el rendimiento de los anticuerpos secretados y apropiadamente ensamblados de la invención. Tal modulación se logra al menos en parte modulando simultáneamente las fuerzas de translación para los componentes de polipéptido. Una técnica para modular la fuerza de translación se describe en Simmons et al., Patente de E.U. No. 5,840,523. Esta utiliza variantes de la región de iniciación translacional (TIR) dentro de un cistrón. Para una TIR dada, puede crearse una serie de variantes de secuencia de aminoácido o ácido nucleico con un rango de fuerzas de translación, proporcionando así un medio conveniente mediante el cual ajustar este factor para el nivel de expresión deseado de la cadena específica. Las variantes de TIR pueden generarse mediante técnicas de mutagénesis convencionales que dan como resultado cambios en el codón que pueden alterar la secuencia de aminoácidos, aunque se prefieren cambios silenciosos en la secuencia de nucleótidos. Las alteraciones en la TIR pueden incluir, por ejemplo, alteraciones en el número o en la separación de las secuencias Shine-Dalgrano, junto con alteraciones en la secuencia de señal. Un método para generar secuencias de señal mutantes es la generación de un "banco de codones" al comienzo de una secuencia de codificación que no cambia la secuencia de aminoácidos de la secuencia de señal (i.e., los cambios son silenciosos). Esto puede lograrse cambiando la tercera posición del nucleótido de cada codón; adicionalmente, algunos aminoácidos, tales como leucina, serina y arginina, tiene múltiples primeras y segundas posiciones que pueden agregar complejidad al producir el banco. Este método de mutagénesis se describe en detalle en Yansura et al., (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol, 4:151-158.

Preferentemente, se genera un conjunto de vectores con un rango de fuerzas de TIR para cada citrón en el mismo. Este conjunto limitado proporciona una comparación de los niveles de expresión de cada cadena así como del rendimiento de los productos de anticuerpo deseados bajo varias combinaciones

de fuerza de TIR. Las fuerzas TIR pueden determinarse cuantificando el nivel de expresión de un gen informante como se describe en detalle en Simmons et al., Patente de E.U. No. 5,840,523. En base a la comparación de fuerza translacional, las TIRs individuales deseadas se seleccionan para combinarse en las construcciones de vector de expresión de la invención.

b) Células huésped procarióticas

Las células huésped procarióticas adecuadas para expresar los anticuerpos de la invención incluyen Archaebacteria y Eubacteria, tales como los organismos Gram-negativos o Gram-positivos. Ejemplos de bacterias útiles incluyen Escherichia (e.g., E. coli), Bacilli (e.g., B. subtilis), Enterobacteria, especie Pseudomonas (e.g., P. aeruginosa), Salmonella typhimurium, Serratia Marcescans, Klebisiella, Proteus, Shigella, Rhizobia, Vitreoscilla o Paracoccus. En una modalidad, se utilizan células Gram-negativas. En una modalidad, se utilizan células de E. coli como huéspedes para la invención. Ejemplos de cepas de E. coli incluyen la cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology (Biología celular y molecular), vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; Depósito ATCC No. 27,325) y derivados de las mismas, incluyendo la cepa 33D3 que tiene un genotipo W3110 *ÿfhuA (ÿtonA) ptr3 lac Iq lacL8 ÿompTÿ(nmpc-fepE) degP41 kan*^{R} (Patente de E.U. No. 5,639,635). Otras cepas y sus derivados, tales como E. Coli 294 (ATCC 31,446), E. coli B, E. coli 1776 (ATCC 31,537) y E. coli RV308 (ATCC 31m608) también son adecuadas. Estos ejemplos son ilustrativos más que limitantes. Los métodos para construir derivados de cualquiera de las bacterias mencionadas anteriormente que tienen genotipos definidos, se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Bass et al., Proteins 8: 309-314 (1990). Generalmente es necesario seleccionar las bacterias apropiadas tomando en consideración la capacidad de replicación del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, las especies de E. coli, Serratia o Salmonella pueden utilizarse adecuadamente como el huésped cuando se utilizan plásmidos muy conocidos tales como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 para suministrar el replicón.

Típicamente, la célula huésped debe secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas y deseablemente pueden incorporarse inhibidores de proteasa adicionales en el cultivo celular.

c) Producción de anticuerpos

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión antes descritos y se cultivan en medio nutritivo convencional modificado según sea

apropiado para incluir promotores, seleccionar transformadores o amplificar los genes que codifican para las secuencias deseadas. Transformación significa introducir el ADN en el huésped procariótico de manera que el ADN sea replicable, ya sea como un elemento extracromosomal o mediante un integrante cromosomal. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se efectúa utilizando técnicas estándar apropiadas para tales células. El tratamiento de calcio que emplea cloruro de calcio se utiliza generalmente para células bacterianas que contienen barreras de pared celular sustanciales. Otro método para transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Aún otra técnica utilizada es el electroporación.

Las células procarióticas utilizadas para producir los anticuerpos de la invención se cultivan en un medio conocido en la técnica y adecuado para el cultivo de las células huésped seleccionadas. Ejemplos de medios adecuados incluyen caldo luria (LB) más los suplementos nutritivos necesarios. En algunas modalidades, el medio contiene también un agente de selección, seleccionado en base a la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el crecimiento de las células procarióticas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se agrega ampicilina al medio para el crecimiento de células que expresan en gen resistente a ampicilina.

También puede incluirse cualquier suplemento necesario además de carbono, nitrógeno y fuentes de fosfato inorgánico a las concentraciones apropiadas introducidos solos o como una mezcla con otro suplemento o medio tal como una fuente compleja de nitrógeno. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes de reducción seleccionados del grupo que consiste de glutationa, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol y ditiotreitol.

Las células huésped procarióticas se cultivan a temperaturas adecuadas. Para el crecimiento de E. coli, por ejemplo, los rangos de temperatura preferidos son de aproximadamente 20°C a aproximadamente 39°C, más preferentemente de aproximadamente 25°C a aproximadamente 37°C, incluso más preferentemente a aproximadamente 30°C. El pH del medio puede ser cualquier pH variando de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo huésped. Para E. coli, el pH es preferentemente de aproximadamente 6.8 a aproximadamente 7.4 y más preferentemente de aproximadamente 7.0.

Si se utiliza un promotor inducible en el vector de expresión de la invención, la expresión de proteína se induce bajo condiciones adecuadas para la

activación del promotor. En un aspecto de la invención, los promotores PhoA se utilizan para controlar la transcripción de los polipéptidos. Por consiguiente, las células huésped transformadas se cultivan en un medio limitador de fosfato para su inducción. Preferentemente, el medio limitador de fosfato es el medio C.R.A.P. (ver, e.g., Simmons et al., J. Immunol. Methods., (2002) 263:133-147). Puede utilizarse una variedad de otros inductores de acuerdo con la construcción de vector empleada como se conoce en la técnica.

Las proteínas de anticuerpo expresadas de la presente invención se secretan en y se recuperan del periplasma de las células huésped. La recuperación de proteína implica típicamente romper el microorganismo, generalmente por medios tales como el choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez que las células se rompen, el polvo celular o las células completas pueden retirarse mediante centrifugación o filtración. Las proteínas pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad de resina. Alternativamente, las proteínas pueden transportarse hacia el medio de cultivo y aislarse en el mismo. Las células pueden retirarse del cultivo y filtrar y concentrar el sobrenadante del cultivo para la purificación posterior de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden aislarse e identificarse además utilizando métodos comúnmente conocidos tales como electroforesis de gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de transferencia Western.

Alternativamente, la producción de anticuerpos se conduce en gran cantidad mediante un proceso de fermentación. Se encuentran disponibles varios procedimientos de fermentación de lote de alimentación a gran escala para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1000 litros de capacidad, preferentemente de aproximadamente 1,000 a 100,000 litros de capacidad. Estos fermentadores utilizan propulsores de agitador para distribuir el oxígeno y los nutrientes, especialmente glucosa (la fuente preferida de carbono/energía). La fermentación a pequeña escala se refiere generalmente a la fermentación en un fermentador que es de no más de aproximadamente 100 litros en capacidad volumétrica y puede variar de aproximadamente 1v litro a aproximadamente 100 litros.

Durante el proceso de fermentación, la inducción de la expresión de proteína se inicia típicamente después de que las células se han cultivado bajo condiciones adecuadas a una densidad deseada, e.g., una OD_{550} de aproximadamente 180-220, en cuya etapa las células están en la fase estacionaria temprana. Puede utilizarse una variedad de inductores, de acuerdo con la

construcción de vector empleada, como se conoce en la técnica y se describió anteriormente. Las células pueden cultivarse durante períodos más cortos previo a la inducción. Las células se inducen comúnmente durante aproximadamente 12 a 50 horas, aunque puede utilizarse un tiempo de inducción más largo o más corto.

Para mejorar el rendimiento de la producción y la calidad de los anticuerpos de la invención, pueden modificarse varias condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblado apropiado y el doblado de los polipéptidos de anticuerpo secretados, pueden utilizarse vectores adicionales que sobreexpresan las proteínas acompañantes, tales como las proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y o DsbG) o FkpA (una peptidilprolil cis, trans-isomerasa con actividad de acompañante) para co-transformar las células huésped procarióticas. Las proteínas acompañantes han demostrado facilitar el doblado apropiado y la solubilidad de las proteínas heterólogas producidas en células huésped bacterianas. Chen et al., (1999) J. Bio Chem., 274: 19601-19605; Georgiou et al., Patente de E.U. No. 6,083,715; Georgiou et al., Patente de E.U. No. 6,027,888; Bothmann y Plückthun (2000) J. Biol. Chem., 275:17100-17105; Ramm y Plückthun (2000) J. Biol. Chem., 275: 17106-17113; Arie et al., (2001) Mol. Microbiol., 39:199-210.

Para minimizar la proteólisis de las proteínas heterólogas expresadas (especialmente aquellas que son proteolíticamente sensitivas), pueden utilizarse ciertas cepas huésped deficientes para enzimas proteolíticas para la presente invención. Por ejemplo, las cepas de célula huésped pueden modificarse para efectuar mutación(es) genética(s) en los genes que codifican para proteasas bacterianas conocidas tales como Proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, Proteasa VI y combinaciones de las mismas. Algunas cepas de E- coli deficientes en proteasa están disponibles y se describen, por ejemplo, en Joly et al., (1998), supra; Georgiou et al., Patente de E.U. No. 5,264,365; Georgiou et al., Patente de E.U. No. 5,508,192; Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996).

Las cepas de E. coli deficientes para enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas acompañantes pueden utilizarse como células huésped en el sistema de expresión que codifica para los anticuerpos de la invención.

d) Purificación de anticuerpos

La proteína de anticuerpo producida en la presente se purifica

adicionalmente para obtener preparaciones que son sustancialmente homogéneas para ensayos y usos adicionales. Pueden emplearse los métodos estándar para purificación de proteínas conocidos en la técnica. Los siguientes procedi8mientos son ejemplares de procedimientos de purificación adecuados: fraccionación en columnas de inmunoafinidad o de intercambio de ion, precipitación en etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía en sílice o en una resina de intercambio de catión tal como DEAE, cromatoenfoque, SDS-PAGE, precipitación en sulfato de amonio, y filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75.

En un aspecto, la proteína A inmovilizada en una fase sólida se utiliza para la purificación de inmunoafinidad de los productos de anticuerpo de longitud total de la invención. La proteína A es una proteína de pared celular de 41 kD de Staphylococcus aureus, que se enlaza con alta afinidad a la región Fc de los anticuerpos. Lindmark et al., (1983) J. Immunol. Meth., 62:1-13. La fase sólida a la cual se inmoviliza la proteína A es preferentemente una columna que comprende una superficie de vidrio o sílice, más preferentemente una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna se ha recubierto con un reactivo, tal como glicerol, en un intento por evitar la adherencia no específica de contaminantes. La fase sólida se lava entonces para retirar los contaminantes no específicamente enlazados a la fase sólida. Finalmente, el anticuerpo de interés se recupera en la fase sólida mediante elución.

2. Producción de Anticuerpos en Células Eucarióticas

Para la expresión eucariótica, los componentes del vector incluyen generalmente, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes, una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento mejorador, un promotor, y una secuencia de terminación de transcripción.

a) Componente de secuencia de señal

Un vector para uso en un huésped eucariótico también puede ser un inserto que codifica para una secuencia de señal u otro polipéptido que tiene un sitio de división específico en la terminal N de la proteína o polipéptido maduro. La secuencia de señal heteróloga seleccionada es preferentemente una reconocida y procesada (i.e., dividida por una peptidasa de señal) por la célula huésped. En la expresión celular en mamíferos, están disponibles las secuencias de señal de mamíferos así como los guías secretorios virales, por ejemplo, la señal gD de herpes simple.

El ADN para tal región precursora está ligado en un marco de lectura

al ADN que codifica para los anticuerpos de la invención.

b) Origen de replicación

Generalmente, el componente de origen de replicación no es necesario para los vectores de expresión de mamíferos (el origen SV40 puede utilizarse típicamente solo porque contiene el promotor temprano).

c) Selección del componente del gen

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también llamado un marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican para proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos diferentes a toxinas, e.g., ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) deficiencias auxotrópicas al complemento, o (c) suministra nutrientes críticos no disponibles del medio complejo, e.g., el gen que codifica para D-alanina racemasa para Bacilli.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para arrestar 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 el régimen de selección. Ejemplos de tal selección dominante utilizan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero, son aquellos que permiten la identificación de células competentes para absorber el ácido nucleico que codifica para los anticuerpos de la invención, tales como DHFR, timidina cinasa, metalotioneína-I y II, preferentemente genes de metalotioneína de primate, adenosina deaminasa, ornitina decarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican primero cultivando todos los transformadores en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped apropiada cuando se emplea DHFR de tipo silvestre, es la línea celular de ovario de hámster Chino (CHO) deficiente en la actividad de DHFR (e.g., ATCC CRL-9096).

Alternativamente, las células huésped (particularmente los huéspedes de tipo silvestre que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con las secuencias de ADN que codifican para los anticuerpos, la proteína DHFR de tipo silvestre y otro marcador seleccionable tal como aminoglicósido 3'fosfotransferasa (APH), pueden seleccionarse por el crecimiento celular en un medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglicosídico, e.g., canamicina,

neomicina o G418. Ver, Patente de E.U. No. 4,965,199.

d) Componente promotor

Los vectores de expresión y clonación contienen comúnmente un promotor que se reconoce por el organismo huésped y está operablemente enlazado al ácido nucleico que codifica para las secuencias de anticuerpo deseadas. Virtualmente todos los genes eucarióticos tienen una región rica en AT ubicada aproximadamente de 25 a 30 bases en corriente ascendente desde el sitio en donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada de 70 a 80 bases en corriente ascendente desde el inicio de la transcripción de muchos genes es la región CNCAAT en donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría eucariótica está una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición del extremo poli A al extremo 3' de la secuencia de codificación. Todas estas secuencias pueden insertarse en vectores de expresión eucarióticos.

Otros promotores adecuados para su uso con huéspedes procarióticos incluyen el promotor *poa*, - sistemas de promotor de lactamasa y lactosa, promotor de alcalina fosfatasa, un sistema de promotor de triptófano (trp) y promotores híbridos tales como el promotor tac. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgrano (S.D.) operablemente enlazada al ADN que codifica para el polipéptido de anticuerpo.

La transcripción del polipéptido de anticuerpo a partir de vectores en células huésped de mamífero se controla, por ejemplo, por los promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el virus de polioma, el virus de viruela, adenovirus (tal como el Adenovirus 2), virus de papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de hepatitis B y más preferentemente del virus 40 de simio (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, e.g., el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre que tales promotores sean compatibles con los sistemas de célula 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 viral de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para expresar el ADN en huéspedes mamíferos utilizando el virus de papiloma bovino como un vector, se describe en la Patente

de E.U. No. 4,419,446. Una modificación de este sistema se describe en la Patente de E.U. No. 4,601,978. Ver también Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982) en la expresión del ADNc de interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina cinasa a partir del virus de herpes simple. Alternativamente, puede utilizarse como promotor la repetición de terminal larga del virus de sarcoma Rous.

e) Componente del elemento mejorador

La transcripción de un ADN que codifica para los anticuerpos de esta invención por eucariotas mayores se incrementa frecuentemente insertando una secuencia mejoradora en el vector. Se conocen ahora muchas secuencias mejoradoras provenientes de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, fetoproteína-α e insulina). Sin embargo, típicamente se utilizará un mejorador proveniente de un virus de célula eucariótica. Los ejemplos incluyen el mejorador SV40 en el último lado del origen de replicación (bp 100-270), el mejorador de promotor temprano de citomegalovirus, el mejorador de polioma en el último lado del origen de replicación y mejoradores de adenovirus. Ver también Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) en elementos mejoradores para la activación de promotores eucarióticos. El mejorador puede dividirse en el vector en una posición 5' o 3' a la secuencia de codificación de anticuerpo, pero preferentemente se localiza en el sitio 5' desde el promotor.

f) Componente de terminación de transcripción

Los vectores de expresión utilizados en células huésped eucarióticas (células de levadura, hongos, insectos, plantas, amínales, humanos, o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán ciertas secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están comúnmente disponibles de las regiones 5' y ocasionalmente 3' no trasladadas de ADNs o ADNcs eucarióticos o virales. Estas regiones contienen segmentos e nucleótido transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no trasladada del ARNm que codifica para el anticuerpo. Un componente de terminación de transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Ver WO 94/11026 y el vector de expresión descrito en la presente.

g) Selección y transformación de células huésped

las células huésped adecuadas para la clonación y expresión del ADN en los vectores en la presente incluyen células eucarióticas mayores descritas en la presente, incluyendo células huésped vertebradas. La propagación

de las células vertebradas en el cultivo (cultivo de tejido) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embriónico humano (293 o células 293 subclonadas para su crecimiento en cultivo de suspensión, Graham et al., J. Gen. Virol., 36.59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster Chino/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 77: 4216 (1980)); células 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 cervical 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 TR1 (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).

Las células huésped se transforman con la expresión o clonación de vectores anteriormente descrita para la producción de anticuerpos y se cultivan en medio nutritivo convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformadores o amplificar los genes que codifican para las secuencias deseadas.

h) Cultivo de células huésped

Las células huésped utilizadas para producir el anticuerpo de esta invención pueden cultivarse 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 de 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 E.U. Nos. 4,767,704, 4,657,866, 4,927,762, 4,560,655 o 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; o Patente de E.U. Re. 30,985 puede utilizarse como medio de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios puede suplementarse según sea necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), amortiguadores (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco

GENTAMYCIN™), elementos de rastreo (definidos como compuestos inorgánicos comúnmente presentes en concentraciones finales en el rango micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro suplemento necesario en concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la técnica. Las condiciones del cultivo, tales como la temperatura, el pH y lo similar, son aquellas previamente utilizadas con la célula huésped seleccionada para la expresión y serán aparentes para el técnico de experiencia ordinaria.

i) Purificación del anticuerpo

Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse de manera intracelular, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce de manera intracelular, como primera etapa, se retira el polvo en partículas ya sea de células huésped o fragmentos lisados, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de E. coli. Brevemente, la pasta celular se congela en presencia de acetato de sodio (pH 3.5), EDTA, y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) durante aproximadamente 30 minutos. El polvo celular puede retirarse mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta hacia el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión generalmente se concentran primero utilizando un filtro de concentración de proteína comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Un inhibidor de proteasa tal como PMSF puede incluirse en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición de anticuerpo preparadas a partir de las células puede purificarse utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis de gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la técnica de purificación preferida la cromatografía de afinidad. La capacidad de adecuación de la proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie y del isotipo de cualquier dominio de Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede utilizarse para purificar anticuerpos que se basan en las inmunoglobulinas humanas que contienen 1, 2 o 4 cadenas pesadas (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para el 3 humano (Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986). La matriz a la cual se acopla el ligando de afinidad es

frecuentemente agarosa, pero otras matrices están disponibles. Las matrices mecánicamente estables tales como de vidrio de poro controlado o de poli(estireno-divinil)benceno permiten tasas de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos de los que pueden lograrse con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_H3, la resina Bakerbond ABX™ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas tales como la fraccionación en una columna de intercambio de ion, precipitación en etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio de anión o catión (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatoenfoque, SDS-PAGE, y precipitación en sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que va a recuperarse.

Después de cualquier etapa de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba de bajo pH utilizando un amortiguador de elución a un pH entre aproximadamente 2.5-4.5, preferentemente efectuada a bajas concentraciones de sal (e.g., de aproximadamente 0-0.24 M de sal).

C. Preparación de anticuerpo

1) Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales se generan generalmente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante a una proteína que es inmunogénica en la especie que va a inmunizarse, e.g., hemocianina de lapa keyhole (KLH), albúmina de suero, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja, utilizando un agente bifuncional o de derivatización, e.g., 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 $R^1N = C = NR$, en donde R y R^1 son independientemente grupos de alquilo inferior. Ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM (Lípido A de monofosforilo, dicorinomicolato de trehalosa sintético). El protocolo de inmunización puede seleccionarse por el experto en la técnica sin experimentación indebida.

Se inmuniza a los animales contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados, combinando, e.g., 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 de manera intradérmica en múltiples sitios. Un mes más tarde, se refuerza a los animales con 1/5 a 1/10 de la cantidad original del péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a catorce días después, se sangra a los animales y se analiza el suero por titulación de anticuerpos. Se refuerza a los animales hasta que la titulación se estabiliza. Los conjugados también pueden producirse mediante cultivo celular recombinante como fusiones de proteínas. También son adecuados los agentes de agregación tales como alúmina para mejorar la respuesta inmune.

2) Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se obtienen de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, i.e., los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por mutaciones posibles de origen natural y/o modificaciones post-translacionales (e.g., isomerizaciones, amidaciones) que pueden estar presentes en cantidades menores. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo no siendo una mezcla de anticuerpos discretos.

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse utilizando el método de hibridoma primeramente descrito por Kohler et al., Nature 256:495 (1975) o puede producirse mediante métodos de ADN recombinante (Patente de E.U. No. 4,816,567).

En el método de hibridoma, se inmuniza a un ratón u otros animal huésped apropiado, tal como un hámster, como se describió anteriormente para extraer linfocitos que producen o que son capaces de producir anticuerpos que se enlazarán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse in vitro. Los linfocitos se fusionan entonces con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (Anticuerpos monoclonales: principios y práctica) pp. 59-103 (Academic Press, 1986).

El agente de inmunización incluirá típicamente la proteína antigénica o una variante de fusión de la misma. Generalmente, se utilizan ya sea linfocitos de sangre periférica ("PBLs") si se desean células de origen humano, o células de bazo o de nodo linfático si se desean fuentes de mamífero no humano. Los linfocitos se fusionan después con una línea celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de

hibridoma, Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (Anticuerpos monoclonales: principios y práctica) Academic Press, (1986) pp. 59-103.

Las líneas celulares inmortalizadas son comúnmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen de roedor, bovino y humano. Comúnmente, se emplean líneas celulares de mieloma de ratón. Las células de hibridoma así preparadas se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma de origen no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma de origen carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), que son sustancias que evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las células de mieloma inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan la producción estable de alto nivel del anticuerpo mediante células productoras de anticuerpo seleccionadas y son sensitivas a un medio tal como el medio HAT. Entre estas, se prefieren las líneas de mieloma murinas, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California EUA, y las células SP-2 (y sus derivados, e.g., X63-Ag8-653) disponibles del American Type Culture Collection, Manassas, Virginia EUA. También se han descrito las líneas celulares de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications (Técnicas y aplicaciones de la producción de anticuerpo monoclonal), pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

El medio de cultivo en el cual se cultivan las células de hibridoma se analizan por la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de enlace de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de enlace in vitro, tal como un radioinmunoanálisis (RIA) o un ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzimas (ELISA).

El medio de cultivo en el cual se cultivan las células de hibridoma puede analizarse por la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno deseado. Preferentemente, la afinidad y la especificidad de enlace del

anticuerpo monoclonal pueden determinarse mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de enlace in vitro, tal como un radioinmunoanálisis (RIA) o un ensayo enlazado a enzimas (ELISA). Tales técnicas y ensayos se conocen en la técnica. Por ejemplo, la afinidad de enlace puede determinarse mediante el análisis Scatchard de Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse limitando los procedimientos de dilución y cultivando mediante métodos estándar (Goding, supra). El medio de cultivo adecuado para este propósito incluye, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse in vivo como tumores en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, del fluido ascítico, o del suero mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulina tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis de gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoclonales también pueden producirse mediante métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la Patente de E.U. No. 4,816,567, y como se describió anteriormente. El ADN que codifica para los anticuerpos monoclonales se aísla y se secuencia fácilmente utilizando procedimientos convencionales (e.g., utilizando sondas de oligonucleótido que son capaces de enlazarse específicamente a genes que codifican para las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión que después se transfectan en células huésped tales como las células de E. coli, células COS de simio, células de ovario de hámster Chino (CHO), o células de mieloma que de otra manera no producen la proteína de inmunoglobulina, a fin de sintetizar los anticuerpos monoclonales en tales células huésped recombinantes. La revisión de artículos acerca de la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifican el anticuerpo incluye Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5: 256-262 (1993) y Plückthun, Immunol. Revs., 130: 151-188 (1992).

En una modalidad adicional, los anticuerpos pueden aislarse de bibliotecas de fago de anticuerpo generadas utilizando 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, utilizando bibliotecas de fago. Publicaciones subsecuentes describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (rango nM) mediante arrastre de cadena (Marks et al., Bio/Technology, 10: 779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación in vivo como una estrategia para construir bibliotecas muy grandes (Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993)). Por tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpo monoclonal para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia de codificación por dominios constantes de cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de E.U. No. 4,816,567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., EUA 81: 6851 (1984)) o uniendo covalentemente a la secuencia de codificación de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia de codificación para un polipéptido no inmunoglobulina. Típicamente, tales polipéptidos no inmunoglobulina se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad para un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad para un antígeno diferente.

Los anticuerpos monoclonales descritos en la presente pueden ser monovalentes, cuya la preparación es muy conocida en la técnica. Por ejemplo, el método implica la expresión recombinante de la cadena ligera de inmunoglobulina y una cadena pesada modificada. La cadena pesada está truncada generalmente en cualquier punto en la región Fc a fin de evitar la reticulación de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos de cisteína relevantes pueden sustituirse con otro residuo de aminoácido o se suprimen a fin de evitar la reticulación. También son adecuados los métodos in vitro para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente fragmentos Fab, puede lograrse utilizando técnicas de rutina conocidas en la técnica.

También pueden prepararse anticuerpos quiméricos o híbridos in vitro utilizando métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo aquellas que involucran agentes de reticulación. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o

formando una unión de tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

3) Anticuerpos Humanizados

Los anticuerpos de la invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (e.g., murinos) son las inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas) tales como Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ u otras sub-secuencias de anticuerpo de enlace al antígeno) que contienen mínima secuencia derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo recipiente) en las cuales los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) (HVR como se utiliza en la presente) del recipiente se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como de ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos ejemplos, los residuos Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo recipiente ni en la CDR ni en las secuencias marco importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, de los dominios variables en los cuales todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente comprenderá también al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Jones et al., Nature 321:522-525; Riechman et al., Nature 322:323-329 (1988) y Presta, Curr. Opin. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992).

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son muy conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácido introducidos en el mismo provenientes de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácido no humanos se refieren frecuentemente como residuos "importados", los cuales se toman típicamente de un dominio variable "importado". La humanización puede llevarse a cabo esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores, Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechman et al., Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988) o a través de la sustitución de

CDRs de roedor o secuencias CDR para las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de E.U. No. 4,816,567), en donde sustancialmente menos un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente proveniente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los cuales algunos residuos CDR y posiblemente algunos residuos FR se sustituyen por residuos provenientes de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La selección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para su uso en la producción de anticuerpos humanizados, es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado método "mejor adaptado", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se selecciona contra la biblioteca completa de secuencias conocidas de dominio variable humano. La secuencia humana que está más cercana a la del roedor se acepta entonces como la estructura humana (FR) para el anticuerpo humanizado. Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987). Otro método utiliza una estructura particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un sub-grupo particular de cadenas ligera o pesada. La misma estructura puede utilizarse para varios anticuerpos humanizados diferentes. Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993).

Además es importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad para el antígeno y con otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este propósito, de acuerdo con un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias de origen y varios productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias de origen y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son familiares a los expertos en la técnica. Están disponibles programas computarizados que ilustran y despliegan las estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidato seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidato, i.e., el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidato para enlazarse a su antígeno. De esta manera, los residuos FR pueden seleccionarse y combinarse del recipiente y las

secuencias importadas a fin de lograr la característica deseada del anticuerpo, tal como la afinidad incrementada para el(los) antígeno(s) objetivo. En general, los residuos CDR están directa y más sustancialmente implicados en influir en el enlace al antígeno.

Se contemplan varias formas del anticuerpo humanizado. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, que se conjuga opcionalmente con uno o más agentes citotóxicos a fin de generar un inmunoconjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

4) Anticuerpos humanos

Como una alternativa a la humanización, pueden generarse anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (e.g., ratones) que son capaces, a su inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homózigua del gen de la región de unión de cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones mutantes de línea germinal da como resultado la completa inhibición de la producción del anticuerpo endógeno. La transferencia de la disposición del gen de inmunoglobulina de línea germinal humana en tales ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos al reto con antígeno. Ver, e.g., Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993); Patentes de E.U. Nos. 5,591,669 y WO 97/17852.

Alternativamente puede utilizarse tecnología de despliegue de fago para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo in vitro, provenientes de repertorios de gen de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990); Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991). De acuerdo con esta técnica, los genes de dominio V de anticuerpo se clonan en marco en un gen de proteína de cubierta ya sea mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se despliegan como fragmentos de anticuerpo funcionales sobre la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenaria del genoma e fago, las selecciones en base a las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica para el anticuerpo que exhibe esas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. El despliegue

del fago puede llevarse a cabo en una variedad de formatos, revisados en, e.g., Johnson, Kevin S y Chiswell, David J. Curr. Opin. Struct. Biol., 3:564-571 (1993). Varias fuentes de segmentos del gen V pueden utilizarse para el despliegue del fago. Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991) aislaron una disposición diversa de anticuerpos anti-oxazolona provenientes de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados de bazos de ratones inmunizados. Un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados puede construirse y pueden aislarse anticuerpos para una disposición diversa de antígenos (incluyendo auto-antígenos) 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). Ver también Patentes de E.U. Nos. 5,565,332 y 5,573,905.

También están disponibles las técnicas de Cole et al., y Boerner et al., para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (Anticuerpos monoclonales y terapia del cáncer) Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner et al., J. Immunol., 147(1): 86-95 (1991). De manera similar, pueden producirse anticuerpos humanos introduciendo sitios de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, e.g., ratones en los cuales los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado parcial o completamente. Al probarse, se observa la producción de anticuerpo humano, la cual se asemeja cercanamente a la observada en humanos en todos los aspectos, incluyendo reordenamiento del gen, ensamblaje y repertorio de anticuerpos. Este procedimiento se describe, por ejemplo, en las Patentes de E.U. Nos., 5,545,807; 5,545,806, 5,569,825, 5,625,126, 5,663,425, 5,661,016 y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368:856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-13 (1994), Fishwild et al., Nature Biotechnology 14: 845-51 (1996), Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996) y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13: 65-93 (1995).

Finalmente, también pueden generarse anticuerpos humanos in vitro mediante células B activadas (ver Patentes de E.U. Nos. 5,567,610 y 5,229,275).

5) Fragmentos de anticuerpo

En ciertas circunstancias existen ventajas en el uso de fragmentos de anticuerpo, más que de anticuerpos completos. Tamaños más pequeños de fragmentos permiten una rápida limpieza y pueden conducir a un acceso mejorado a tumores sólidos.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de

fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (ver, e.g., Morrison et al., J. Biochem. Biophys. Method., 24:107-117 (1992); y Brennan et al., Science 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente mediante células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv pueden todos expresarse en y secretarse de E. coli, permitiendo así la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las bibliotecas fago de anticuerpos tratadas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de E. coli y acoplarse químicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro procedimiento, los fragmentos $F(ab')_2$ pueden aislarse directamente del cultivo de célula huésped recombinante. Fab y $F(ab')_2$ con vida media in vivo incrementada se describen en la Patente de E.U. No. 5,869,046. En otras modalidades, el anticuerpo seleccionado es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Ver WO 93/16185; Patente de E.U. No. 5,571,894 y Patente de E.U. No. 5,587,458. El fragmento de anticuerpo también puede tener un "anticuerpo lineal", e.g., como se describe en la Patente de E.U. No. 5,641,870. Tales fragmentos de anticuerpo lineal pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

6) Terapia de Profármaco Mediada por Enzimas Dependiente del Anticuerpo (ADEPT)

Los anticuerpos de la presente invención también pueden utilizarse en ADEPT conjugando el anticuerpo a una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (e.g., un agente quimioterapéutico de peptidilo, ver WO 81/01145) en un fármaco activo anti-cáncer. Ver, por ejemplo, WO 88/07378 y la Patente de E.U. No. 4,975,278.

El componente de enzima del inmunoconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar en un profármaco de tal manera que lo convierte a su forma citotóxica más activa.

Las enzimas que son útiles en el método de esta invención incluyen, pero no se limitan a, glicosidasa, glucosa oxidasa, lisozima humana, glucuronidasa humana, alcalina fosfatasa útil para convertir los profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; alquilsulfatasa útil para convertir los profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina deaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anti-cáncer 5-fluoroacilo; proteasas, tales como serratia proteasa, thermolisina, subtilisina, carboxipeptidasas (e.g.,

carboxipeptidasa G2 y carboxipeptidasa A) y catepsinas (tales como las catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptido en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes D-aminoácido; enzimas de división de carbohidrato tales como β-galactosidasa y neuraminidasa útil para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; β-lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con β-lactamos en fármacos libres; y penicilina amidasas, tales como penicilina Vamidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir los fármacos derivatizados en sus nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas" pueden utilizarse para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (ver e.g., Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Los conjugados de anticuerpo-abzima pueden prepararse como se describe en la presente para el suministro de la abzima a una población celular de tumor.

Las enzimas anteriores pueden unirse covalentemente al polipéptido o a los anticuerpos descritos en la presente mediante técnicas muy conocidas en la técnica tales como el uso de los agentes de reticulación heterobifuncionales tratados anteriormente. Alternativamente, las proteínas de fusión que comprenden al menos la región de enlace al antígeno del anticuerpo de la invención enlazada al menos a una porción funcionalmente activa de una enzima de la invención pueden construirse utilizando técnicas de ADN recombinante muy conocidas en la técnica (ver, e.g., Neuberger et al., Nature 312: 604-608 (1984)).

7) Anticuerpos biespecíficos y poliespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos (BsAbs) son anticuerpos que tienen especificidades de enlace para al menos dos epítopes diferentes, incluyendo aquellos en la misma u otra proteína. Alternativamente, un brazo puede enlazarse al antígeno objetivo y otro brazo puede combinarse con un brazo que se enlaza a una molécula activadora en un leucocito tal como una molécula receptora de célula T (e.g., CD3), o a receptores para IgG (FcγR) tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), a fin de enfocarse y localizar los mecanismos de defensa celular a la célula que expresa el antígeno objetivo. Tales anticuerpos pueden derivarse de anticuerpos de longitud total o de fragmentos de anticuerpo (e.g., anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$).

También pueden utilizarse anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos a células que expresan el antígeno objetivo. Tales anticuerpos

poseen un brazo que se enlaza al antígeno deseado y otro brazo que se enlaza al agente citotóxico (e.g., saporin, anti-interferón-α, vinca alcaloide, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo). Ejemplos de anticuerpos biespecíficos conocidos incluyen anti-Erb2/anti-FcgRIII (WO 96/16673), anti-Erb2/anti-FcgRI (Patente de E.U. 5,837,234), anti-Erb2/anti-CD3 (Patente de E.U. 5,821,337).

Los métodos para producir anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud total se basa en la co-expresión de dos pares de cadena pesada-ligera/ligera de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades. Millstein et al., Nature, 305: 537-539 (1983). Debido a la selección aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 diferentes moléculas de anticuerpo, de las cuales solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que comúnmente se efectúa mediante etapas de cromatografía de afinidad, es algo engorrosa, y los rendimientos del producto son bajos. Se describen procedimientos similares en la WO 93/08829 y en Traunecker et al., EMBO J. 10: 3655-3659 (1991).

De acuerdo con un procedimiento diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de enlace deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan a las secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones de articulación CH2 y CH3. Se prefiere que la primera región constante de cadena pesada (CH1) contenga el sitio necesario para el enlace de cadena ligera, presente al menos en una de las fusiones. Los ADNs que codifican para las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, para la cadena ligera de inmunoglobulina, están insertados en vectores de expresión separados y se co-transfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en modalidades en donde las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido utilizadas en la construcción proporcionan rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias de codificación para dos o todas 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

significancia particular.

En una modalidad preferida de este procedimiento, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada híbrida de inmunoglobulina con una primera especificidad de enlace en un brazo y un par híbrido de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina (proporcionando una segunda especificidad de enlace) en el otro brazo. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones no deseadas de cadena de inmunoglobulina, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina solamente en la mitad de las moléculas biespecíficas proporciona una forma fácil de separación. Este procedimiento se describe en la WO 94/04690. Para detalles adicionales de generación de anticuerpos biespecíficos, ver, por ejemplo, Suresh et al., Methods in Enzymology 121:210 (1986).

De acuerdo con otro procedimiento descrito en la WO 96/27011 o en la Patente de E.U. 5,731,168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede fabricarse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. La interfaz preferida comprende al menos parte de la región CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más pequeñas cadenas laterales de aminoácido provenientes de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más grandes (e.g., tirosina o triptófano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) grande(s) cadena(s) lateral(es) se crean en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando grandes cadenas laterales de aminoácido con unas más pequeñas (e.g., alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Se han descrito en la literatura técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse utilizando enlace químico. Brennan et al., Science 229: 81 (1985) describen un procedimiento en donde los anticuerpos intactos se dividen proteolíticamente para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol arsenita de sodio para estabilizar los ditioles vecinales y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten después en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se convierte después en el derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo

biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden utilizarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los fragmentos Fab' pueden recuperarse directamente de E. coli y acoplarse químicamente para formar los anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992) describen la producción de moléculas $F(ab')_2$ de anticuerpo biespecífico humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado a partir de E. coli y se sometió a acoplamiento químico dirigido in vitro para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado fue capaz de enlazarse a células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y células T humanas normales, así como de activar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra objetivos de tumor de mama humano.

También se han descrito varias técnicas para producir y aislar fragmentos de anticuerpo bivalente directamente a partir del cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido heterodímeros bivalentes utilizando zíperes de leucina. Kostelny et al., J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de zíper de leucina de las proteínas Fos y Jun se enlazaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión de gen. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región de articulación para formar monómeros y después se re-oxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diabody" descrita por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci., EUA 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para producir fragmentos de anticuerpo biespecífico/monovalente. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir la formación de pares entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a formar pares con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de enlace al antígeno. También se ha reportado otra estrategia para producir fragmentos de anticuerpo biespecífico/bivalente mediante el uso de dímeros Fv monocatenarios (sFv). Ver Gruber et al., J. Immunol., 147: 60 (1991).

Los anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden enlazarse a dos diferentes epítopes en una molécula dada. Alternativamente, un brazo de anti-proteína puede combinarse con un brazo que se enlaza a una molécula activadora en un leucocito tal como una molécula receptora de célula T (e.g., CD2, CD3, CD28 o B7) o receptores Fc para IgG (FcγR) tales como FcγRI (CD64), FcγRII

(CD32) y FcγRIII (CD16), a fin de enfocar los mecanismos de defensa celular a la célula que expresa la proteína particular. Los anticuerpos biespecíficos también pueden utilizarse para localizar agentes citotóxicos a células que expresan una proteína particular. Tales anticuerpos poseen un brazo de enlace a proteína y un brazo que se enlaza a un agente citotóxico o a un quelado de radionúclido, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se4 enlaza a la proteína de interés y se enlaza además al factor de tejido (TF).

8) Anticuerpos Multivalentes

Un anticuerpo multivalente puede internalizarse (y/o catabolizarse) más rápido que un anticuerpo bivalente mediante una célula que expresa un antígeno al cual se enlazan los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalente (que son diferentes a la clase IgM) con tres o más sitios de enlace al antígeno (e.g., anticuerpos tetravalentes), los cuales pueden producirse fácilmente mediante la expresión recombinante de ácido nucleico que codifica para las cadenas de polipéptido del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de enlace al antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste de) una región Fc o una región de articulación. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de enlace al antígeno amino-terminales a la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido en la presente comprende (o consiste de) de tres a aproximadamente ocho, pero preferentemente cuatro, sitios de enlace al antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena de polipéptido (y preferentemente dos cadenas de polipéptido), en donde la(s) cadena(s) de polipéptido comprende(n) dos o más dominios variables. Por ejemplo, la(s) cadena(s) de polipéptido puede(n) comprender: VD1-$(X1)_n$-VD2-$(X2)_n$-Fc, en donde CD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena de polipéptido de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido y n es 0 o 1. Por ejemplo, la(s) cadena(s) de polipéptido puede(n) comprender: cadena de región VH-CH1-flexible enlazador-VH-CH1-Fc; o cadena de región VH-CH1-VH-CH1-Fc. El anticuerpo multivalente en la presente comprende preferentemente además al menos dos (y preferentemente cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente en la presente puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados en la presente comprenden un dominio variable de cadena ligera y,

opcionalmente, comprenden además un dominio CL.

9) Anticuerpos Heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados también están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos covalentemente unidos. Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Tales anticuerpos, por ejemplo, se han propuesto para dirigir las células del sistema inmune a células no deseadas, Patente de E.U. 4,676,980, y para el tratamiento de infección por VIH. WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 0308936. Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse in vitro utilizando métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo aquellos que involucran agentes de reticulación. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o formando una unión de tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los descritos, por ejemplo, en la Patente de E.U. No. 4,676,980. Los anticuerpos heteroconjugados pueden producirse utilizando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son muy conocidos en la técnica y se describen en la Patente de E.U. No. 4,676,980, junto con numerosas técnicas de reticulación.

10) Ingeniería de Función efectora

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora de Fc, e.g., a fin de modificar (e.g., mejorar o eliminar) la citotoxicidad mediada por la célula dependiente del antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. En una modalidad preferida, la función efectora de Fc de los anticuerpos anti-PD-L1 se reduce o se elimina. Esto puede lograrse introduciendo una o más sustituciones de aminoácido en una región Fc del anticuerpo. Alternativamente o adicionalmente, puede(n) introducirse residuo(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo así la formación de la unión disulfuro intercadena en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una destrucción celular mediada por el complemento y una citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Ver, Caron et al., J. Exp. Med., 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, B., J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con actividad anti-tumor mejorada también pueden prepararse utilizando reticuladores heterobifuncionales como se describe en Wolff et al., Cancer Research 53: 2560-2565 (1993).

Alternativamente, puede fabricarse un anticuerpo que tiene regiones Fc dobles y por consiguiente pueden tener capacidades mejoradas de lisis de complemento y ADCC. Ver, Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design (Diseño de fármacos anti-cáncer) 3: 219-230 (1989).

Para incrementar la vida media en suero del anticuerpo, puede incorporarse un epítope de enlace al receptor de salvamento en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe en la Patente de E.U. 5,739,277, por ejemplo. Como se utiliza en la presente, el término "epítope de enlace al receptor de salvamento" se refiere a un epítope de la región Fc de una molécula de IgG (e.g., IgG_1, IgG_2, IgG_3 o IgG_4) que es responsable de incrementar la vida media en suero in vivo de la molécula de IgG.

11) Otras Modificaciones de Secuencia de Aminoácidos

Se contempla(n) modificación(es) de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en la presente. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de enlace y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos se preparan introduciendo los cambios en nucleótido apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo o mediante síntesis de péptido. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, supresiones de y/o inserciones en y/o sustituciones de, los residuos dentro de las secuencias de aminoácido del anticuerpo. Se efectúa cualquier combinación de supresión, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios en aminoácidos también pueden alterar los procesos post-translacionales del anticuerpo, tales como el cambio en el número o posición de los sitios de glicosilación.

Un método útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son ubicaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de exploración de alanina" como se describe por Cunningham y Wells en Science 244: 1081-1085 (1989). Aquí, se identifica un residuo o un grupo de residuos objetivo (e.g., residuos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado de forma negativa. Las ubicaciones de aminoácido que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan entonces introduciendo variantes adicionales o diferentes en, o para, los sitios de sustitución. Por tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario predeterminar la naturaleza de la mutación per se. Por ejemplo, para analizar el

desempeño de una mutación en un sitio dado, se conduce una exploración de ala o mutagénesis aleatoria en el codón o región objetivo y las variantes de anticuerpo expresadas se seleccionan por la actividad deseada.

Las inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen fusiones de terminal amino y/o carboxilo que varían en longitud desde un residuo hasta los polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos únicos o múltiples. Ejemplos de inserciones de terminal incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo de terminal N o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión a la terminal N o C del anticuerpo a una enzima (e.g., para ADEPT) o un polipéptido que incrementa la vida media en suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo reemplazado por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis se sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla A siguiente bajo el encabezado de "sustituciones preferidas". Si tales sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces más cambios sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla A, o como se describen adicionalmente más adelante con referencia a las clases de aminoácidos, pueden introducirse y seleccionar los productos.

Tabla A

Sustituciones de Aminoácidos

Residuo Original	**Sustituciones Ejemplares**	**Sustituciones Preferidas**
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)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se logran seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura de la estructura del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos de origen natural se dividen en grupos en base a las propiedades de la cadena lateral común:

(1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;

(2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;

(3) acídicos: asp, glu;

(4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;

(5) residuos que influyen la orientación de cadena: gly, pro; y

(6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservadoras ocasionarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Cualquier residuo de cisteína no implicado en mantener la conformación apropiada del anticuerpo también puede sustituirse, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación aberrante. Por el contrario, puede(n) agregarse enlace(s) de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Un tipo particularmente preferido de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo de origen (e.g., un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la(s) variante(s)

resultante(s) seleccionada(s) para su desarrollo posterior tendrán propiedades biológicas mejoradas en relación al anticuerpo de origen del cual se generan. Una forma conveniente para generar tales variantes de sustitución implica maduración de afinidad utilizando despliegue de fago. Brevemente, varios sitios de región hipervariable (e.g., los sitios 6 y 7) se mutan para generar todas las sustituciones de aminoácido posibles en cada sitio. Las variantes de anticuerpo así generadas se despliegan de una manera monovalente a partir de partículas fago filamentosas como fusiones para el producto III del gen de M13 empacado dentro de cada partícula. Las variantes desplegadas por fago se seleccionan entonces por su actividad biológica (e.g., afinidad de enlace) como se describe en la presente. A fin de identificar los sitios de región hipervariable candidato para modificación, puede llevarse a cabo una mutagénesis de exploración de alanina para identificar los residuos de región hipervariable que contribuyen significativamente al enlace al antígeno. Alternativamente o adicionalmente, puede ser benéfico analizar una estructura cristalina del complejo de antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y su objetivo (e.g., PD-L1, B7.1). Tales residuos de contacto y los residuos vecinos son candidatos para sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en la presente. Una vez generadas tales variantes, el panel de variantes se somete a selección como se describe en la presente y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes pueden seleccionarse para su desarrollo posterior.

Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glicosilación original del anticuerpo. Por alterar se entiende suprimir uno o más de los residuos de carbohidrato encontrados en el anticuerpo y/o agregar uno o más de los sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glicosilación de anticuerpos típicamente está enlazada a N o enlazada a O. Enlazada a N se refiere a la unión del residuo de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en donde X es un aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del residuo de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación enlazada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también puede utilizarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se logra convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de tal manera que contenga una o más de las secuencias de tripéptido antes descritas (para sitios de glicosilación enlazados a N). La alteración también puede efectuarse mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación enlazados a O).

Las moléculas de ácido nucleico que codifican para variantes de secuencia de aminoácidos para los anticuerpos de la invención se preparan mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, el aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos de origen natural) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis PCR, y mutagénesis de casete de una variante o versiones no variantes recientemente preparadas.

12) Otras Modificaciones de Anticuerpo

Los anticuerpos de la presente invención pueden modificarse adicionalmente para contener residuos no proteínicos adicionales conocidos en la técnica y fácilmente disponibles. Preferentemente, los residuos adecuados para la derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etileno glicol/propileno glicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, poli-1, 3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (ya sea homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polietoxilados (e.g., glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y, si se une más de un polímero, pueden ser la misma o diferentes moléculas. En general, el número y/o el tipo de los polímeros utilizados para derivatización pueden determinarse en base a consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que van a mejorarse, si el derivado de anticuerpo se utilizará en una terapia bajo condiciones definidas, etc. Tales técnicas y otras formulaciones adecuadas se describen en Remington:

The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Ed., Alfonso Gennaro, Ed., Philadelphia College of Pharmacy and Science (2000).

D. Formulaciones Farmacéuticas

Se preparan formulaciones terapéuticas para almacenamiento mezclando el ingrediente activo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Pub., Gennaro Ed., Philadelphia, PA 2000). Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos a los recipientes en las dosis y concentraciones empleadas e incluyen amortiguadores, antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico, metionina, vitamina E, metabisulfito de sodio; conservadores, isotonificadores, estabilizadores, complejos de metal (e.g., complejos de Zn-proteína); agentes quelantes tales como EDTA y/o surfactantes no iónicos.

Cuando el agente terapéutico es un fragmento de anticuerpo, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se enlaza específicamente al dominio de enlace de la proteína objetivo. Por ejemplo, en base a las secuencias de región variable de un anticuerpo, pueden diseñarse los fragmentos de anticuerpo o incluso las moléculas de péptido que retienen la capacidad de enlazarse a la secuencia de proteína objetivo. Tales péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse mediante tecnología de ADN recombinante (ver e.g., Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 90: 7889-7893 [1993]).

Se utilizan amortiguadores para controlar el pH en un rango que optimiza la efectividad terapéutica, especialmente si la estabilidad es dependiente del pH. Los amortiguadores están presentes preferentemente en concentraciones que varían de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 250 mM. Los agentes amortiguadores adecuados para su uso con la presente invención incluyen ácidos orgánicos e inorgánicos y sales de los mismos. Por ejemplo, citrato, fosfato, succinato, tartrato, fumarato, gluconato, oxalato, lactato, acetato. Adicionalmente, los amortiguadores pueden comprenderse de histidina y sales de trimetilamina tales como Tris.

Se agregan conservadores para retardar el crecimiento microbiano y típicamente están presentes en un rango de 0.2% - 1.0% (peso/volumen). Los conservadores adecuados para su uso con la presente invención incluyen cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; haluros de benzalconio (e.g., cloruro, bromuro, yoduro), cloruro de bencetonio; trimerosal, fenol, butil o alcohol bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol;

resorcinol; ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol.

Los agentes de tonicidad, conocidos algunas veces como "estabilizadores" están presentes para ajustar o mantener la tonicidad del líquido en una composición. Cuando se utilizan con grandes biomoléculas cargadas tales como proteínas y anticuerpos, se denominan frecuentemente como "estabilizadores" debido a que pueden interactuar con los grupos cargados de las cadenas laterales de aminoácido, disminuyendo en consecuencia el potencial para las interacciones inter e intra-moleculares. Los agentes de toxicidad pueden estar presentes en cualquier cantidad entre 0.1% a 25% por peso, preferentemente de 1 a 5%, tomando en cuenta las cantidades relativas de los otros ingredientes. Los agentes de tonicidad preferidos incluyen alcoholes de azúcar polihídricos, preferentemente alcoholes de azúcar trihídricos o más altos, tales como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol.

Los excipientes adicionales incluyen agentes que pueden servir como uno o más de los siguientes: (1) agentes de volumen, (2) mejoradores de solubilidad, (3) estabilizadores y (4) agentes que evitan la desnaturalización o la adherencia a la pared del contenedor. Tales excipientes incluyen: alcoholes de azúcar polihídricos (enumerados anteriormente); aminoácidos tales como alanina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, lisina, ornitidina, leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc.; azúcares orgánicos o alcoholes de azúcar tales como sacarosa, lactosa, lactitol, trehalosa, estaquiosa, manosa, sorbosa, xilosa, ribosa, ribitol, mioinisitosa, mioinisitol, galactosa, galactitol, glicerol, ciclitoles (e.g., inositol), polietilenglicol; agentes de reducción que contienen azufre tales como urea, glutationa, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, α-monotioglicerol y tio sulfato de sodio; proteínas de bajo peso molecular tales como albúmina de suero humana, albúmina de suero bovina, gelatina u otras inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; monosacáridos (e.g., xilosa, manosa, fructosa, glucosa; disacáridos (e.g., lactosa, maltosa, sacarosa); trisacáridos tales como rafinosa; y polisacáridos tales como dextrina o dextrano.

Los surfactantes o detergentes no iónicos (también conocidos como "agentes humectantes") están presentes para ayudar a solubilizar el agente terapéutico así como para proteger la proteína terapéutica contra la agregación inducida por agitación, los cuales también permiten que la formulación se exponga a la tensión de superficie de cizallamiento sin ocasionar la desnaturalización de la proteína o anticuerpo terapéutico activo. Los surfactantes no iónicos están

presentes en un rango de aproximadamente 0.05 mg/ml a aproximadamente 1.0 mg/ml, preferentemente de aproximadamente 0.07 mg/ml a aproximadamente 0.2 mg/ml.

Los surfactantes no iónicos adecuados incluyen polisorbatos (20, 40, 60, 65, 80, etc.), polioxámeros (184, 188, etc.), polioles PLURONIC®, TRITON®, monoéteres de sorbitán polioxietileno (TWEEN® 20, TWEEN® 80, etc.), lauromacrogol 400, polioxi 40 estearato, polioxietileno, aceite de castor hidrogenado 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, éster de sacarosa de ácido graso, metil celulosa y carboximetil celulosa. Los detergentes aniónicos que pueden utilizarse incluyen lauril sulfato de sodio, sulfosuccinato de dioctil sodio y sulfonato de dioctil sodio. Los detergentes catiónicos incluyen cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio.

A fin de que las formulaciones se utilicen para la administración in vivo, éstas deben ser estériles. La formulación puede hacerse estéril mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Las composiciones terapéuticas en la presente se colocan generalmente en un contenedor que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un obturador perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica.

La vía de administración es de acuerdo con métodos conocidos y aceptados, tales como mediante inyección rápida única o múltiple o infusión durante un largo período de tiempo de una manera adecuada, e.g., inyección o infusión mediante vías subcutáneas, intravenosas, intraperitoneales, intramusculares, intraarteriales, intralesionales o intraarticulares, administración tópica, inhalación o mediante medios de liberación sostenida o de liberación extendida.

La formulación en la presente también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se trata, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Alternativamente o adicionalmente, la composición puede comprender un agente citotóxico, citosina o un agente inhibidor del crecimiento. Tales moléculas están adecuadamente presentes en combinación, en cantidades que son efectivas para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas

de suministro de fármaco coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences 18ª edición, supra.

La estabilidad de las proteínas y anticuerpos descritos en la presente puede mejorarse a través del uso de "sales de metal polivalentes solubles en agua" no tóxicas. Los ejemplos incluyen Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Cu^{2+}, Sn^{2+}, Sn^{4+}, Al^{2+} y Al^{3+}. Los aniones ejemplares que pueden formar sales solubles en agua con los cationes de metal polivalentes anteriores incluyen aquellos formados a partir de ácidos inorgánicos y/o de ácidos orgánicos. Tales sales solubles en agua tienen una solubilidad en agua (a 20°C) de al menos aproximadamente 20 mg/ml, alternativamente de al menos aproximadamente 100 mg/ml, alternativamente de al menos aproximadamente 200 mg/ml.

Los ácidos inorgánicos adecuados que pueden utilizarse para formar las "sales de metal polivalentes solubles en agua" incluyen ácido clorhídrico, acético, sulfúrico, nítrico, tiociánico y fosfórico. Los ácidos orgánicos que pueden utilizarse incluyen ácido carboxílico alifático y ácidos aromáticos. Los ácidos alifáticos dentro de esta definición pueden definirse como ácidos carboxílicos C_{2-9} saturados o insaturados (e.g., ácidos alifáticos mono, di y tricarboxílicos). Por ejemplo, los ácidos monocarboxílicos ejemplares dentro de esta definición incluyen los ácidos monocarboxílicos C_{2-9} saturados acético, propiónico, butírico, valérico, caproico, enantico, caprílico, pelargónico, y capriónico y los ácidos monocarboxílicos C_{2-9} insaturados acrílico, metacrílico propriólico, crotónico e isocrotónico. Los ácidos dicarboxílicos ejemplares incluyen los ácidos dicarboxílicos C_{2-9} saturados malónico, succínico, glutárico, adípico y pimélico, mientras que los ácidos dicarboxílicos C_{2-9} insaturados incluyen ácidos maleico, fumárico, citracónico y mesacónico. Los ácidos tricarboxílicos ejemplares incluyen los ácidos tricarboxílicos C_{2-9} saturados tricarbalílico y ácido 1,2,3-butanotricarboxílico. Adicionalmente, los ácidos carboxílicos de esta definición también pueden contener uno o dos grupos hidroxilo para formar ácidos hidroxi carboxílicos. Los ácidos hidroxi carboxílicos ejemplares incluyen ácido glicólico, láctico, glicérico, tartrónico, malico, tartárico y cítrico. Los ácidos aromáticos dentro de esta definición incluyen ácido benzoico y salicílico.

Las sales de metal polivalentes solubles en agua comúnmente empleadas que pueden utilizarse para ayudar a estabilizar los polipéptidos encapsulados de esta invención incluyen, por ejemplo: (1) las sales de metal de

ácido inorgánico de haluros (e.g., cloruro de zinc, cloruro de calcio), sulfatos, nitratos, fosfatos y tiocianatos; (2) las sales de metal de ácido carboxílico alifático (e.g., acetato de calcio, acetato de zinc, proprionato de calcio, glicolato de zinc, lactato de calcio, lactato de zinc y tartrato de zinc); y (3) las sales de metal de ácido carboxílico aromático de benzoatos (e.g., benzoato de zinc) y salicilatos.

E. Métodos de tratamiento:

Para la prevención o el tratamiento de enfermedades, la dosis apropiada de un agente activo dependerá del tipo de enfermedad que va a tratarse, como se definió anteriormente, de la severidad y el curso de la enfermedad, de si el agente se administra para propósitos preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, de la historia clínica del paciente y de la respuesta al agente, y de la discreción del médico que atiende. El agente se administra adecuadamente al paciente en una vez o durante una serie de tratamientos.

En una modalidad particular, la invención se refiere a la co-estimulación resultante de atenuar la señalización a través de PD-1, específicamente mediante la aplicación de anticuerpos de PD-L1 que evitan el enlace a PD-1 y/o a B7.1, así como al tratamiento terapéutico de trastornos disfuncionales de células T.

1. Infecciones

Pd-1 y sus ligandos ("PD-1:PD-L") juegan un importante papel en la regulación de las defensas inmunes contra patógenos que ocasionan infecciones agudas y crónicas. La señalización de PD-1:PD-L juega un papel clave en la regulación del balance entre una defensa inmune antimicrobiana efectiva y un daño al tejido mediado por inmunidad. Por ejemplo, aunque los ratones knock-out PD-1 limpian la infección por adenovirus más rápidamente que sus contra partes de tipo silvestre, estos desarrollan un daño hepatocelular más severo. Iwai et al., J. Exp. Med., 198: 39-50 (2003). En un modelo de ratón de queratitis estromal de herpes, el bloqueo del anticuerpo anti-PD-L1 exacerbó la queratitis incrementando la expansión de las células T CD4 efectoras específicas de HSV-1 y la producción y la supervivencia de IFN-γ. Jun et al., FEBS Lett. 579:6259-64 (2005).

Los microorganismos que ocasionan infección crónica han explotado la trayectoria de señalización de PD-1:PD-L para evadir las respuestas inmunes del huésped que dan como resultado infecciones crónicas. Los virus que ocasionan infección crónica pueden hacer no funcionales las células T específicas del virus y por consiguiente silencian la respuesta antiviral de las células T. Barber

et al., Nature 439: 682-87 (2006); Wherry et al., J. Virol., 78: 5535-45 (2004). El agotamiento de las células T o anergia, de células T $CD8^+$ es una razón importante para el inefectivo control viral durante las infecciones crónicas y es característico de las infecciones LCMV crónicas en ratones así como de la infección por VIH, VHB, VCH y HTLV en humanos y de la infección SIV en primates. Parece haber una pérdida de función jerárquica, progresiva dentro del fenotipo de las células T $CD8^+$ específicas del virus agotadas, con pérdida primeramente de citotoxicidad y producción de IL-2, seguida por la producción de citosina efectora.

PD-1 está sobre-regulado a su activación, y la expresión se mantiene a un alto nivel mediante células T $CD8^+$ agotadas en ratones con infección crónica por LCMV. Barber et al., supra. Administración de anticuerpos que bloquearon PD-1: el enlace de PD-L1 dio como resultado respuestas mejoradas de las células T y una reducción sustancial en la carga viral. En ratones persistentemente infectados con respuesta inefectiva a T_H $CD4^+$, el bloqueo de PD-1:PD-L restauró las células T $CD8^+$ de un estado disfuncional dando como resultado la proliferación, secreción de citosinas, destrucción de las células infectadas y disminución de la carga viral, sugiriendo fuertemente un procedimiento terapéutico para el tratamiento de infecciones virales crónicas.

Como resultado del papel de PD-1:PD-L en LCMV, se ha mostrado un fuerte interés en dirigirse a esta trayectoria para el tratamiento de infección crónica en humanos. La expresión de PD-1 es alta en células T específicas de VIH [Petrovas et al., J. Exp. Med., 203: 2281-92 (2006); Day et al., Nature 443: 350-54 (2006): Traumann et al., Nat. Med., 12: 1198-202 (2006)], específicas de VHB [Boettler et al., J. Virol., 80: 3532-40 (2006); Boni et al., J. Virol., 81: 4215-25 (2007)] y específicas de VCH [Urbani et al., J. Virol., 80: 11398-403 (2006)]. PD-L1 también está sobre-regulado en monocitos $CD14^+$ de sangre periférica y DCs mieloides en pacientes con infección por VHB [Chen et al., J. Immunol., 178: 6634-41 (2007); Geng et al., J. Virol. Hepat., 13:725-33 (2006)], y en células CD14+ y células T en pacientes con VIH [Trabattoni et al., Blood 101: 2514-20 (2003)]. El bloqueo de las interacciones de PD-1:PD-L1 in vitro revierte el agotamiento de las células T CD8+ y CD4+ específicas de VIH, específicas de VHB, específicas de VCH y específicas de VIS y restaura la proliferación y la producción de citosina. Petrovas et al., J. Exp. Med., 2003: 2281-92 (2006); Day et al., supra; Trautmann et al., supra; Boni et al., supra; Urbani et al., supra; Velu et al., J. Virol., 81: 5819-28 (2007).

El grado de expresión de PD-1 también puede ser un marcador de diagnóstico útil en células T CD8+ específicas de virus para indicar el grado de agotamiento de las células T y la severidad de la enfermedad. El nivel de expresión de PD-1 en células T CD8+ específicas de VIH, se correlaciona con la carga viral, la declinación de las cuentas de CD4+ y con la capacidad disminuida de las células T CD8+ para proliferar en respuesta al antígeno de VIH in vitro. Correspondiente con las observaciones in vivo, existe una correlación directa entre la expresión de PD-1 en células T CD4+ específicas de VIH y la carga viral. D'Souza et al., J. Immunol., 179: 1979-87 (2007). Los no progresores a largo plazo tienen células T CD8+ específicas de VIH funcionales con una expresión de PD-1 marcadamente más baja en contraste con los progresores típicos que expresan un PD-1 significativamente sobre-regulado, lo cual se correlaciona con un reducido número de células T CD4+, un número disminuido de células T CD4+, una función disminuida de las células T CD8+ de memoria efectoras específicas de VIH y una elevada carga viral en plasma. Zhang et al., Blood 109: 4671-78 (2007).

La trayectoria de PD-1:PD-L también se ha implicado en la cronicidad de las infecciones bacterianas. Helicobacter pylori ocasiona gastritis crónica y úlceras gastroduodenales y es un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer gástrico. Durante una infección por H. pylori, las respuestas de la célula T son insuficientes para despejar la infección, conduciendo a una infección persistente. Después de la exposición a H. pylori in vitro o in vivo, el PD-L1 se sobre-regula en células epiteliales gástricas. Las células epiteliales gástricas expresan moléculas clase II MHC y se cree que juegan una importante función de APC durante la infección por H. pylori. Los anticuerpos anti-PD-L1 que bloquean la interacción de PD-1 a PD-L1 mejoran la proliferación de células T y la producción de IL-2 en cultivos de células epiteliales gástricas expuestos a H. pylori y a células T CD4. El bloqueo de PD-L1 ya sea con anticuerpos o ARNsi evitó la generación de las células T reguladoras, sugiriendo que PD-L1 puede promover la supresión de células T y de infecciones persistentes controlando la dinámica entre las células T reguladoras y efectoras durante la infección por H. pylori. Beswick et al., Infect. Immuno. 75: 4334-41 (2007).

Los gusanos parasíticos también han explotado la trayectoria de PD-1:PD-L1 para inducir macrófagos que suprimen la respuesta inmune. Durante las infecciones por Taenia crassiceps (i.e., solitaria) en ratones, PD-1 y PD-L2 se sobre-regulan en macrófagos activados y las células T CD4+ expresan PD-1. El

bloqueo de PD-1, PD-L1 o PD-L2 disminuyó significativamente la supresión de la proliferación de células T in vitro por macrófagos de ratones infectados por solitaria. Terrazas et al, Int. J. Parasitol., 35: 1349-58 (2005). Durante la infección por Shistosoma mansoni en ratones, los macrófagos expresan altos niveles de PD-L1 y niveles más modestos de PD-L2. El Anti-PD-L1 retiró la capacidad de estos macrófagos para suprimir la proliferación de células T in vitro, mientras que el anti-PD-L2 no tuvo efecto. La expresión de PD-L1 en macrófagos de ratones infectados declina después de 12 semanas de infección, correlacionándose con un rompimiento en la anergia de las células T. Smith et al., J. Immunol., 173:1240-48 (2004).

2. Inmunidad tumoral

La evidencia empírica de la inmunidad tumoral incluye (i) la observancia de remisión espontánea, (ii) la presencia de respuestas inmunes del huésped detectables, pero inefectivas, a tumores, (iii) la prevalencia incrementada de malignidades primarias y secundarias en pacientes inmunodeficientes, (iv) la detección de niveles incrementados de anticuerpos y linfocitos T en pacientes con tumor, y (v) la observación de que los animales de prueba pueden inmunizarse contra varios tipos de tumores.

Los estudios han demostrado que la mayoría de los tumores humanos expresan antígenos asociados al tumor (TAAs) que pueden reconocerse por las células T y por tanto son potencialmente capaces de inducir una respuesta inmune. Boon et al., Immunol. Today 16: 334-336 (1995). Las pruebas clínicas en fase temprana se han iniciado vacunando pacientes con cáncer con TAA o células profesionales que presentan el antígeno impulsadas con TAA. Dudley et al., Science 298: 850-854 (2002); Gajewski et al., Clin. Cancer Res., 7: 895s-901s (2001); Marincola et al., Adv. Immunol., 74: 181-273 (2000); Peterson et al., J. Clin. Oncol., 21: 2342-2348 (2003). La inducción de células T CD8+ de tumor específicas al antígeno se ha logrado en muchas de estas pruebas. Mackensen et al,. Eur. Cytokine Netw., 10: 329-336 (1999); Peterson et al., supra. La transferencia adoptiva de células T de tumor específicas al antígeno en pacientes también se ha buscado y ha revelado alojamiento de los linfocitos T citotóxicos expandidos (CTLs) a los sitios de tumor. Meidenbauer et al., J. Immunol., 170: 2161-2169 (2003). Sin embargo, a pesar de la infiltración en tumor de las células efectoras inmunes, el crecimiento del tumor fue rara vez controlado.

Está bien establecido que el micro-ambiente del tumor puede proteger a las células de tumor de la destrucción inmune. Ganss et al., Cancer

Res., 58: 4673-4681 (1998); Singh et al., J. Exp. Med., 175: 139-146 (1992). Se ha descubierto que los factores solubles, así como las moléculas enlazadas a la membrana que incluyen el factor β de crecimiento transformador (TGF-β), interleucina (IL)-10, prostaglandina E_2, FASL, ligandos de CTLA-4, el ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis de tumor (TRAIL), y el ligando 1 del receptor de muerte programada (PD-L1, aka B7-H1) están expresados por tumores y se cree que median la evasión inmune. Por tanto, el bloqueo de estas señales reguladoras inmunes en células de tumor es un promisorio procedimiento para mejorar la inmunidad de las células T CD8+ específicas al tumor in vivo.

La expresión de PD-L1 en muchos tumores es un componente para esta supresión y puede actuar en concierto con otras señales inmunosupresoras. El PD-L1 regula de manera negativa la señalización del receptor de células T. La expresión de PD-L1 se ha demostrado in situ en una amplia variedad de tumores sólidos, incluyendo cánceres de mama, pulmón, colon, ovarios, melanoma, de vejiga, hígado, salivales, estomacales, gliomas, de tiroides, tímicos, epiteliales, de cabeza y cuello. Brown et al., J. Immunol., 170: 1257-66 (2003); Dong et al., Nat. Med., 8: 793-800 (2002); Hamanishi et al., PNAS 104: 3360-65 (2007); Strome et al., Cancer Res., 63: 6501-5 (2003); Inman et al., Cancer 109: 1499-505 (2007); Konishi et al., Clin. Cancer Res., 10: 5094-100 (2004); Nakanishi et al., Cancer Immunol. Immunother., 56: 1173-82 (2007); Nomi et al., Clin. Cancer Res., 13: 2151-57 (2004); Thompson et al., PNAS 101: 17174-79 (2004); Wu et al., Acta Histochem., 108: 19-24 (2006).

El manchado inmunológico también revela la expresión de PD-1:PD-L en varios cánceres.

De manera interesante, el cáncer también se ha caracterizado como una enfermedad inflamatoria crónica. Coussens et al., Nature 420: 860-867 (2002). Aunque hasta el 15% de los cánceres alrededor del mundo tienen un origen infeccioso directo [Kuper et al., J. Intern. Med., 248: 171-183 (2000)], muchos tumores humanos están relacionados con irritación e inflamación crónica. Zou et al., Ntu. Rev. Cancer 5: 263-274 (2005).

Los estudios relacionados con la expresión de PD-L1 en tumores para el resultado de la enfermedad muestran que la expresión de PD-L1 se correlaciona fuertemente con una prognosis desfavorable en cáncer de riñón, ovario, vejiga, mama, gástrico y pancreático, pero tal vez no en cáncer pulmonar de célula pequeña. Hamanishi et al., Proc. Natl. Acad. Sci., EUA 104: 3360-65

(2007), Inman et al., Cancer 109: 1499-505 (2007), Konishi et al., Clin. Cancer Res., 10: 5094-100 (2004); Nakanishi et al., Cancer Immunol. Immnother., 56: 1173-82 (2007); Nomi et al., Clin. Cancer Res., 13: 2151-57 (2007); Thompson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 101: 17174-79 (2004); Wu et al., Acta Histochem., 108: 19-24 (2006). Además, estos estudios sugieren que más altos niveles de expresión de PD-L1 en tumores pueden facilitar el avance de la etapa de tumor y la invasión en estructuras de tejido más profundas.

La trayectoria PD-1:PD-L también puede jugar un papel en malignidades hematológicas. PD-1 o PD-L1 se expresan raramente en malignidades de células B, pero PD-L2 está sobre-expresado en malignidades de célula de cubierta. Brown et al., supra; Rosenwald et al., J. Exp. Med., 198: 851-62 (2003). PD-L1 se expresa en múltiples células de mieloma, pero no en células de plasma normales. La expansión de las células T en respuesta a las células de mieloma se mejora in vitro mediante el bloqueo de PD-L1. Liu et al., Blood 110: 296-304 (2007). PD-L1 se expresa en algunos linfomas primarios de célula T, particularmente en grandes linfomas anaplásticos de célula T, y PD-L1 se expresa en la red celular dendrítica folicular asociada. Dorfman et al., Am. J. Surg. Pathol., 30: 802-10 (2006). El análisis de micro-disposición sugiere además que las células T asociadas al tumor responden a señales de PD-1 in situ en linfoma de Hodgkin. Chemnitz et al., Blood 110: 3226-33 (2007). PD-1 y PD-L1 se expresan en células T CD4+ en leucemia y linfoma de célula T adulto mediado por HTLV-1. Shimaucho et al., Int. J. Cancer 121: 2585-90 (2007). Estas células de tumor son hipo-responsivas a las señales TCR, y el bloqueo de PD-1 incrementó su expresión de TNF-α, pero no de IFN-γ. Los estudios en modelos animales demuestran que la expresión de PD-L1 en tumores inhibe la activación de células T y la lisis de células de tumor y, en algunos casos, conduce al incremento en la muerte de células T específicas del tumor. Dong et al., Nat. Med., 8: 793-800 (2006); Hirano et al., Cancer Res. 65: 1089-96 (2005).

Por tanto, la supresión de la señalización a través de PD-L1 con los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención, a fin de mejorar la función de las células T, muestra la promesa de atenuar la inmunidad tumoral y, como resultado, puede ser un tratamiento efectivo para el cáncer.

F. Terapias de Combinación

El método de la invención puede combinarse con métodos conocidos de tratamiento de infección crónica o cáncer, ya sea como etapas de tratamiento combinadas o asociadas o como componentes adicionales de una formulación

terapéutica.

1. Cáncer:

El mejoramiento de la función inmune del huésped para combatir tumores es la materia de incrementado interés. Los métodos convencionales incluyen (i) mejoramiento APC, tal como (a) inyección en el tumor de ADN que codifica para aloantígenos de MHC externos, o (b) transfección de células de tumor tomadas por biopsia con genes que incrementan la probabilidad del reconocimiento del antígeno inmune (e.g., citosinas estimuladoras inmunes, GM-CSF, moléculas co-estimuladoras B7.1, B7.2) del tumor, (iii) inmunoterapia celular adoptiva, o tratamiento con células T específicas del tumor activadas. La inmunoterapia celular adoptiva incluye aislar linfocitos T huésped de infiltración al tumor, expandir la población in vitro, tal como a través de la estimulación mediante IL-2 o el tumor, o ambos. Adicionalmente, las células T aisladas que son disfuncionales también pueden activarse mediante la aplicación in vitro de los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención. Las células T que están así activadas pueden re-administrarse entonces al huésped.

Las terapias tradicionales para el cáncer incluyen las siguientes: (i) terapia de radiación (e.g., radioterapia, terapia de rayos X, irradiación) o el uso de radiación ionizante para destruir células cancerosas y encoger tumores. La terapia de radiación puede administrarse ya sea externamente a través de radioterapia de haz externo (EBRT) o internamente a través de braquiterapia; (ii) quimioterapia, o la aplicación de un fármaco citotóxico que generalmente afecta células que se dividen rápidamente; (iii) terapias dirigidas, o agentes que afectan específicamente las proteínas desreguladas de células cancerosas (e.g., los inhibidores de tirosina cinasa, imatinib, geftinib; anticuerpos monoclonales, terapia fotodinámica); (iv) inmunoterapia, o mejoramiento de la respuesta inmune del huésped (e.g., vacunas); (v) terapia hormonal, o bloqueo de hormonas (e.g., cuando el tumor es sensible a hormonas), (vi) inhibidor de angiogénesis, o el bloqueo de la formación y el crecimiento de vasos sanguíneos, y (vii) cuidados paliativos, o el tratamiento dirigido a mejorar la calidad del cuidado para reducir el dolor, náusea, vómito, diarrea y hemorragia. La medicación para el dolor, tal como morfina y oxicodona, anti-eméticos tales como ondansetron y aprepitant, puede permitir regímenes de tratamiento más agresivos.

En el tratamiento del cáncer, puede conducirse cualquiera de los tratamientos convencionales previamente descritos para el tratamiento de la

inmunidad al cáncer, previo, subsecuente o simultáneo con la administración de los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención. Adicionalmente, los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden administrarse previos, subsecuentes o simultáneos con los tratamientos convencionales para el cáncer, tales como la administración de anticuerpos de enlace al tumor (e.g., anticuerpos monoclonales, anticuerpos monoclonales conjugados a toxinas) y/o la administración de agentes quimioterapéuticos.

2. Infección:

En el tratamiento de infección (e.g., aguda y/o crónica), la administración de los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención puede combinarse con tratamientos convencionales además de o a fin de estimular las defensas inmunes naturales del huésped a la infección. Las defensas inmunes naturales del huésped a la infección incluyen, pero no se limitan a inflamación, fiebre, defensa del huésped mediada por anticuerpos, defensas del huésped mediadas por linfocitos T, incluyendo secreción de linfosina y células T citotóxicas (especialmente durante la infección viral), lisis mediada por complemento y opsonización (fagocitosis facilitada) y fagocitosis. La capacidad de los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención para reactivar las células T disfuncionales sería particularmente útil para tratar infecciones crónicas, en particular aquellas en las cuales la inmunidad mediada por células es crítica para la completa recuperación.

a. Bacterias

Para las infecciones que resultan de una infección bacteriana, los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden combinarse mediante su administración simultánea con, previa o subsecuente a, las terapias estándar para tratar la infección bacteriana. Las infecciones bacterianas se tratan ahora más comúnmente con antibióticos antibacterianos, pero también pueden ser efectivos los anticuerpos específicos del patógeno que contienen suero de huéspedes inmunizados.

Las bacterias que son patogénicas como resultado de la secreción de toxinas, (bacterias toxogénicas), la vacunación con toxinas inactivas y/o la administración de agentes terapéuticos que bloquean la toxicidad de las toxinas son comúnmente efectivas (e.g., suero policlonal, anticuerpos, antibióticos, etc.). Estos organismos incluyen Clostridium spp., bacillus spp., Corynebacterium spp., Vibrio chloerae, Bordetella pertussis, Staphylococcus spp., Streptococcus spp. Las bacterias Gram negativas que también responden típicamente a tales terapias tradicionales incluyen Enterobacterias (e.g., Escherichia, Klebsiella, Proteus,

Yersinia, Erwina), Salmonella y Pseudomonas aeruginosa. Las bacterias encapsuladas, que son resistentes a fagocitosis y opsonización, y que, por tanto, previenen frecuentemente un reto más significativo a la limpieza inmune incluyen: Streptococcus spp., Haemophilus spp., Neisseria spp., Klebsiella spp., y Bacterioides fragillis.

Las bacterias evaden las defensas del huésped invadiendo las células a fin de evadir el anticuerpo y el complemento en suero después de un reto particular. La limpieza de estas infecciones es casi totalmente dependiente de la inmunidad mediada por linfocitos T y son especialmente propensas a convertirse en infecciones crónicas. Los ejemplos específicos incluyen Salmonella (S. typhi, S. choleraesuis, S. enteritidis), Legionella spp., Listeria spp., Brucella spp., y Mycobacterium, incluyendo M. tuberculosis, M. avium y M. leprae.

Las espiroquetas, incluyendo Treponema spp., Borrelia spp., y Leptospira spp., son bacterias que ocasionan infecciones persistentes y latentes. Treponema palladium, el patógeno que ocasiona la enfermedad de sífilis es una enfermedad sexualmente transmitida que puede tener severas consecuencias patológicas si se deja sin tratar. La enfermedad progresa a través de distintas etapas. La etapa clínica inicial es una úlcera o chancro en el sitio de la inoculación de treponema. Después de este, está un período de espiroquetemia y distribución metastática de microorganismos que continúa, incluyendo ciclos repetidos de infección y resolución, en una condición conocida como sífilis secundaria. Después de la resolución de la sífilis secundaria, la enfermedad entra en un período de latencia asintomática que puede concluir en sífilis terciaria, la cual es una condición seria y frecuentemente fatal. La sífilis terciaria puede manifestarse en (i) el corazón como formación de aneurisis e insuficiencia secundaria del valor aórtico, (ii) el sistema nervioso central (tubos dorsales, paresis general), (iii) los ojos (queratitis intersticial) o (iv) los oídos (sordera nerviosa). Las formas no venéreas se asemejan a las manifestaciones clínicas de las formas venéreas, pero se transmiten principalmente por contacto directo y mala higiene. Estas incluyen las mandíbulas (T. pallidum subp. pertenue) pinta (T. carateum) y bejel (T. pallidum subsp. endémica).

Los tratamientos para sífilis incluyen penicilina (e.g., penicilina G), tetraciclina, doxiciclina, ceftriazona y azitromicina. Los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención serían más ventajosamente administrados para tratar el período latente de la infección.

La enfermedad de Lyme, ocasionada por Borrelia burgdorferi, se

transmite en humanos a través de mordeduras duras. La enfermedad se manifiesta inicialmente como un salpullido localizado seguido por síntomas similares al resfriado incluyendo malestar, fiebre, dolor de cabeza, cuello rígido y artralgia. Las manifestaciones posteriores pueden incluir artritis migratoria y poliarticular, implicación neurológica y cardiaca con parálisis del nervio craneal y radiculopatía, miocarditis y arritmias. Algunos casos de enfermedad de Lyme se vuelven persistentes dando como resultado un daño irreversible análogo a la sífilis terciaria.

La terapia actual para la enfermedad de Lyme incluye principalmente la administración de antibióticos. Las cepas resistentes al antibiótico pueden tratarse con hidroxicloroquina o metotrexato. Los pacientes refractarios a antibióticos con dolor neuropático pueden tratarse con gabapentina. La minociclina puede ser útil en la enfermedad tardía/crónica de Lyme con manifestaciones neurológicas u otras inflamatorias. Los anticuerpos anti-PD-L1 se administrarían más ventajosamente para tratar el período latente de la infección.

Otras formas de borreliois, tales como las resultantes de B. recurentis, B. hermsii, B. turicatae, B. parikeri, B. hispánica, B. duttonii y B. pérsica, así como de leptospirosis (e.g., L. interrogans), típicamente se resuelven de manera espontánea a menos que las titulaciones en sangre alcancen concentraciones que ocasionen obstrucción intrahepática.

b. Virus

Para infecciones resultantes de causas virales, los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden combinarse mediante la aplicación simultánea con, previo o subsecuente a, la aplicación de terapias estándar para tratar infecciones virales. Tales terapias estándar pueden variar dependiendo del tipo de virus, aunque casi en todos los casos, la administración de anticuerpos que contienen suero humano (e.g., IgA, IgG) específicos al virus puede ser efectiva.

1) Influenza

La infección de influenza da como resultado fiebre, tos, mialgia, dolor de cabeza y malestar, lo cual frecuentemente se presenta en epidemias estacionales. La influenza también está asociada con numerosos trastornos post-infecciosos tales como encefalitis, miopericarditis, síndrome de Goodpasture, y síndrome de Reye. La infección de influenza también suprime las defensas antibacterianas pulmonares normales, de tal manera que la recuperación del paciente de la influenza tiene un riesgo incrementado de desarrollar neumonía bacteriana.

Las proteínas de superficie de la influenza viral muestran una marcada variación antigénica, resultante de la mutación y la recombinación. Por tanto, los linfocitos T citolíticos son el vehículo primario del huésped para la eliminación del virus después de la infección. La influenza se clasifica en tres tipos principales: A, B y C. La influenza A es única en que infecta tanto a humanos como a muchos otros animales (e.g., cerdos, caballos, aves y focas) y es la causa principal de la influenza pandémica. También, cuando se infecta una célula por dos cepas de influenza A diferentes, los genomas de ARN segmentados de dos tipos de virus de origen se mezclan durante la replicación para crear un replicante híbrido, dando como resultado nuevas cepas epidémicas. La influenza B no se replica en animales y por tanto tiene menor variación genética y la influenza C tiene solamente un serotipo único.

Las terapias más convencionales son paliativas de los síntomas que resultan de la infección, aunque la respuesta inmune del huésped realmente despeja la enfermedad. Sin embargo, ciertas cepas (e.g., influenza A) pueden ocasionar enfermedad más seria y la muerte. La influenza A puede tratarse tanto clínicamente como profilácticamente mediante la administración de los inhibidores de aminas cíclicas amantadina y rimantadina, que inhiben la replicación viral. Sin embargo, la utilidad clínica de estos fármacos es limitada debido a la relativamente alta incidencia de reacciones adversas, su estrecho espectro anti-viral (solamente influenza A), y la propensión del virus a volverse resistente. La administración de anticuerpo IgG en suero a las proteínas mayores de superficie de la influenza, hemaglutinina y neuraminidasa, puede prevenir la infección pulmonar, mientras que se requiere IgA mucosa para prevenir la infección del tracto respiratorio superior y la tráquea. El tratamiento actual más efectivo para la influenza es la vacunación con la administración del virus inoculado con formalina o β-propiolactona.

2) Virus de sarampión

Después de una incubación de 9 a 11 días, los huéspedes infectados con el virus de sarampión desarrollan fiebre, tos, coriza y conjuntivitis. Dentro de 1 a 2 días, se desarrolla un salpullido maculopapular eritematoso, que se extiende rápidamente sobre todo el cuerpo. Debido a que la infección también suprime la inmunidad celular, el huésped está en mayor riesgo de desarrollar super-infecciones bacterianas, incluyendo otitis media, neumonía y encefalomielitis post-infecciosa. La infección aguda está asociada con una significativa morbidez y mortalidad, especialmente en adolescentes mal nutridos.

El tratamiento para el sarampión incluye la administración pasiva de IgG humana depositada, la cual puede prevenir la infección en sujetos no inmunes, incluso si se proporciona una semana después de la exposición. Sin embargo, la inmunización previa con virus vivo atenuado es el tratamiento más efecti9vo y evita la enfermedad en más del 95% de los inmunizados. Dado que existe un serotipo de este virus, una sola inmunización o infección da como resultado típicamente la protección de por vida de una subsecuente infección.

En una pequeña proporción de huéspedes infectados, el sarampión puede desarrollarse en SSPE, que es un trastorno neurológico progresivo crónico resultante de la infección persistente del sistema nervioso central. La SSPE se ocasiona por variantes clonales del virus de sarampión con defectos que interfieren con el ensamblaje y el brote del virión. Para estos pacientes, sería deseable la reactivación de las células T con los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención a fin de facilitar la limpieza viral.

3) Virus de hepatitis B

El virus de hepatitis B (HB-V) es el patógeno producido en sangre conocido más infeccioso. Este es la causa principal de la hepatitis aguda y crónica y del carcinoma hepático, así como de la infección crónica de por vida. Después de la infección, el virus se replica en hepatocitos, que después también difunde el antígeno de superficie HBsAg. La detección de niveles excesivos de HBsAg en suero se utiliza como un método estándar para el diagnóstico de una infección por hepatitis B. Una infección aguda puede resolverse o puede desarrollarse en una infección persistente crónica.

Los tratamientos actuales para VHB crónica incluyen α-interferón, que incrementa la expresión del antígeno de leucocito humano clase I (HLA) en la superficie de hepatocitos, facilitando así su reconocimiento por los linfocitos T citotóxicos. Adicionalmente, los análogos de nucleósido, ganciclovir, famciclovir y lamivudina, también han mostrado alguna eficacia en el tratamiento de infección por VHB en pruebas clínicas. Tratamientos adicionales para VHB incluyen α-interferón pegilado, adenfovir, entecavir y telbivudina. Aunque la inmunidad pasiva puede conferirse a través de la administración parental de anticuerpos anti-HBsAg en suero, la vacunación con HBsAg inactivado o recombinante también confiere resistencia a la infección. Los anticuerpos anti.-PD-L1 de la invención pueden combinarse con tratamientos convencionales para infecciones de hepatitis B por ventaja terapéutica.

4) Virus de hepatitis C

La infección por virus de hepatitis C (HC-V) puede conducir a una forma crónica de hepatitis, dando como resultado cirrosis. Aunque los síntomas son similares a las infecciones resultantes de hepatitis B, en contraste distintas a HB-V, los huéspedes infectados pueden ser asintomáticos durante 10 a 20 años. El tratamiento de la infección por VHC incluye la administración de una combinación de α-interferón y ribavirina. Una promisoria terapia potencial para la infección por VHC es el inhibidor de proteasa Telaprevir (VX-960). Los tratamientos adicionales incluyen: anticuerpo anti-PD-1 (MDX-1106, Medarex), bavituximab (un anticuerpo que se enlaza al fosfolípido aniónico fosfatidilserina de una manera dependiente de la glicoproteína B2, Peregrine Pharmaceuticals), anticuerpo(s) E2 de proteína viral de cubierta anti-HPV (e.g., ATL 6865 – Ab68 + Ab65, XTL Pharmaceuticals) y Civacir® (inmunoglobulina humana anti-HCV policlonal). Los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden combinarse con uno o más de estos tratamientos para infecciones por hepatitis C por ventaja terapéutica.

Los inhibidores de proteasa, polimerasa y NS5A que pueden utilizarse en combinación con los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención para tratar específicamente la infección por hepatitis C incluyen los siguientes identificados en la Tabla B.

Tabla B

Inhibidores de proteasa y polimerasa de hepatitis C

Tipo de inhibidor	**Nombre de inhibidor**	**Fabricante(s)**
proteasa	R7227/ITMN 191	Roche/InterMune
	CTS-1027	Roche Biosciences
	VX500, VX813, VX985	Vertex
	Telaprevir (VX950)	Vertex/Tibotec
	TMC435350/TMC 435	Medivir/Tibotec
	Boceprevir (SCH503034), Narlaprevir (SCH900518/SP900518	Schering-Plough
	B1201335, BILN 2061	Boehringer Ingelheim
	MK7009	Merck
	IDX-136, IDX-316	Idenix
	BMS-790052, BMS-791325	Bristol Myers Squibb
	PHX-1766	Phenomix
	ACH-806	Achillion/Gilead
	ACH-1625	Achillion
	ABT-450	Abbott Labs
	VBY 376	Virobay
Inhibidores de polimerasa	R1626	Roche
	R7128	Roche/Pharmasset
	NM283	Idenix

	HCV796	Wyeth
	BILB 1941, BI-207127	Boehringer Ingelheim
	GL60667, GS9190	Gilead
	PF-00868554	Pfizer
	VCH757-VCH916	Virochem
	VX222, VX759	Vertex
	MK-3281	Merck
	ANA598	Anadys
	IDX184, IDX375	Idenix
	PSI-7851	Pharmaset
	ABT-072, ABT-333	Abbott Labs
	BMS650032	Bristol Myers Squibb
Inhibidores NS5A	BMS7900052, BMX824393	Bristol Myers Squibb
	AZD 2836, AZD 7295	Arrow Therapeutics
	GSK 625433	Glaxo Smith Kline

5) Virus de inmunodeficiencia humana (VIH)

El VIH ataca las células CD4+, incluyendo linfocitos T, monocito-macrófagos, células foliculares dendríticas y células de Langerhan, y agota las células auxiliares/inductoras CD4+. Como resultado, el huésped adquiere un severo defecto en la inmunidad mediada por células. La infección con VIH da como resultado el SIDA en al menos el 50% de los individuos y se transmite mediante contacto sexual, administración de sangre o productos de sangre infectados, inseminación artificial con semen infectado, exposición a agujas o jeringas que contienen sangre y transmisión de una madre infectada a un infante durante el nacimiento.

Un huésped infectado con VIH puede ser asintomático, o puede desarrollar una enfermedad aguda que se asemeja a la mononucleosis – fiebre, dolor de cabeza, garganta irritada, malestar y salpullido. Los síntomas pueden progresar a una disfunción inmune progresiva, incluyendo fiebre persistente, sudoraciones nocturnas, pérdida de peso, diarrea inexplicable, eczema, psoriasis, dermatitis seborreica, herpes zoster, candidiasis oral y leucoplaquia oral cabelluda. Las infecciones oportunistas por un huésped de parásitos son comunes en pacientes cuyas infecciones se desarrollan en SIDA.

Los tratamientos para VIH incluyen terapias antivirales que incluyen análogos de nucleósido, zidovudina (AST) ya sea solos o en combinación con didanosina o zalcitabina, dideoxiinosina, dideoxicitidina, lamidvudina, estavudina; inhibidores transcriptivos inversos tales como delavirdina, nevirapina, lovirida e

inhibidores de proteinasa tales como saquinavir, ritonavir, indinavir y nelfinavir. Los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden combinarse con tratamientos convencionales para infecciones por VIH por ventaja terapéutica.

6) Citomegalovirus

La infección por citomegalovirus (CMV) se asocia frecuentemente con infección persistente, latente y recurrente. El CMV infecta y permanece latente en monocitos y células progenitoras de granulocito-monocito. Los síntomas clínicos de CMV incluyen síntomas similares a la mononucleosis (i.e., fiebre, glándulas inflamadas, malestar) y tendencia a desarrollar salpullidos alérgicos en piel a antibióticos. El virus se extiende mediante contacto directo. El virus se dispersa en orina, saliva, semen y a un grado menor en otros fluidos corporales. La transición puede presentarse de una madre enferma a su feto o neonato y mediante transfusión sanguínea y trasplantes de órganos. La infección por CMV da como resultado un daño general de la inmunidad celular, caracterizado por respuestas blastogénicas dañadas a mitógenos no específicos y antígenos de CMV específicos, capacidad citotóxica disminuida y elevación del número de linfocitos CD8 de linfocitos CD4+.

Los tratamientos para infección por CMV incluyen los antivirales ganciclovir, foscarnet y cidovir, pero estos fármacos típicamente se prescriben solamente en paciente inmuno-comprometidos. Los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden combinarse con tratamientos convencionales para infecciones por citomegalovirus por ventaja terapéutica.

7) Virus Epstein-Barr

El virus Epstein-Barr (EBV) puede establecer infecciones persistentes y latentes y ataca principalmente a las células B. la infección con EBV da como resultado la condición clínica de mononucleosis infecciosa, que incluye fiebre, garganta irritada, frecuentemente con exudado, linfadenopatía generalizada y esplenomegalia. También está presente la hepatitis, que puede desarrollarse en ictericia.

Aunque los tratamientos típicos para infecciones por EBV son paliativos de los síntomas, el EBV está asociado con el desarrollo de ciertos cánceres tales como linfoma de Burkitt y cáncer nasofaríngeo. Por tanto, la limpieza de la infección viral antes de que resulten estas complicaciones sería de gran beneficio. Los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden combinarse con tratamientos convencionales para infecciones por virus Epstein-Barr por ventaja terapéutica.

8) Virus de herpes

El virus de herpes simple (VHS) se transmite mediante el contacto directo con un huésped infectado. Una infección directa puede ser asintomática, pero típicamente da como resultado ampollas que contienen partículas infecciosas. La enfermedad se manifiesta como ciclos de períodos activos de enfermedad en los cuales aparecen y desaparecen las lesiones a medida que el virus infecta latentemente los ganglios del nervio para erupciones subsecuentes. Las lesiones pueden estar en la cara, genitales, ojos y/o manos. En algún caso, la infección también puede ocasionar encefalitis.

Los tratamientos para infecciones por herpes se dirigen principalmente a resolver las erupciones sintomáticas e incluyen medicinas antivirales sistémicas tales como: Aciclovir (e.g., Zovirac®), valaciclovir, famciclovir, penciclovir y medicaciones tópicas tales como docosanol (Abreva®), tromantadina y zilactina. La limpieza de las infecciones latentes de herpes sería de gran beneficio clínico. Los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden combinarse con tratamientos convencionales para infecciones por virus de herpes por ventaja terapéutica.

9) HTLV

El virus T-linfotrófico humano (HTLV-1, HTLV-2) se transmite mediante contacto sexual, por amamantar o por exposición a sangre contaminada. El virus activa un subconjunto de células T_H llamadas células Th1, dando como resultado su sobre-proliferación y la sobre-producción de citosinas relacionadas con Th1 (e.g., IFN-γ y TNF-α). Esto a su vez da como resultado la supresión de linfocitos Th2 y la reducción de la producción de citosina Th2 (e.g., IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13), ocasionando una reducción en la capacidad de un huésped infectado para instalar una respuesta inmune adecuada a organismos invasores que requieren una respuesta dependiente de Th2 para su limpieza (e.g., infecciones parasitarias, producción de anticuerpos mucosos y humorales).

Las infecciones por HTLV conducen a infecciones oportunistas que dan como resultado bronquiectasia, dermatitis y super-infecciones con Staphylococcus spp., y Strongyloides spp., dando como resultado la muerte proveniente de sepsis polimicrobiana. La infección por HTLV también puede conducir directamente a leucemia/linfoma de célula T adulto y a una enfermedad de neurona motora superior desmielinizante progresiva conocida como HAM/TSP. La limpieza de infecciones latentes por HTLV sería de gran beneficio clínico. Los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden combinarse con tratamientos

convencionales para infecciones por HTLV por ventaja terapéutica.

10) HPV

El virus de papiloma humano (VPH) afecta principalmente los queratinocitos y se presenta en dos formas: cutáneo y genital. Se cree que la transmisión se presenta a través del contacto directo y/o de la actividad sexual. La infección por VPH tanto cutánea como genital, puede dar como resultado verrugas e infecciones latentes y algunas veces infecciones recurrentes que se controlan por la inmunidad del huésped la cual controla los síntomas y bloquea la aparición de verrugas, pero deja al huésped la capacidad de transmitir la infección a otros.

La infección con VPH también puede conducir a ciertos cánceres, tales como cervical, anal, de vulva, de pene y orofarinial. No existen curas conocidas para la infección por VPH, pero el tratamiento actual es la aplicación tópica de Imiquimod, que estimula al sistema inmune para atacar el área afectada. La limpieza de infecciones por VPH latentes sería de gran beneficio clínico. Los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden combinarse con tratamientos convencionales para infecciones por VPH por ventaja terapéutica.

c. Hongos

Las infecciones por hongos, o micosis, pueden dar como resultado ya sea una infección primaria o una colonización oportunista de los huéspedes con sistemas inmunes comprometidos mediante flora endógena. La inmunidad a micosis es principalmente celular, implicando neutrófilos, macrófagos, linfocitos y probablemente células destructoras naturales (NK). Las micosis típicamente no son susceptibles a la destrucción directa mediante anticuerpo y complemento. Las micosis invasivas sistémicas resultantes de infección primaria incluyen blastomicosis, coccidioidiomicosis, histoplasmosis y paracoccidioidiomicosis. Para infecciones crónicas resultantes de infecciones por hongos, los anticuerpos anti-Pd-L1 de la invención pueden administrarse previo a o simultáneos con o subsecuentes a cualquiera de los tratamientos convencionalmente conocidos para estas micosis.

La blastomiocitis ocasionada por Blastomyces dermatitis se adquiere por inhalación y produce una infección pulmonar primaria o una enfermedad hematogénicamente diseminada que implica predominantemente la piel, los huesos y el tracto genitourinario masculino. La exposición primaria puede ser asintomática, o puede producir un síndrome similar a la influenza. Esta enfermedad puede manifestarse en una forma indolente crónica. La enfermedad también se asocia con inmuno-comprometidos tal como en pacientes con SIDA.

La terapia convencional para la infección por B. dermatitis incluye itraconazol, quetoconazol o inyección intravenosa de anfotericina B.

La coccidioidiomicosis, ocasionada por Coccidioides immitis, se adquiere por inhalación y puede ocasionar infección pulmonar primaria, enfermedad pulmonar progresiva o enfermedad hematogénicamente diseminada que implica predominantemente la piel, los tejidos subcutáneos, los huesos, las articulaciones, y las meninges. La exposición primaria puede ser asintomática (60%) o asociada con un síndrome similar a la influenza. Puede presentarse neumonía, pleuritis, y cavitación pulmonar. Las manifestaciones metastáticas incluyen lesiones en la piel incluyendo nódulos, úlceras, tractos sinusoidales de ubicaciones más profundas y granulomas verrugosos, en huesos, articulaciones, cubiertas de tendón y meninges, incluyendo meningitis. La enfermedad también está asociada con la inmunidad comprometida tal como en pacientes con SIDA. El tratamiento para coccidioidiomicosis incluye quetoconazol, intraconazol y fluconazol, especialmente para terapia de mantenimiento a largo plazo de una enfermedad no meníngea. Las formas meníngeas se tratan comúnmente con la administración intratecal de anfotericina B.

La histoplasmosis ocasionada por Histoplasma capsulatum, es una enfermedad adquirida por inhalación del sistema reticuloendotelial en la cual residen pequeñas levaduras en macrófagos. Ésta puede producir infección pulmonar primaria, enfermedad pulmonar progresiva o enfermedad hematogénicamente diseminada que implica predominantemente el sistema reticuloendotelial, las superficies musculares y las glándulas adrenales. La reactivación de las infecciones latentes se produce frecuentemente en pacientes con inmunidad comprometida, tal como en pacientes con SIDA. La exposición primaria puede ser asintomática o asociada con un síndrome similar al resfriado, incluyendo neumonía, pleuritis, cavitación pulmonar y adenopatía mediastinal. Los sitios metastáticos incluyen el sistema reticuloendotelial (hepatoesplenomegalia, linfadenopatía, anemia, leucopenia y trombocitopenia), las membranas mucosas (ulceraciones oronasofaríngeas), el tracto intestinal (malabsorción), e insuficiencia adrenal. Aunque la mayoría de las infecciones primarias se resuelven espontáneamente, cuando están asociadas con inmunidad comprometida tal como en pacientes con SIDA, la recaída continúa y frecuentemente se asocia con neumonía hematogénica, ARDS, coagulación intravascular diseminada (DIC), papilopústulas hematogénicamente distribuidas y meningitis. La histoplasmosis se trata con anfotericina B (especialmente en pacientes inmuno-comprometidos

agudamente enfermos con diseminación hematogénica), intraconazoles y quetoconazol.

La paracoccidioidiomicosis, ocasionada por Paracoccidioides brasiliensis, es una micosis adquirida por inhalación que puede producir infección pulmonar primaria o enfermedad hematogénicamente diseminada implicando predominantemente la piel, las membranas mucosas, el sistema reticuloendotelial y las adrenales. La infección puede ser inicialmente asintomática pero latente y después revive. El tratamiento de esta infección utiliza quetoconazol, intraconazol y sulfonamidas.

Las micosis invasivas sistémicas resultantes de patógenos oportunistas, que se presentan en huéspedes inmuno-comprometidos, incluyen candidiasis, criptococosis, aspergilosis, mucomicosis y neumocistosis. Al elevar la respuesta inmune en un sistema inmune comprometido, los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención también pueden tener un valor terapéutico en el tratamiento de estas condiciones, especialmente cuando se combinan con terapias convencionales.

Los tratamientos para candidiasis (ocasionada por Candida albicans, C. tropicalis, C. glabrata), criptococosis (ocasionada por Criptococcus neoformans), aspergilosis (ocasionada por Aspergillus flavus, A. fumigatus, A. tereus y A. niger) y mucormicosis (ocasionada por Rhizopus arrhizus, Rhizomuco, Ansidia, Cunninghamella, Mertierella, Saksenaea spp.) pueden tratarse por medio de uno o más de los siguientes, imidazol, quetoconazol, intraconazol, fluconazol, anfotericina B con y sin flucitosina. La neumocistitis (ocasionada por pneumocistis carnii) recientemente reclasificada de protozoarios a hongos, se trata con trimetoprima-sulfametoxol (TMP-SMZ) e isetionato de pentamidina intravenoso, así como con dapsona, TMP-dapsona, trimetrexato, clindamicina-primaquina y atovagnona.

La microsporidiosis ocasionada por parásitos de Microsporidia, se reclasificó recientemente de protozoarios a hongos. Estos son organismos unicelulares que tienen mitosomas en lugar de mictocondrias. Los organismos que pueden ocasionar la muerte en humanos incluyen: Enterocytozoon bieneusi, Encephalitozoon hellem, Encephalitozoon intestinalis, Encephalitozoon cunculim Pleistophora spp., Trachipleistophora hominis, Trachipleistophora anthropophtera, Nosema connori, Nosema ocularum, Brachiola vesicularum, Vittaforma corneae, Microsporidium ceylonensis, Microsporidium africanum, Brachiola algerae.

Se cree que las infecciones se transmiten a humanos por contacto

directo con animales, agua contaminada u otro huésped infectado. Después de infectar las células huésped, el esporoplasma crece, dividiéndose o formando un plasmodio multinucleado que puede tener ciclos vitales complejos que incluyen la reproducción tanto asexual como sexual. La auto-infección por generaciones sucesivas y enfermedades crónicas debilitantes frecuentemente caracterizan las infecciones microsporidiales.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad pueden variar dependiendo de la especie y del estado inmune del huésped e incluyen conjuntivitis (e.g., V. corneae), diarrea crónica, malabsorción y desgaste (e.g., E. bieneusi, E. intestinalis).

Los tratamientos para microsporosis ocular, intestinal y diseminada incluyen la administración de albendazol. La aplicación tópica de fumagilin también puede utilizarse efectivamente para tratar la queratoconjuntivitis microsporidial. Otros fármacos incluyen antihelmínticos (e.g., albendazol), antibióticos (e.g., fumagilin), inmunomoduladores (e.g., talidomida), antiprotozoarios (e.g., metronidazol).

d. Protozoarios

Las enfermedades resultantes de trastornos parasitarios tales como malaria, esquistosomiasis y leishmaniasis, están entre los problemas de salud más prevalentes e importantes en países en desarrollo. Estas enfermedades implican retos particulares debido a que pueden evadir la inmunidad del huésped a través de varios medios, incluyendo: 1) viven dentro de las células huésped (e.g., leishmania), 2) cambian rápidamente los antígenos de superficie (e.g., tripanosomas) y 3) se "disfrazan" como células huésped desplegando antígenos huésped (e.g., esquistosomiasis). El uso de fármacos inmunosupresores en el tratamiento del cáncer y en conjunción con trasplantes de órganos, así como la prevalencia global del SIDA, pueden reactivar infecciones latentes o sub-clínicas de Plasmodium spp., Toxoplasma spp., Leishmania spp., Cryptosporidium spp., Trypanosoma spp., y helmintos.

Para infecciones crónicas resultantes de infecciones con parásitos protozoarios, los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden combinarse mediante su administración en combinación con, previo a, o subsecuente con las terapias estándar anti-protozoarios.

La malaria, ocasionada por parásitos del género Plasmodium (e.g., P. ovale, P. malariae, P. falciparum, P. vivax), comienza el ciclo infeccioso como un esporozito que se desarrolla en el intestino del mosquito anófeles hembra. Al

transmitirse a humanos, estos esporozitos invaden y se multiplican dentro de las células hepáticas sin inducir una reacción inflamatoria. La progenie de estos organismos, llamada merozoitos, invade entonces las células eritrocíticas e inicia la fase clínica de la enfermedad, típicamente caracterizada por fiebre y escalofríos. En áreas del mundo en donde la infección es endémica, casi todos los residentes albergan infecciones crónicas continuas de bajo nivel de patogenicidad baja a moderada, con niveles en incremento de anticuerpos IgG que proporcionan protección de la entrada de merozoitos en eritrocitos.

Los fármacos anti-malaria actualmente disponibles tanto para el tratamiento de la enfermedad clínica como para profilaxis incluyen: artemether-lumefantrina (terapia, e.g., Coartem® y Riamet®), artesunato-amodiaquina (terapia), artesunato-mefloquina (terapia), artesunato-sulfadoxina/pirimetamina (terapia), atovacuona-proguanil, (terapia y profilaxis, e.g., Malarone®), quinina (terapia), cloroquina (terapia y profilaxis), cotrifazid (terapia y profilaxis), doxiciclina (terapia y profilaxis), mefloquina (terapia y profilaxis, e.g., Lariam®), primaquina (terapia en P. vivax y P. ovale solamente; no para profilaxis), proguanil (profilaxis), sulfadoxina-primetamina (terapia y profilaxis), hidroxicloroquina, (terapia y profilaxis, e.g., Plaquenil®).

A través de la reactivación de células T anérgicas, los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden ser particularmente terapéuticos para auxiliar a la limpieza de parásitos de malaria.

La toxoplasmosis, ocasionada por parásitos del género Toxoplasma, es frecuentemente asintomática, pero una pequeña fracción puede desarrollar enfermedad clínica, que puede variar de linfadenopatía benigna aguda hasta infecciones fatales del sistema nervioso central. Las fuentes de infección incluyen quistes en cerdo o carnero crudo o parcialmente cocinado u oocitos pasados en heces de gatos infectados. La infección se presenta en humanos comúnmente a través del tracto gastrointestinal, y los protozoarios pueden penetrar y proliferar (como taquizoitos) virtualmente en cada célula del cuerpo. Estos taquizoitos pueden producir quistes rellenos con cuerpos diminutos inefectivos de crecimiento lento (bradyzoitos) que permanecen viables durante largos períodos de tiempo, dando como resultado una infección crónica latente. Los huéspedes con sistemas inmunes comprometidos tales como los que toman fármacos inmunosupresores o que sufren de VIH, son particularmente propensos a sufrir de toxoplasmosis.

Las medicaciones que se utilizan para tratar la toxoplasmosis primaria incluyen las siguientes: primetamina, con y sin antibióticos adjuntos (e.g.,

sulfadiazina, clindamicina, espiramicina y minociclina). La toxoplasmosis latente puede tratarse con los antibióticos, atovacuona, con y sin clindamicina.

La leishmaniasis, ocasionada por parásitos del género Leishmania, infecta macrófagos de la piel y las vísceras, y se transmite en humanos a través de moscas de arena. Como existe poco o ningún anticuerpo específico en suero, la inmunidad mediada por células a través de células T activadas parece ser una vía crítica mediante la cual se limpia la infección. La Leishmaniasis del Viejo Mundo, también conocida como mal tropical, es ocasionada por diversas especies de Leishmania: L. tropica, K. major y L. aethiopica. La Leishmaniasis del Nuevo Mundo es ocasionada por varias subespecies de L. Mexicana y L. braziliensis. Estos parásitos inducen una fuerte respuesta inmune mediada por células, pero el resultado de la enfermedad clínica también resulta en parte por la respuesta del huésped. Si el huésped instala una respuesta mediada por células suprimida o inadecuada, el resultado es la leishmaniasis cutánea crónica difusa, con poca esperanza de cura espontánea (e.g., L. aethiopica, L. Mexicana). Si el huésped instala una respuesta mediada por células excesiva, la respuesta es una leishmaniasis lupoide o recidiva con la aparición de nódulos linfoides no nucleados persistentes en el borde de las lesiones primarias (e.g., L. tropica). La leishmaniasis recidiva puede aparecer de 1 a 10 años después de la lesión inicial. Existen dos formas de la enfermedad, cutánea y visceral, manifestando la forma cutánea lesiones cutáneas con inmunidad mediada por células críticas para la limpieza. En la forma visceral, la inmunidad mediada por células es insuficiente o no existente y la enfermedad se manifiesta clínicamente como hipergammaglobulinemia de célula B policlonal, leucopenia, esplenomegalia y elevada producción de TNF-α.

Miltefosina (e.g., Impavido®) y paramiocina son tratamientos actualmente disponibles para leishmaniasis tanto cutánea como visceral.

La critosporidiosis, ocasionada por infecciones de protozoarios del género Crytosporidia, resulta del contacto humano directo con excremento fecal de huéspedes infectados. La infección del tejido mucoso intestinal puede dar como resultado diarrea. La enfermedad se manifiesta típicamente como una infección aguda, pero puede volverse crónica, especialmente en individuos inmuno-comprometidos. Los tratamientos son típicamente paliativos, especialmente de hidratación, pero paromomicina, azitromicina e Ig de suero (e.g., Lactobin-R®) han tenido éxito en la limpieza de la infección.

La tripanosomiasis, ocasionada por el parásito Trypanosoma (e.g., T.

brucei, subsp., gambiense, rodesiense, infecta a los humanos y al ganado a través de picaduras de la mosca Tse-tsé. El reto es que este patógeno plantea resultados de generaciones sucesivas de poblaciones desplegando diferentes antígenos de superficie. Las infecciones se caracterizan por elevados niveles de inmunoglobulinas en suero no específicas y no protectoras.

Los tratamientos para tripanosomiasis incluyen la administración intravenosa de los siguientes: pentamidina (para T.b. gambiense), suramina intravenosa (para T.b. rhodesiense), eflornitina, melarsoprol con y sin nifurtimox.

La infección helmíntica, resultante de trematodos (e.g., Schistosoma spp.), cestodos y nematodos comparte las respuestas inmunes comunes con el anticuerpo eosinófilo y reaginico, respuestas que son dependientes de células T.

La esquistosomiasis (aka bilhariza), ocasionada por Shistosoma mansoni, S. japonicum, S. haematobium y S. mekongi, comienza su ciclo de vida como huevos en agua, que después se incuba en miracidia, que penetra en caracoles y crea múltiples generaciones de esporocistos. Estos a su vez producen cercarios de cola triple que pueden infectar la corriente sanguínea de un huésped humano como una esquistosómula que migra inicialmente a los pulmones, y después al hígado. Estas uñas eventualmente forman pares, se acoplan y ponen huevos en las vénulas mesentéricas. Aunque muchos de estos huevos viajan hacia los intestinos y se excretan, algunos quedan atrapados en la sub-mucosa, las vénulas portales del hígado y otros órganos del cuerpo. La inflamación granulomatosa asociada con los huevos atrapados es el síntoma definitivo de esquistosomiasis crónica.

Los tratamientos para la esquistosomiasis incluyen la administración de Praziquantel®, antimonio, Oxamniquine (S. mansoni) y Mirazid®.

Las infecciones por cestodos pueden clasificarse en dos grupos, uno es la solitaria adulta que vive en el intestino tal como Diphyllobothrium latum y Taenia saginara, que tiene un efecto inmune no humoral restringido. El segundo grupo describe una solitaria en larva enquistada en tejido migratoria tal como Hymenolepis nana, Echinococcus granulosus y Taenia solium, que induce fuertes respuestas parenterales del huésped y anticuerpos protectores en suero. La infección por cestodos más seria en humanos es la equinococosis, que, cuando se implanta en el hígado, pulmones, cerebro, riñones u otras partes del cuerpo, puede dar como resultado la formación de quistes hidátide.

Los tratamientos para equinococosis incluyen la administración de metronidazol, albendazol e intervención quirúrgica, tal como el retiro, la aspiración,

la marsupialización o la omentopexia.

Los nematodos son los helmínticos más comunes variada y ampliamente distribuidos que infectan a humanos, ocasionando trastornos tales como triquinosis, ascariasis, filariosis y estrogilodiosis. La triquinosis, ocasionada por Trichinella spiralis, puede resultar de la ingestión de la larva de T. spiralis en carne cruda o parcialmente cocinada tal como de cerdo. En humanos, las infecciones emiten una fuerte respuesta humoral con IgM elevada, seguida por la producción de IgG, seguida por la rápida expulsión de gusanos dañados con anticuerpo mediante linfocitos T.

El único tratamiento conocido para destruir gusanos adultos en el intestino es tiabendazol, aunque no se conoce un tratamiento para matar las larvas.

Áscaris, también conocido como gusano redondo gigante (Ascaris lumbricoides), es un parásito común en humanos que resulta de la ingestión de sustancias contaminadas fecalmente. Aunque los pacientes pueden permanecer asintomáticos durante muy largos períodos de tiempo, a medida que las etapas de larvas viajan a través del cuerpo, éstas pueden ocasionar daño en vísceras, peritonitis e inflamación, agrandamiento del hígado o el bazo, toxicidad y neumonía.

Los tratamientos para ascariasis incluyen la administración de mebendazol (e.g., Vermox®), piperazina, pamoato de pirantel (e.g., Antiminth®, Pin-Rid®, Pin-X®), albendazol, tiabendazol con o sin piperazina, hexilresorcinol, santonina y aceite de Chenopodium. Los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden administrarse en combinación con, previo a o subsecuente a, la administración de estas terapias para el tratamiento de ascariasis.

La filariosis, ocasionada por nematodos filáridos, se introduce en humanos mediante vectores de insecto. Onchocerca volvulus, que ocasiona oncoceriasis o ceguera de río, se transmite por picaduras de la mosca negra. Las larvas infecciosas se anclan subcutáneamente y se desarrollan en adultos, inducen una respuesta fibrogénica del huésped y difunden gran cantidad de microfilaridos que se dispersan subcutáneamente y a través de todo el ojo, induciendo además una queratitis o retinitis que después ocasiona que la córnea se vuelva opaca. La filariasis linfática resulta de la infección por Brugia spp. Y Wuchereria spp. Al paso del tiempo, la cicatrización del tejido linfático, especialmente en el borde, puede evitar el drenado, dando como resultado una condición de desfiguración de elefantiasis.

El tratamiento primario para filariosis es la administració9n del antibiótico ivermectina, albendazol y citrato de dietilcarbamazina (DEC, Hetrazan®) con o sin ivermectina o albendazol. Otros prospectos de tratamiento incluyen doxiciclina, que destruye una bacteria simbiótica, wolbochia.

La estrongiloidosis, ocasionada por parásitos del género Strongyloides (e.g., S. stercoralis, S. fulleborni), es una enfermedad que pasa a humanos a través de suelos fecalmente contaminados. Estos pueden existir tanto en un ciclo vital libre (larvas rabditiformes madurando en gusanos adultos) así como en un ciclo parasitario (larvas filariformes madurando en gusanos adultos) que penetra la piel, viaja a los pulmones, después a la faringe y finalmente reside en el intestino. También se sabe que se presenta la auto-infección con Strongyloides, que esencialmente es la infección repetida por generaciones sucesivas de larvas filariformes.

Las infecciones pueden ser asintomáticas o pueden caracterizarse por dolor y diarrea en el tracto gastrointestinal, síndrome de Löffler en los pulmones (i.e., eosinofilia) y urticaria. La eosinofilia en sangre también puede estar presente. Dado que la infección persistente de Strongyloides puede imitar la úlcera péptica, es común el diagnóstico equivocado de enfermedad de vejiga gall y enfermedad de Crohn. Este es un problema particular en huéspedes inmuno-comprometidos.

Los tratamientos conocidos para Strongyloidosis son ivermectin, albendazol o tiabendazol, pero dado que esta medicación solamente destruye gusanos adultos, es necesaria la administración repetida.

e. Vacunación

La vacunación o la administración de material antigénico para inducir inmunidad a enfermedades se utiliza rutinariamente para prevenir o aminorar los efectos de infección por un patógeno. Puede utilizarse el mejoramiento de la inmunidad del huésped en antígenos no deseados encontrados no solamente en patógenos infecciosos, sino también en tejido del huésped que se ha enfermado (e.g., canceroso). Tradicionalmente, las vacunas se derivan de patógenos completos debilitados o muertos, pero también pueden ser péptidos que representan epítopes en el patógeno intacto que se reconocen específicamente por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad humana (MHC) clase I o clase II. Los antígenos de péptido de particular interés son aquellos que se reconocen específicamente por células T.

Recientemente se ha demostrado que la combinación de una

vacunación terapéutica con la administración de PD-L1 de bloqueo en células T CD8+ agotadas dio como resultado una función y un control viral mejorados en un modelo de ratón de infección crónica. Ha et al., J. Exp. Med., 205(3): 543-555 (2008). Como resultado, los anticuerpos anti-PD-L1 descritos en la presente también pueden combinarse con vacunación de antígeno (e.g., administrada previa, simultánea o posterior) para tratar la infección (e.g., aguda y crónica) que resulta de una invasión viral, bacteriana, por hongos o protozoarios así como de la inmunidad tumoral.

G. Dosis Farmacéuticas:

Las dosis y la concentración del fármaco deseadas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar dependiendo del uso particular contemplado. La determinación de la dosis apropiada o de la vía de administración está dentro de la experiencia del técnico experto. Los experimentos en animales proporcionan una guía confiable para la determinación de las dosis efectivas para terapia en humanos. El escalado inter-especie de las dosis efectivas puede efectuarse siguiendo los principios establecidos por Mordenti, J. y Chappell W., "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics" (El uso de escalado inter-especies en toxicocinética), en Toxicokinetics and New Drug Development (Toxicocinética y desarrollo de nuevos fármacos), Yacobi et al., Eds., Pergamon Press, New York 1989, pp. 42-46.

Cuando se utiliza la administración in vivo de los polipéptidos o anticuerpos descritos en la presente, las cantidades de dosis normales pueden variar de aproximadamente 10 ng/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del mamífero o más por día, preferentemente de aproximadamente 1 mg/kg/día a 10 mg/kg/día, dependiendo de la vía de administración. La guía referente a las dosis y métodos de suministro particulares se proporciona en la literatura: ver, por ejemplo, Patentes de E.U. Nos 4,657,760; 5,206,344; o 5,225,212. Está dentro del alcance de la invención que diferentes formulaciones serán efectivas para los diferentes tratamientos y diferentes trastornos y que la administración destinada a tratar un órgano o tejido específico puede necesitar el suministro de una manera diferente de aquella para otro órgano o tejido. Además, las dosis pueden administrarse por una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se sostiene hasta que se presenta la supresión de los síntomas de la enfermedad deseada. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosis. El progreso de esta terapia se

monitorea fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

H. Administración de la Formulación

La formulación de la presente invención, incluyendo pero sin limitarse a, formulaciones reconstituidas y líquidas, se administra a un mamífero que necesita el tratamiento con el anticuerpo anti-PD-L1, preferentemente un humano, de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa como una inyección rápida o mediante infusión continua durante un período de tiempo, mediante vías intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o de inhalación.

En modalidades preferidas, las formulaciones se administran al mamífero mediante administración subcutánea (i.e., debajo de la piel). Para tales propósitos, la formulación puede inyectarse utilizando una jeringa. Sin embargo, están disponibles otros dispositivos para la administración de la formulación tales como los dispositivos de inyección (e.g., los dispositivos INJECT-EASE™ y GENJECT™); plumas inyectoras (tales como la GENPEN™); dispositivos auto-inyectores, dispositivos sin agujas (e.g., MEDIJECTOR™ y BIOJECTOR™); y sistemas de suministro de parche subcutáneo.

En una modalidad específica, la presente invención se dirige a equipos para una unidad de administración de dosis única. Tales equipos comprenden un contenedor de una formulación acuosa de proteína o anticuerpo terapéutico, que incluye jeringas pre-llenadas de cámara tanto única como múltiple. Las jeringas pre-llenadas ejemplares están disponibles de Vetter GmbH, Ravensburg, Alemania.

La dosis apropiada ("cantidad terapéuticamente efectiva") de la proteína dependerá, por ejemplo, de la condición que va a tratarse, la severidad y el curso de la condición, de si la proteína se administra para propósitos preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, de la historia clínica del paciente y de la respuesta al anticuerpo anti-PD-L1, del formato de la formulación utilizado y de la discreción del médico que atiende. El anticuerpo anti-PD-L1 se administra adecuadamente al paciente en una vez o durante una serie de tratamientos y puede administrarse al paciente en cualquier momento desde el diagnóstico en adelante. El anticuerpo anti-PD-L1 puede administrarse como el único tratamiento o en conjunción con otros fármacos o terapias útiles para tratar la condición en cuestión.

Para los anticuerpos anti-PD-L1, la dosis candidato inicial puede variar de aproximadamente 0.1 a 20 mg/kg para su administración al paciente, que

puede tomar la forma de una o más administraciones separadas. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosis. El progreso de tal terapia se monitorea fácilmente mediante técnicas convencionales.

I. Artículos e Manufactura

En otra modalidad de la invención, se proporciona un artículo de manufactura que contiene la formulación y preferentemente proporciona instrucciones para su uso. El artículo de manufactura comprende un envase. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales (e.g., viales de doble cámara), jeringas (tales como jeringas de cámara única o doble) y tubos de ensayo. El envase puede formarse de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene la formulación. La etiqueta, que está en o asociada con el envase puede indicar instrucciones para su reconstitución y/o uso. La etiqueta puede indicar además que la formulación es útil o está destinada para administración subcutánea y/o para el tratamiento de un trastorno disfuncional de células T. el envase que contiene la formulación puede ser un vial multiusos que permite administraciones repetidas (e.g., de 2 a 6 administraciones) de la formulación reconstituida. El artículo de manufactura puede comprender además un segundo envase que comprende un diluyente adecuado (e.g., BWFI). Al mezclar el diluyente y la formulación liofilizada, la concentración final de proteína en la formulación reconstituida será generalmente de al menos 50 mg/ml. El artículo de manufactura puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e insertos de empaque con instrucciones para su uso.

La invención se entenderá más completamente mediante la referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, éstos no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención. Todas las citas a través de toda la descripción se incorporan expresamente en la presente mediante la referencia.

En otra modalidad, la invención proporciona un artículo de manufactura que comprende la formulación descrita en la presente para su administración en un dispositivo auto-inyector. Un auto-inyector puede describirse4 como un dispositivo de inyección que a su activación, suministrará su contenido son ninguna acción adicional necesaria para el paciente o el suministrador. Éstos son particularmente adecuados para la auto-medicación de formulaciones terapéuticas cuando la tasa de suministro debe ser constante y el tiempo de suministro es mayor que algunos instantes.

EJEMPLO 1

Identificación de Anticuerpos Anti-PD-L1 en Bibliotecas de Fago

Clasificación y Selección de Bibliotecas para Identificar Anticuerpos Anti-PD-L1

Se utilizaron fusiones de Fc de PD-L1 humanas (R&D Systems, cat # 156-B7) y murinas (R&D Systems, cat # 1019-B7) como antígenos para la clasificación alternada de la biblioteca. Específicamente, se clasificaron bibliotecas de fago primeramente contra antígeno humano, seguido por antígeno murino, humano y murino en las tres rondas subsecuentes. Inmuno-placas Nunc de 96 pozos Maxisorp® se recubrieron durante la noche a 4°C con el antígeno objetivo (10 µg/ml) y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con amortiguador de bloqueo de fago PBST (salina amortiguada con fosfato (PBS) y albúmina de suero bovino (BSA) al 1% (peso/volumen) y Tween-20 al 0.05% (volumen/volumen)). Las bibliotecas VH fago de anticuerpo (ver, e.g., Lee et al., J. Immunol. Meth., 284:119-132, 2004) y VH/VL (ver Liang et al., J. Mol. Biol., 366: 815-829, 2007) se agregaron a las placas con antígeno por separado y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Al siguiente día, las placas recubiertas con antígeno se lavaron diez veces con PBT (PBS con Tween-20 al 0.05%) y el fago enlazado se eluyó con 50 mM de HCl y 500 mM de NaCl durante 30 minutos y se neutralizó con un volumen igual de 1 M de base Tris (pH 7.5). Los fagos recuperados se amplificaron en células Blue XL-1 de E. coli. Durante las rondas de selección subsecuentes, la incubación del fago de anticuerpo con las placas recubiertas con antígeno se redujo a 2 a 3 horas y la rigurosidad del lavado de la placa se incrementó gradualmente.

Después de 4 rondas de paneo, se observó un significativo enriquecimiento. Se tomaron 96 clones de cada clasificación de biblioteca VH y VH/VL para determinar si se enlazaron específicamente a PD-L1-Fc tanto humano como murino. Las regiones variables de estos clones se secuenciaron mediante PCR para identificar clones de secuencia única.

Los clones originales de interés se reformatearon en IgGs mediante la clonación de las regiones V_L y V_H de clones individuales en el vector LPG3 y LPG4 (Lee et al., supra), respectivamente, expresándose transitoriamente en células CHO de mamífero y purificándose con una columna de proteína A. Los 13 anticuerpos de fago se evaluaron por su capacidad de bloquear la interacción entre la proteína de fusión PD-1-Fc soluble y el PD-L1 de humano o de ratón

expresado en células 293 (los valores IC 50 se designan en la Tabla 1 – mitad superior). YW243.55, el anticuerpo con la IC_{50} más baja para bloquear el enlace de PD-L1 humano a PD-1 se seleccionó para su subsecuente maduración de afinidad para mejorar su afinidad para PD-L1 tanto humano como de ratón. (Tabla 1). Un anticuerpo con una reactividad cruzada comparable contra especies tanto de primate como murinas (así como retención de afinidad a humanas) proporcionaría un terapéutico de valor mejorado, ya que el mismo anticuerpos que se ha caracterizado en modelos experimentales puede utilizarse en pruebas clínicas en humanos. Esto evita la incertidumbre resultante del uso de un subrogado específico del modelo.

Construcción de Bibliotecas para Mejoramiento de Afinidad de Clones Derivados de la Biblioteca V_H.

El fagémido pW0703 (derivado del fagémido pV0350-2b (Lee et al., J. Mol. Biol., 340: 1073-1093 (2004)), que contiene el codón de paro (TAA) en todas las posiciones de CDR-L3 y que despliega Fab monovalente en la superficie del bacteriófago M13, sirvió como la plantilla de biblioteca para injertar dominios variables de cadena pesada (V_H) de los clones de interés provenientes de la biblioteca V_H para la maduración por afinidad. Se utilizaron estrategias de aleatorización tanto duras como blandas para la maduración por afinidad. Para la aleatorización dura, una biblioteca de cadena ligera con posiciones seleccionadas de las tres CDRs de cadena ligera se aleatorizó utilizando aminoácidos diseñados para imitar a los anticuerpos humanos naturales y la degeneración del ADN diseñado se describió en Lee et al., (J. Mol. Biol., 340, 1073-1093 (2004)). Para la aleatorización blanda, los residuos en las posiciones 91 a 94 y 96 de la CDR-13, 28 a 31 y 34 a 35 de la CDR-H1, 50, 52 y 53 a 58 de la CDR-H2, 95 a 99 y 100A de la CDR-H3 fueron objetivos; y dos combinaciones diferentes de circuitos de CDR, L3/H1/H2 y L3/H3, se seleccionaron para la aleatorización. Para lograr las condiciones de aleatorización blanda, las cuales introdujeron la tasa de mutación de aproximadamente 50% en las posiciones seleccionadas, el ADN mutagénico se sintetizó con mezclas de bases de 70-10-10-10 favoreciendo a los nucleótidos de tipo silvestre (Gallop et al., Journal of Medicinal Chemistry 37: 1233:1251 (1994)).

Clasificación de Fago para Generar Mejoramiento de Afinidad

Los clones de fago previamente identificados se sometieron a clasificación de placas para la primera ronda, seguida por cinco o seis rondas de clasificación de solución. Las bibliotecas se clasificaron contra PD-L1-Fc humana y murina por separado (R&D Systems, cat # 156.B7, cat # 1019-B7,

respectivamente). Para el objetivo PD-L1-Fc humano, en la primera ronda de clasificación de placas, se clasificaron tres bibliotecas contra la placa recubierta objetivo (placa NUNC Maxisorp®) por separado con introducción del fago de aproximadamente 3 O.D./ml en BSA al 1% y Tween 20 al 0.05% durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de la primera ronda de clasificación de placas, se llevó a cabo una clasificación de solución para incrementar la rigurosidad de la selección. Para la clasificación de solución, 1 O.D./ml del fago propagado desde la primera ronda de clasificación de placas se incubaron con 20 nM de proteína objetivo biotinilada (la concentración se basa en el valor IC_{50} del clon original) en 100 µl de amortiguador conteniendo Superblock al 1% (Pierce Biotechnology) y Tween-20 al 0.05% durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó además 10 X con Superblock al 1% y se aplicaron 100 µl/pozo a los pozos recubiertos con neutravidina (5 µ/ml) durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación suave a fin de que el objetivo biotinilado se enlazara al fago. Los pozos se lavaron 10 X con PBS-ween-20 al 0.05%. Para determinar el enlace de fondo, los pozos de control conteniendo el fago con objetivos que no estaban biotinilados se capturaron en placas recubiertas con neutravidina. El fago enlazado se eluyó con 0.1 N de HCl durante 20 minutos, se neutralizó n 1/10 volúmenes de 1 M de Tris, pH 11, se tituló y se propagó para la siguiente ronda. Enseguida, se llevaron a cabo cinco rondas más de clasificación de solución junto con dos métodos para incrementar la rigurosidad de la selección. De éstas la primera es para la selección sobre la tasa disminuyendo la concentración de la proteína objetivo biotinilada de 4 nM a 0.5 nM, y de éstas la segunda es para la selección fuera de tasa agregando cantidades excesivas de la proteína objetivo no biotinilada (100 a 2000 veces más) para que compitan los enlazadores más débiles ya sea a temperatura ambiente o a 37°C. también, la introducción del fago disminuyó (0.1 ~ 0.5 O.D./ml) para disminuir el enlace del fago. Para el objetivo PD-L1-Fc murino, el método de clasificación del fago es similar al descrito anteriormente para el antígeno PD-L1-Fc humano, con algunas modificaciones. Específicamente, se utilizaron 100 nM de PD-L1-Fc murino biotinilado para el paneo de solución inmediatamente después de la primera ronda de paneo de placas. En las cuatro rondas subsecuentes de paneo de solución, el objetivo biotinilado se redujo de 10 nM a 1 nM y se agregó un exceso de 200 a 500 veces del objetivo no biotinilado a temperatura ambiente.

Los clones madurados por afinidad se seleccionaron después adicionalmente con el procedimiento de Selección de Afinidad de Alto Rendimiento

ELISA descrito en el siguiente ejemplo.

Selección de Afinidad de Alto Rendimiento ELISA (Competición de Punto Único)

Se tomaron colonias de las selecciones de la séptima y sexta ronda para el objetivo PD-L1 humano y murino, respectivamente. Las colonias se cultivaron durante la noche a 37°C en 150 µl/pozo de medio 2YT con 50 µg/ml de carbenicilina y 1E10/ml de KO7 en una placa de 96 pozos (Falcon). De la misma placa, se tomó una colonia de fagos de origen infectados con XL-1 como control. Las placas de 96 pozos Nunc Maxisorp® se recubrieron con 100 µl/pozo de proteína PD-L1-Fc humana y murina (2 µ/ml) por separado en PBS a 4°C durante la noche o a temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas se bloquearon con 65 µl de BSA al 1% durante 30 minutos y 40 µl de Tween 20 al 1% durante otros 30 minutos.

El sobrenadante de fago se diluyó a 1:10 en amortiguador (PBS con BSA al 0.5%, Tween 20 al 0.05%) de ELISA (ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzimas) con o sin 10 nM de la proteína objetivo en 100 µl del volumen total y se incubó al menos 1 hora a temperatura ambiente en una placa F (NUNC). 75 µl de la mezcla con o sin la proteína objetivo se transfirieron lado a lado hacia las placas recubiertas con la proteína objetivo. La placa se agitó suavemente durante 15 minutos para permitir la captura del fago no enlazado en la placa recubierta con la proteína objetivo. La placa se lavó al menos cinco veces con PBS – Tween 20 al 0.05%. el enlace se cuantificó agregando anticuerpo anti-M13 conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) en amortiguador de ELISA (1:5000) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS-Tween 20 al 0.05% al menos cinco veces. Enseguida, se agregaron al pozo 100 µl/pozo de una proporción de 1:1 de sustrato de peroxidasa de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y solución B de peroxidasa (H_2O_2) (Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)) y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo agregando 100 µl de 1 M de ácido fosfórico (H_3PO_4) a cada pozo y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. La OD (densidad óptica) del color amarillo en cada pozo se determinó utilizando un lector estándar de placa de ELISA a 450 nm. La reducción de OD (%) se calculó mediante la siguiente ecuación.

reducción de OD_{450nm} (%) = [(OD_{450nm} de los pozos con competidor)/(OD_{450nm} del pozo sin competidor)] x 100

En comparación con la reducción de OD_{450nm} (%) del pozo del fago original (100%), los clones que tuvieron la reducción de OD_{450nm} (%) menor que

50% para el objetivo tanto humano como murino se tomaron para el análisis de secuencia. Los clones únicos se seleccionaron para la preparación del fago para determinar la afinidad de enlace (IC_{50} del fago) contra PD-L1-Fc tanto humano como murino mediante la comparación con los clones de origen.

Materiales

hPD-1-Fc, hPD-L1-Fc, hB7.1-Fc, mPD-L1-Fc y mB7.1 se adquirieron de R & D Systems. hPD-L1 que expresa células 293 se generó en Genentech utilizando técnicas convencionales. El Fc de IgG anti-humano de carba $F(ab')_2$ se adquirió de Jackson ImmunoResearch Laboratories.

Conjugación de Proteínas

Las proteínas PD-1-Fc y B7.1-Fc se biotinilaron con enlazador EZ sulfo-NHS-LC-LC-biotina (Pierce) durante 30 minutos a temperatura ambiente como se describe por el fabricante. El exceso de biotina no reactivada se retiró con columnas Quick Spin de alta capacidad, G50-Sephadex (Roche) como se describe por el fabricante.

El Fc de IgG anti-humano de cabra $F(ab')_2$ se etiquetó con rutenio con MSD sulfo-etiqueta NHS-éster (Meso Scale Discovery) como se describe por el fabricante y el exceso de sulfo-etiqueta no reactivado se retiró con una columna Quick Spin de alta capacidad, G50-Sephadex.

Ensayo de enlace a células por ECL para probar anticuerpos fago

Las concentraciones de anticuerpo resultantes en 50% de inhibición (IC_{50}) del enlace de hPD-1-Fc a hPd-L1 que expresa células 293, se midieron mediante el ensayo de enlace celular por electroquimioluminiscencia (ECL). Las células 293 de expresión de hPD-L1 se lavaron con salina amortiguada con fosfato (PBS) y se sembraron a 25,000 células por pozo en 25 µl de PBS en una placa de 96 pozos de hato enlace (Meso Scale Discovery). La placa se incubó a temperatura ambiente para dejar que las células se unieran a la superficie de carbono de la placa. Se agregaron 25 µl de FBS al 30% a cada pozo y se incubó la placa durante 30 minutos con agitación suave para bloquear los sitios de enlace no específicos. La placa se lavó tres veces con PBS en un lavador de microplaca ELISA (EL x 405 Select, Bio-Tek Instruments) bajo condiciones suaves de suministro y aspiración. Se retiró el exceso de PBS en los pozos limpiando la placa con toallas de papel. Se agregaron 12.5 µl de 2 x la concentración de los anticuerpos a cada pozo en FBS al 3% en PBS (amortiguador de ensayo) y seguidos por 12.5 µl de 4 µg/ml (2 X la concentración) de hPD-1-biotina en amortiguador de ensayo y se incubó la placa durante una hora con agitación

suave. La placa se lavó 3 X con PBS en un lavador de microplaca y la placa se limpió sobre toallas de papel. Se agregaron 25 µl de 2 µg/ml de estreptavidina-rutenio (Meso Scale Discovery) y se incubó en amortiguador de análisis a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación suave. Se lavó 3 X con PBS en el lavador de microplaca y se limpió la placa en toallas de papel. Se agregaron 150 µl de 1 X de amortiguador de lectura MSD sin surfactante (Meso Scale Discovery). Se leyó la luz de luminiscencia emitida a 620 nm en un lector Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery). Los valores de ECL se analizaron con las concentraciones de los anticuerpos de prueba utilizados en el ensayo, utilizando un ajuste de los mínimos cuadrados no lineal de cuatro parámetros, para obtener los valores IC_{50} de cada competidor en el ensayo.

Resultados y Discusión:

Quince anticuerpos de fago únicos derivados de YW243.55 que se enlazaron a PD-L1 tanto humano como murino se seleccionaron y se reformatearon a Anticuerpos de IgG1 de longitud total para su evaluación posterior. Las secuencias de región variable de cadena ligera y pesada de estos anticuerpos se reportan en las Figuras 11ª y B.

Los quince anticuerpos reformateados se probaron por su capacidad para bloquear el enlace de PD-1 a células 293 que expresan PD-L1 ya sea humano o de ratón a través de un ensayo de enlace de células electroquimioluminiscente (ECL). (Tabla 1 – mitad inferior: En la Tabla 1 el "Formato 1" se describe el enlace de PD-1-Fc soluble humano a células 293 transfectadas con PD-L1 humano; el "Formato 2" describe el enlace de PD-1-Fc murino a células 293 transfectadas con PD-L1 murino y el "Formato 3" describe el enlace de PD-1 humano a células 293 transfectadas con PD-L1 murino. Aunque todos los quince anticuerpos mejorados por afinidad habían adquirido una significativa reactividad cruzada al PD-L1 de ratón, se seleccionó YW243.55S70 como el candidato primario a seguir en base a su capacidad de bloquear el enlace de PD-L1 tanto humano como de ratón a PD-1 (Tabla 1: valores IC_{50} de 49 pM y 22 pM, respectivamente).

Tabla 1

Clon	Formato 1	Formato 2	Formato 3
	hPD1-Fc-biotina/hPDL1-293 IC_{50} en nM	mPD1-Fc-biotina/mPDL1-293 IC_{50} en nM	hPD1-Fc-biotina/mPDL1-293 IC_{50} en nM
YW251.11	8.6		
YW243.1	0.234		
YW243.55	0.099		>100
YW254.1	>100	0.795	
YW254.2	>100	3.76	
YW254.3	>100	>100	
YW254.4	1.73	15.6	
YW254.9	>100	0.224	
YW254.33	2.2	>100	
YW262.4	50	1.42	
YW262.5	90	25	
YW262.16	7.5	0.626	
YW262.64	0.256	100	
YW243.55.5	0.104		0.141
YW243.55.8	0.061		0.063
YW243.55.30	0.108		0.100
YW243.55.34	0.084		0.049
YW243.55.49	0.08		0.032
YW243.55.51	0.078		0.031
YW243.55.62	0.096		0.066
YW243.55.84	0.124		0.051
YW243.55.89	0.066		0.13
YW243.55.H12	0.103		0.156
YW243.55.H37	0.109		0.163
YW243.55.H70	0.084		0.042
YW243.55.S1	0.114		0.074
YW243.55.S37	0.100		0.024
YW243.55.S70	0.049		0.022

EJEMPLO 2

Caracterización de Anticuerpos Anti-PD-L1 (BIAcore)

Las afinidades de enlace de los anticuerpos fago anti-PD-L1 YW243.55 y YW243.55S70 contra PD-L1 recombinante de humano y de ratón se midieron mediante resonancia de plasmón de superficie (SRP) utilizando un instrumento BIAcore™. El PD-L1-Fc recombinante humano (R & D Systems, cat # 156-B7) y el PD-L1-Fc recombinante de ratón (R & D Systems, cat # 1019-B7) se recubrieron directamente en chips biosensores CM5 para lograr aproximadamente 500 unidades de respuesta (RU). Para mediciones de cinética, se inyectaron diluciones seriales en dos veces (3.9 nm a 500 nm) en amortiguador PBT (PBS con Tween 20 al 0.05%) a 25°C con una tasa de flujo de 30 µl/minuto. Las tasas de asociación (k_{on}) y la tasa de disociación (k_{off}) se calcularon utilizando un modelo de enlace Languir simple de uno a uno (BIAcore Evaluation Software versión 3.2). La constante de disociación de equilibrio (kD) se calculó como la proporción k_{off}/k_{on}.

Las afinidades de enlace de los clones del anticuerpo fago anti-PD-L1 YW243.55 y YW243.55.S70 medidas se reportan a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2

Afinidades de Enlace BIAcore

clon	rhPD-L1 Fc inmovilizado			rmPD-L1 Fc inmovilizado		
	k_{on}/(1/Ms)	k_{off}/(1/s)	kD (M)	k_{on}/(1/Ms)	k_{off}/(1/s)	kD (M)
YW243.55 (Fab)	5.80 x 10^5	7.30 x 10^{-3}	1.26 x 10^{-8}	--	--	>1 x 10^{-6}
YW243.55 (IgG)	2.70 x 10^5	2.60 x 10^{-4}	9.63 x 10^{-10}	5.80 x 10^4	9.20 x 10^{-3}	1.59 x 10^{-7}
YW243.55. S70 (Fab)	5.30 x 10^5	1.00 x 10^{-4}	1.89 x 10^{-10}	4.80 x 10^5	1.40 x 10^{-3}	2.92 x 19^{-9}
YW243.55. S70 (IgG)	3.90 x 10^5	6.30 x 10^{-5}	1.62 x 10^{-10}	2.80 x 10^5	1.80 x 10^{-4}	6.43 x 10^{-10}

EJEMPLO 3A

Especificidad de anticuerpos anti-PD-L1 para PD-L1 de humano, Rhesus y ratón – FACS y ensayo de enlace celular de radioligando

Este ejemplo muestra la especificidad para el anticuerpo anti-PD-L1 de la invención para PD-L1 de humano, Rhesus y ratón. Además, muestra la afinidad del anticuerpo para PD-L1 de ratón y humano expresado en la membrana celular de células 293 transfectadas.

El PD-L1 de humano y de ratón se transfectó de manera estable en células 293. Las células se cosecharon y se colocaron en placas a 150,000 células por pozo en una placa de 96 pozos para estudios de enlace.

La sangre de Rhesus se obtuvo de la Southwest Foundation for Biomedical Research (San Antonio, Texas). La sangre se diluyó con un volumen igual de PBS y se colocó en Ficoll-Paque al 96% (GE Healthcare) para la separación de las células mononucleares. Las células mononucleares se lisaron de células de glóbulos rojos utilizando amortiguador de lisis de eritrocitos (Qiagen) y se cultivaron durante la noche a 1.5 x 10^6 células/ml con 5 ng/ml de PMA más 1 µM de ionomicina en placas de 6 pozos. El medio de cultivo fue RPMI 1640 con suero fetal bovino al 10%, 20 µM de HEPES y diluciones de 1:100 de los siguientes suplementos de Gibco: Gluta-MAX, piruvato de sodio, penicilina/estreptomicina y aminoácidos no esenciales. Las células se cosecharon al siguiente día y se alicuotaron a una placa de 96 pozos para estudios de enlace (aproximadamente 120,000 células por pozo).

El anticuerpo de PD-L1 YW243.55.S70 o el anticuerpo de control Herceptin® se titularon comenzando a 10 µg/ml, en diluciones seriales de tres veces y se enlazaron a las células en 50 µl volúmenes durante 25 minutos en hielo. Las células se lavaron y después se enlazaron con PE de IgG anti-humano (Caltag) a 20 µg/ml durante 25 minutos en hielo. Las células de Rhesus también se co-mancharon con FITC CD3 y APC CD4 (BD Biosciences) para distinguir las células T CD4+.

Todas las muestras se pasaron en un FACSCalibur Beckman Dickinson y se analizó la intensidad de fluorescencia media de los datos de enlace de PD-L1 como una función de la concentración del anticuerpo anti-PD-L1 utilizando el software Tree Star, Inc., FlowJo®; los valores EC_{50} (concentración del anticuerpo asociada con el enlace medio máximo) se calcularon utilizando Kaleidagraph. Además, se llevaron a cabo estudios de enlace de equilibrio para definir las afinidades precisas (Kds) para el enlace de YW24355S70 a PD-L1 de

humano y de ratón expresado en células 293 (Ejemplo 3B). Estos valores se resumen a continuación en la Tabla 3:

Tabla 3

Sumario de EC_{50}

Especie	EC_{50} (nm) FACS	Kd (nM) enlace de radioligando de equilibrio
humana	0.4	0.4
Rhesus	0.3	
ratón	0.3	0.13
rata	0.8	

EJEMPLO 3B

Medición de afinidad de anticuerpos anti-PD-L1 a PD-L1 de humano y de ratón – Ensayo de Enlace Celular de Radioligando de Equilibrio

Las células 293 transfectadas con PD-L1 humano y de ratón se cultivaron en medio de crecimiento, que consistió de medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS), 2 mM de L-glutamina, 1 X de penicilina-estreptomicina a 37 grados X en CO_2 al 5%. Las células se lavaron con amortiguador de enlace (50:50 DMEM/F12 con FBS al 2% y 50 mM de Hepes, pH 7.2) y se colocaron en placas de 96 pozos a aproximadamente 230,000 células en 0.2 ml de amortiguador de enlace. El anticuerpo anti-PD-L1, YW243.55.S70.hIgG, se yodó utilizando el método Iodogen. Los anticuerpos anti-Pd-L1 radioetiquetados se purificaron a partir de ^{125}I-NA libre mediante filtración en gel utilizando una columna NAP-5; el anticuerpo purificado tuvo una actividad específica de 17.41 µCi/µg. Las mezclas de reacción de competición de 50 µl volúmenes conteniendo una concentración final de anticuerpo yodado y concentraciones disminuidas de anticuerpo no etiquetado diluido serialmente se colocaron en placas de 96 pozos. Líneas celulares 293 transfectadas estables que expresan PD-L1 humano y PD-L1 murino se cultivaron en medio de crecimiento, que consistió de medio 50:50 DMEM/F12 suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS), 2 mM de L-glutamina, 1 X de penicilina-estreptomicina, a 37°C en CO_2 al 5%. Las células se lavaron con amortiguador de enlace (50:50 DMEM/F12 con FBS al 2%, 50 mM de HEPES, pH 7.2 y 2 mM de azida de sodio) y se agregaron a una densidad de aproximadamente 200,000 células en 0.2 ml de amortiguador de enlace a los 50 µl de mezclas de reacción de competición. La

concentración final del anticuerpo yodado en cada reacción de competición con células fue de ~ 50 pM (~ 120,000 cpms por 0.25 ml) y la concentración final del anticuerpo no etiquetado en la reacción de competición con células varió, comenzando en 500 nM y después decreciendo por 2 veces para 10 concentraciones. Las reacciones de competición con células se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. La reacción de competición con células para cada concentración de anticuerpo no etiquetado se analizó por triplicado. Después de 2 horas de incubación, las reacciones de competición se transfirieron a una placa de filtro Millipore Multiscreen y se lavaron 4 X con amortiguador de enlace para separar el anticuerpo yodado enlazado en forma libre. Los filtros se contaron en un contador gamma Wallac Wizard 1470 (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences Inc., Wellesley, MA). Los datos de enlace se evaluaron utilizando software NewLigand (Genentech), que utiliza el algoritmo de ajuste de Munson y Robard para determinar la afinidad de enlace del anticuerpo. Musson et al., Anal. Biochem., 107: 220-39 (1980).

Los valores Kd según se determinan por el análisis Scatchard corroboran los valores EC50 del enlace del anticuerpo anti-PD-L1 a PD-L1 humano y de ratón como se muestra en la Tabla 3.

EJEMPLO 4

Selectividad y Afinidad de anticuerpos anti-PD-L1 (IC_{50})

Este ejemplo muestra el ensayo de selectividad y afinidad de enlace (como IC_{50}) utilizado para evaluar los anticuerpos anti-PD-L1 de longitud total de la presente invención por su capacidad de bloquear el enlace de PD-L1 tanto a PD-1 como a B7.1.

Métodos:

Enlace de hB7.1-Fc-biotina y hPD-1-Fc-biotina a ELISA hPD-L1-Fc (Formato 4):

Una placa Nunc Maxisorp de 384 pozos se recubrió con 25 µl de 250 ng/ml de hPD-L1-Fc en PBS durante la noche. Se lavaron las células tres veces con Tween al 0.05% en PBS (amortiguador de lavado) en un lavador de microplaca y se bloquearon los pozos con BSA al 0.5% en PBS. Se agregaron 12.5 µl de 2 x la concentración de los anticuerpos a cada pozo en Tween al 0.05%, BSA al 0.5% en PBS (diluyente de ensayo) y seguidos por 12.5 µ de 250 ng/ml (2 X la concentración) de hB7.1-Fc-biotina en diluyente de ensayo y se incubó la placa durante una hora y media con agitación. Se lavaron los pozos seis veces con amortiguador de lavado y se agregaron 25 µl de estreptavidina-HRP (1:40,000

en diluyente de ensayo, GE Healthcare). Se incubó la placa durante 30 minutos con agitación y se lavaron los pozos seis veces con amortiguador de lavado. Se agregaron 25 µl de sustrato TMB (Kirkegaard y Perry Laboratories) durante una hora y se detuvo la reacción con 25 µl de 1 M de ácido fosfórico. Se leyó la absorbencia a 450 nm y se analizaron los valores IC_{50} como se describió bajo el ensayo de enlace celular por ECL en el Ejemplo 1.

Formatos 5, 6, 7:

Para el enlace de hPD-1-Fc-biotina a hPD-L1-Fc (Formato 5), el formato es similar al ensayo anterior excepto que se utilizó hPD-1-Fc-biotina en lugar de hB7.1-Fc-biotina para el enlace. El tiempo de reacción del sustrato TMB fue de 17 minutos.

Para el enlace de mB7.1-Fc-biotina a mPD-L1-Fc (Formato 6), el formato es similar al Formato 5, excepto que se utilizó mPD-L1-Fc para recubrir la placa en lugar de hPD-L1-Fc y se utilizó mB7.1-Fc-biotina para el enlace en lugar de hB7.1-Fc-biotina. El tiempo de reacción del sustrato TMB fue de 7 minutos.

Para el enlace de mPD-1-Fc-biotina a mPD-L1-Fc (Formato 7), el formato es similar al ELISA de ratón mencionado anteriormente excepto que se utilizó mPD-1-Fc-biotina para el enlace en lugar de mB7.1-Fc-biotina. El tiempo de reacción del sustrato TMB fue de 5 minutos.

Resultados:

La evaluación de la IC_{50} del anticuerpo anti-PD-L1 de fago madurado por afinidad YW243.55.S70 para bloquear las interacciones entre los pares de enlace designados se reporta en la Tabla 4. YW243.55.S70 fue capaz de bloquear el enlace del PD-L1 humano a hB7.1 Fc con una concentración inhibidora media máxima de 38 pM, una concentración relativamente comparable con su valor IC_{50} para el bloqueo de la interacción de PD-L1/PD-1 (42 pM). Los estudios Biacore que miden la capacidad de YW243.55S70 para bloquear las interacciones de PD-L1 tanto con PD-1 como con B7.1, fueron consistentes con estos resultados de ELISA (datos no mostrados).

Tabla 4

Anticuerpo	Formato 4 hB7.1-biotina/hPD-L1 IC_{50} en pM	Formato 5 hPD-1-biotina/hPD-L1 IC_{50} en pM	Formato 6 mB7.1-biotina/mPD-L1 IC_{50} en pM	Formato 7 mPD-1-biotina/mPD-L1 IC_{50} en pM
YW243.55.S70	38	42	29	48

Mejoramiento de la actividad de las células T Cd4+ y CD8+ in vitro mediante el ensayo in vitro del anticuerpo anti-PD-L1 YW243.55.S70 PMEL/B16

Este ejemplo muestra el efecto de los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención a la activación de células T CD8+ transgénicas del receptor de células T PMEL, medido mediante el mejoramiento de la producción de IFN-γ en respuesta al péptido de melanocito gp100. En este procedimiento, las células T CD8+ se obtienen de ratones transgénicos TCR PMEL cuyas células T CD8+ expresan una TCR específica para el péptido gp100. Después de la purificación de las células T CD8+, se llevan a cabo múltiples rondas de estimulación para generar y expandir las células T CD8+ activadas, que después a su vez sobre-regulan la expresión de PD-1. En paralelo, las células de melanoma B16 se tratan con IFN-γ para sobre-regular su expresión de PD-L1. Después, las células se co-cultivan en presencia del anticuerpo anti-PD-L1 y se evalúa el efecto en la producción de IFN-γ. Las células B16 se seleccionaron para la estimulación terciaria debido a que expresan de manera endógena bajos niveles del péptido gp100 (opuesto a la aplicación endógena del péptido). Además, ya que estas células no expresan PD-L2, B7.1 o B7.2, el efecto de la señalización adicional no relacionada con PD-L1 (e.g., la señalización a través de la señalización inducida de CD28 o CTLA-4 o PD-L2 a través de PD-1) se minimiza.

Ensayo de PMEL:

Como se muestra en la Figura 3, los anticuerpos anti-PD-L1 mejoran tanto el porcentaje de células T CD8+ de PMEL que producen IFN-γ como los niveles promedio del IFN-γ producido en respuesta a las cantidades designadas del péptido gp100.

Ensayo in vitro de D.001.10:

Un ensayo similar utilizando células T CD4+ Tg TCR específicas de Ova muestra la proliferación mejorada de células T en presencia del anticuerpo anti-PD-L1 después de la estimulación con péptido Ova para inducir la expresión de PD-1 (Figura 4). En la estimulación final, las células B A20 irradiadas que expresan PD-L1 se utilizaron para presentar las concentraciones designadas del péptido Ova para las células Y DO.11.10. Notablemente, la contribución del eje PD-1/PD-L1 es más pronunciada a grados más bajos de estimulación del receptor de antígeno, niveles que reflejan más cercanamente la magnitud de estimulación fisiológicamente relevantes.

Materiales y Métodos:

Ensayo de PMEL

Estimulación primaria (día 0 a 4)

El bazo y los nodos linfáticos mesentéricos se cosecharon de ratones transgénicos receptores de células T PMEL. Los órganos se trituraron en suspensiones unicelulares y se lisaron de células de glóbulos rojos. Las células T CD8+ se aislaron utilizando el equipo de aislamiento de células T CD8+ y el separador de células AutoMACS (Miltenyi Biotec) según las instrucciones del fabricante.

El bazo se aisló de un ratón no transgénico sexuado y se trituró en una suspensión unicelular y se lisaron las células de glóbulos rojos. Las células se impulsaron con 0.1 µg/ml de péptido gp100 durante dos horas a 37°C y se lavaron.

Las células se co-cultivaron en una placa de fondo plano de 96 pozos con 200,000 células T CD8+ PMEL y 75,000 esplenocitos impulsados por gp100 durante 4 días. El medio de cultivo fue el medio de Dulbecco modificado de Iscove + suero fetal bovino al 10% + 20 µM de HEPES y diluciones de 1:100 de los siguientes suplementos de Gibco: Gluta-MAX, piruvato de sodio, penicilina/estreptomicina y aminoácidos no esenciales

Estimulación secundaria (día 4 a 7)

Los cultivos de PMEL se hicieron girar y el medio se aspiró utilizando una pipeta multi-canales. Se agregó medio fresco y se mezcló para lavar las células, seguido por otro giro. La mayor parte del medio se retiró y se agregaron los anticuerpos (Herceptin®, YW243.55.S70 o ninguno) para una concentración final de 10 µg/ml. Las condiciones se colocaron en pozos en duplicado de tal manera que pudiera evaluarse la producción promedio de IFN-γ en el criterio de valoración.

Las células DC-1 se impulsaron con 0.1 µg/ml del péptido gp100 durante 2 horas a 37°C y se lavaron. Las células DC-1 impulsadas por gp100 se agregaron a los cultivos de PMEL lavados a 40,000 células/pozo. PMEL y el anticuerpo DC-1 se co-cultivaron durante 3 días.

Tercera estimulación (día 7 a 8)

Un día antes de la tercera estimulación en el día 6, se incubaron las células B16 de melanoma con 20 ng/ml de IFN-γ de ratón (R & D Systems) durante la noche para sobre-regular su expresión PD-L1.

En el día 7, los cultivos de PMEL se hicieron girar y el medio se aspiró utilizando una pipeta multi-canales. Se agregó medio fresco y se mezcló seguido por otro giro. La mayor parte del medio se retiró y se agregaron los

anticuerpos para una concentración final de 10 µg/ml.

Después de después de la estimulación durante la noche con IFN-γ, las células B16 se lavaron y se dividieron en tres grupos para una incubación de dos horas ya sea sin gp100, con gp100 a 1 ng/ml (gp100 bajo) y con gp100 a 10 ng/ml (gp100 alto). Las células se lavaron y después se agregaron a los cultivos de PMEL lavado + anticuerpo a 40,000 células por pozo y se incubaron juntos durante la noche.

Día 8 manchado intracelular con IFN-γ

Se agregó Golgi-Plug (BD Biosciences) durante las últimas 5 horas del cultivo según las instrucciones del fabricante. El manchado intracelular con IFN-γ se efectuó utilizando el equipo Cytofix/Cytoperm de fijación/permeabilización de BD Biosciences según las instrucciones del fabricante y todos los anticuerpos de manchado fueron también de BD Biosciences. Las células se mancharon en superficie con CD8a PE y las FITC Thy1.1 intracelular se mancharon con IFN-γ APC en concentraciones de saturación.

Todas las muestras se pasaron en un FACSCalibur Beckman Dickinson y los datos se analizaron utilizando software FLOWJO™ de Tree Star, Inc.

Ensayo in vitro de D011.10

Se cosechó el bazo y los nodos linfáticos mesentéricos de ratones transgénicos DO11.10, se trituraron en suspensiones unicelulares y se lisaron de células de glóbulos rojos. Las células se cultivaron durante 72 horas a una densidad de 1 x 10^6 células por ml en placas de 6 pozos con péptido Ova a 0.3 µM. El medio de cultivo fue RPMI 1640 + suero fetal bovino al 10% + 20 µM de HEPES y diluciones de 1:100 de los siguientes suplementos de Gibco: Gluta-MAX, piruvato de sodio, penicilina/estreptomicina y aminoácidos no esenciales.

Después de la estimulación primaria, las células se cosecharon y se purificaron para células T CD4+ utilizando un equipo de purificación de células T CD4 de ratón según las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec). Las células T CD4+ purificadas se dejaron reposar durante la noche.

Al día siguiente, las células se cosecharon, se lavaron y se co-cultivaron con células A20 irradiadas (10,000 rads). El co-cultivo se colocó en placas de fondo en U de 96 pozos en pozos por triplicado, con 50,000 células T CD4+ a 40,000 células A20 con péptido Ova titulado y anticuerpo a una concentración final de 20 µg/ml. Después de 48 horas, los cultivos se impulsaron durante la noche con 1 µCi/pozo de 3H-timidina y se congelaron el día siguiente.

Las placas se descongelaron más tarde, se cosecharon en un cosechador celular y se leyeron en un contador beta.

EJEMPLO 6

Proliferación mejorada de células T CD8+ humanas en una Reacción Mezclada de Linfocitos mediante anti-PD-L1

La Figura 5 demuestra la capacidad de anti-PD-L1 (e.g., YW243.55.S1) para mejorar la proliferación de células T CD8 humanas en respuesta a las células de un donante no emparejado MHC. Las células T CD8+ que responden se enriquecieron de la sangre completa de un Donante A utilizando primero células T CD8+ RosetteSep® (StemCell Technologies) según las instrucciones del fabricante. Las células se diluyeron entonces por un volumen igual de salina amortiguada con fosfato (PBS) y se separaron mediante centrifugación de gradiente colocándolas en Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). Después de la separación, las células se mancharon con APC CD8 (BD Biosciences) y se encontró que eran 78% células T CD8+. Las células se etiquetaron de manera fluorescente con 2.5 µM de tinte rastreador CFSE (Molecular Probes).

Para servir como células alogénicas que presentan antígeno (APCs), las células mononucleares se aislaron primero a partir de la sangre completa del Donante B y después se agotaron de células T CD3+. La sangre se diluyó con un volumen igual de PBS y las células mononucleares se aislaron después de la centrifugación de gradiente sobre Ficoll. Las células se mancharon con FITC CD3 (BD Biosciences), se lavaron y después se incubaron con microgránulos anti-FITC (Miltenyi Biotec). Las células positivas FITC CD3 se agotaron entonces en el separador celular AutoMACS (Miltenyi Biotec). Las células se irradiaron entonces a 2500 rads en un irradiador de cesio.

Las células se co-cultivaron en una placa de fondo plano de 96 pozos con 150,000 células T CD8+ y 150,000 APCs durante 5 días con anticuerpos a 10 µg/ml. El medio de cultivo fue RPMI 1640 + suero fetal bovino al 10% + 20 µM de HEPES y diluciones de 1:100 de los siguientes suplementos de Gibco: Gluta-MAX, piruvato de sodio, penicilina/estreptomicina y aminoácidos no esenciales.

En el día 5, las células se cosecharon, se lavaron y se mancharon con CD8-biotina seguido por estreptavidina-PerCp (BD Biosciences). Las

muestras se pasaron en un FACSCalibur Beckman Dickinson y los datos se analizaron utilizando software FlowJo de Tree Star, Inc.

Se observó un mejoramiento de aproximadamente 45% en la proliferación de células T CD8 que responden a células de un donante sin emparejar con MHC en presencia del anti-PD-L1.

EJEMPLO 7

Efectos del bloqueo de PD-L1 en un modelo de LCMV in vivo

Las células T bajo condiciones de estimulación crónica han demostrado sobre-regular y sostener la expresión del receptor inhibitorio PD-1. La ligación de PD-1 mediante cualquiera de sus dos ligandos PD-L2 y PD-L2 contribuye al estado refractario de la célula T crónicamente activada, atenuando su respuesta a su antígeno cognado. En ratones persistentemente infectados con virus linfocítico de coriomeningitis (LCMV), el bloqueo de PD-1 o de su ligando PD-L1 es suficiente para revitalizar las células T crónicamente refractarias, mejorando la magnitud y la calidad funcional de la respuesta de la célula T anti-viral. De manera similar, los humanos crónicamente infectados con VIH o VHC exhiben células T refractarias a la estimulación cuya actividad puede mejorarse in vitro mediante el bloqueo de PD-L1 o PD-L2. En consecuencia, la actividad del bloqueo de PD-L1 en el modelo de LCMV sugiere un potencial terapéutico para mejorar la inmunidad anti-viral o anti-tumor.

Para los experimentos de LCMV in vivo en el ratón, hemos reformateado el anticuerpo anti-PD-L1 humanizado (YW243.55S70), clonando las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera derivadas de fago en corriente ascendente de los dominios constantes de cadena pesada de IgG2a de ratón y de cadena ligera kappa de ratón. Para evitar la citotoxicidad mediada por el anticuerpo de células que expresan PD-L1, inhibiendo el enlace del receptor Fcγ, las posiciones 265 (ácido aspártico) y 297 (asparagina) se cambiaron a alanina (DANA). Shields R.L. et al., J. Biol. Chem., 2001 276(9): 6591-6604. Para probar la capacidad del anticuerpo anti-PD-L1 para mejorar la inmunidad anti-viral en una infección crónica, los ratones se infectaron en el día 0 con 2×10^6 unidades formadoras de placa (pfu) de LCMV del clon 14 o de la cepa Armstrong de LCMV como control de referencia. La esquemática del diseño experimental aparece en la Figura 6. La infección con el clon 13 da como resultado una infección crónica caracterizada por células T que se expanden pero que son incapaces de despejar efectivamente el virus, mientras que el LCMV Armstrong se despeja dentro de 8 a 10 días de la infección. En el día 14, los ratones comenzaron el tratamiento ya

sea con anti-PD-L1 o mIgG de control suministrado en dosis de 10 mg/kg 3 veces/semana. En los días 21 y 28, se llevó a cabo el análisis de la función de células T CD8 y las titulaciones virales en sangre y tejidos.

Consistente con los datos publicados por Barber et al., Nature 439:682-7 (2006), este ejemplo muestra la capacidad del anticuerpo anti-PD-L1 para mejorar la respuesta citotóxica del linfocito a LCMV después de un régimen de tratamiento de 2 semanas en una infección crónica por LCMV. La Figura 7A muestra el % de células T CD8 que expresan CD107a en su superficie celular en respuesta al péptido específico de LCMV gp33. La expresión de membrana en plasma de CD107a, normalmente expresada intracelularmente, acompaña el proceso de desgranulación y en consecuencia sirve como un marcador subrogado para la desgranulación. En relación a la respuesta de las células de la infección aguda por LCMV Armstrong, las células provenientes de animales infectados con la cepa crónica, el clon 13, se dañan en la desgranulación (grupo Ig de control), mientras que el bloqueo de PD-L1 fue capaz de restaurar la desgranulación de CD8+ a niveles comparables a los observados en la infección Armstrong. De manera similar, 7B demostró un % incrementado de células T CD8 que producen IFN-γ en respuesta al gp33 de LCMV en el grupo tratado con anti-PD-L1 relativo al Ig de control.

Enseguida, se probó el impacto del anticuerpo anti-PD-L1 en la reducción o erradicación del virus de LCMV en sangre y tejidos. En la Figura 8A, las gráficas muestran titulaciones log del virus en el tejido de Ig de control indicado y en animales tratados con PD-L1 en el día 21 y 28 después de la infección con LCMV del clon 13. El tratamiento con anticuerpo se inició en el día 14 posterior a la infección. El bloqueo de PD-L1 dio como resultado una reducción altamente significativa en las titulaciones virales en sangre, hígado, cerebro, pulmones y riñón. De manera imprevista, en 3 de 5 ratones, el anticuerpo α-PD-L redujo las titulaciones de LCMV en sangre a niveles por debajo de la detección ($< 1 \times 10^{-5}$). En un experimento subsecuente de diseño comparable, la erradicación del virus en sangre e hígado se observó en 5/5 ratones tratados durante 2 semanas con anti-PD-L1 en dosis ya sea de 10 mg/kg o de 2 mg/kg 3 veces/semana (datos no mostrados). La gráfica inferior muestra la cinética de reducción de titulaciones virales en la sangre y demuestra una reducción promedio de 96.8% en el grupo tratado con anti-PD-L1 en el día 28 en relación al control. Los datos sostienen la importancia de la trayectoria de PD-1/PD-L1 en la inhibición de las respuestas de las células T en infecciones crónicas y son consistentes con los efectos del

bloqueo de PD-L1 in vitro en células T obtenidas de humanos con infecciones crónicas tales como hepatitis C y VIH.

Materiales y Métodos:

Determinación % de la producción de IFN-gamma por medio de células T CD8 en respuesta al péptido gp33 de LCMV

Se aislaron los bazos de ratones infectados y se generó una suspensión unicelular triturando los órganos en medio completo: IMD; (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) conteniendo suero fetal bovino al 10% inactivado con calor, 2 mM de L-glutamina, 10 U/ml de penicilina/estreptomicina y 10 mM de 2-mercaptoetanol. Las células de glóbulos rojos se lisaron utilizando amortiguador de lisis ACK (0.15 M de NH_4Cl, 10 mM de $KHCO_3$, 0.1 mM de EDTA). Para medir las respuestas de células T CD8 específicas del antígeno, los esplenocitos se lavaron en medio completo y se re-estimularon in vitro durante 4 horas con el péptido de LCMV gp33 (KAVYNFATC, ProImmunr Inc., Bradenton, FL.). se cultivaron 1 x 10^6 esplenocitos en placas de fondo plano de 96 pozos con 100 ng/ml del péptido gp33 en presencia de 100 unidades/ml (dilución 1:1000) de monesina (BD Pharmingen) y FITC anti-CD107a (clon ID4B, BD Biosciences, San Jose, CA). Después de la incubación, las células se lavaron una vez en PBS conteniendo suero fetal bovino al 2% y los marcadores de superficie celular se mancharon utilizando anticuerpos conjugados a fluorócromo: APC anti-CD8 (clon 53.67, BD Biosciences, San Jose, CA) PerCp-Cy5.5 anti-CD4 (clon RM4-5, BD Biosciences, San Jose, CA) y PE anri-PD-1 (clon J43, BD Biosciences, San Jose, CA). El manchado para IFN-γ intracelular se efectuó utilizando el equipo Cytofix Cytoperm Plus (BD Biosciences, San Jose, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando PE-Cy7 anti-IFN-γ (Clon XMG1.2, eBioscience Inc. San Diego, CA). Para detectar el número de células T CD8 específicas de gp33, los esplenocitos frescos se mancharon con pentámeros de gp33 (H2-Db enlazado a APC, ProImmune Inc. Bradenton, FL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos se recolectaron utilizando un BD FACSAria (BD Biosciences, San Jose, CA) y se analizaron con software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland OR).

Determinaciones de las titulaciones virales de LCMV:

Se infectan células MC57 de fibrosarcoma con diluciones seriales de 10 veces de sangre o tejido conteniendo LCMV homogenado en IMDM completo. La reacción se incuba entonces durante 2 a 6 horas en un incubador de cultivo de tejido a 37°C, después se cubre con DMEM conteniendo metilcelulosa al 1%. A

esto le sigue la incubación durante 3 a 5 días, después se retira la capa de metilcelulosa mediante aspiración. Las células se fijan con PBS/paraformaldehído al 4%, después se permeabilizan con Triton-x al 0.5% durante 20 minutos, se lavan con PBS, después se bloquean con FCS al 10% durante 1 hora con oscilación suave. El manchado para LCMV se efectúa con anticuerpo VL4 (1 hora), se lava 2 veces, después se revela con HRP anti-rata (1:400) en amortiguador de bloqueo. A esto le sigue un lavado 3 x, después se agrega sustrato de o-fenilenodiamina (SIGMA P8806-50TAB 3 mg/tableta) a los pozos para el revelado.

EJEMPLO 8

Bloqueo de PD-L1 en cáncer

Ahora es aparente que muchos tumores explotan la expresión de los ligandos de PD-1 como un medio para atenuar las respuestas de las células T anti-tumor. Varios cánceres se han caracterizado por expresar elevados niveles de PD-L1 tanto en tumores como en leucocitos de infiltración en tumor y esta elevada expresión de PD-L1 se asocia frecuentemente con una peor prognosis. Los modelos de tumor en ratón demuestran incrementos similares en la expresión de PD-L1 dentro de tumores y demuestran un papel para la trayectoria de PD-1/PD-L1 en la inhibición de la inmunidad tumoral.

Aquí presentamos un experimento que demuestra el impacto del bloqueo de PD-L1 en el crecimiento de tumor ortotópico de células de carcinoma colorrectal murino MC38.Ova en ratones C57B6 singénicos (Figura 9A). Estas células expresan ovalbúmina mediante la transducción retroviral y expresan PD-L1, pero no PD-L2 en su superficie celular como se evaluó mediante citometría de flujo (histograma – Figura 10A). Se inoculó a los ratones de manera subcutánea con 0.5 millones de células MC38.Ova en el día 0. En el día 1 o en el día 14 se trató a los ratones (cuando los tumores habían alcanzado un tamaño promedio de 250 mm^3) 10 ratones/grupo, con 10 mg/kg de anti-PD-L1 (YW243.55S70 de ratón IgG2a-DANA), Ig de control, o anticuerpo anti-CTLA4 de bloqueo, (UC10-4F10-11) 3 veces/semana por la duración del estudio. El bloqueo de PD-L1 ya sea en intervención temprana o tardía es altamente efectivo como una terapia de agente único en la prevención del crecimiento del tumor. En contraste, el bloqueo de CTLA4, otra molécula inhibidora expresada en células T, no mostró evidencia de inhibir el crecimiento del tumor. Estos resultados demuestran el papel único del eje PD-1/PD-L1 sobre CTLA4/B7 en la supresión de la respuesta inmune anti-tumor y soportan el potencial para el tratamiento de cánceres humanos con

anticuerpos que bloquean la interacción de PD-L1 con PD-1 y B7.1.

Modelo de tumor singénico MC38.Ova: Métodos. En el día 0, se inoculó a 70 animales de manera subcutánea con 0.5 millones de células MC38.Ova en 100 microlitros de HBSS + matrigel. Comenzando en el día 20, se reclutó a los ratones en uno de 2 grupos de tratamiento (ver abajo: grupo 1 o grupo 2). Se dejaron crecer los tumores en los 40 ratones restantes hasta el día 14. De estos 40, se reclutaron 30 ratones con tumores de tamaño similar en uno de 3 grupos de tratamiento (Grupos 3 a 5). Los tumores se midieron y se pesó a los ratones 2 veces/semana. Se eutanizaron los ratones no reclutados en los grupos de tratamiento siguientes, debido a un volumen de tumor disímil:

Grupo 1: anticuerpo anti-gp120, 10 mg/kg IP, 100 µl, D1, 3x/semana

Grupo 2: anticuerpo anti-PD-L1, 10 mg/kg IP, 100 µl, D1, 3x/semana

Grupo 3: anticuerpo anti-gp120, 10 mg/kg IP, 100 µl, D14, 3x/semana

Grupo 4: anticuerpo anti-PD-L1, 10 mg/kg IP, 100 µl, D14, 3x/semana

Grupo 5: anticuerpo anti-CTLA-4, 10 mg/kg IP, 100 µl, D14, 3x/semana

***los Grupos 1 y 2 comenzaron la dosificación en el D1; los Grupos 3, 4 y 5 en el D14.

EJEMPLO 9

Combinaciones de anti-PD-L1 con otros agentes para proporcionar un efecto anti-tumor o terapia de mejoramiento inmune – modelo MC38.Ova

En el día 0, se inoculó a 150 animales de manera subcutánea con 0.5 millones de células MC38.Ova en 100 microlitros de HBSS + matrigel. Se dejaron crecer los tumores en los ratones. Se pesó a los ratones y se midieron 2x/semana hasta el día 11 (cuando el volumen del tumor está entre 100 a 200 mm^3). En el día 11, después de la medición de tumor, se reclutó a los ratones en 1 de los doce grupos de tratamiento siguiente. Se eutanizaron los ratones no reclutados en los grupos de tratamiento siguientes, debido a un volumen de tumor disímil. El tratamiento con gemcitabina (Grupo 4) comienza en el día 12, mientras que el tratamiento para los grupos de anticuerpo restantes comienza en el día 14. Todos los volúmenes son de 100 µl en vehículo inerte, con detalles adicionales como se reporta a continuación:

Grupo 1: anticuerpo anti-gp120, 10 mg/kg IP, 100 µl, 3x/semana x 5, n = 10

Grupo 2: anticuerpo anti-PD-L1, 10 mg/kg IP, 100 µl, 3x/semana x 5, n = 10

Grupo 3: anticuerpo anti-VEGF, 5 mg/kg IP, 100 µl, 2x/semana x 5, n = 10

Grupo 4: gemcitabina, 40 mg/kg IP, 100 µ, Día 12, 16, 20, n = 10

Grupo 5: anticuerpo anti-PD-L1 p anticuerpo anti-gp120, n = 10

Grupo 6. Anticuerpo anti-PD-L1 + anticuerpo anti-VEGF, n = 10

Grupo 7: anticuerpo anti-PD-L1 + gemcitabina, n = 10

Grupo 8: anticuerpo anti-gp120 + gemcitabina, n = 10

Grupo 9: anticuerpo anti-gp120 + anti-VEGF, n = 10

Día 12: Los ratones del grupo 1 se sangran (10 microlitros) retro-orbitalmente bajo anestesia para análisis CBC

Día 14 y día 22: Los ratones del grupo 4 se sangran (100 microlitros) retro-orbitalmente bajo anestesia para análisis CBC.

Día 19: Todos los ratones, excepto el grupo 4, se sangran (100 microlitros) retro-orbitalmente bajo anestesia para análisis CBC.

Día 26: Todos los ratones, excepto el grupo 4, se sangran (100 microlitros) retro-orbitalmente bajo anestesia para análisis PK.

Se miden los tumores y se pesa a los ratones 2 X/semana. Los animales que exhiben pérdida de peso de > 15% se pesará diariamente y se eutanizarán si pierden > 20% del peso corporal. Se eutanizará a los ratones cuando los volúmenes de tumor excedan 3,000 mm^3, o después de 3 meses si no se forman tumores.

Este estudio demuestra (Figura 10) que el bloqueo de PD-L1 fue más efectivo que α-VEGF y un régimen inductivo de gemcitabina solo.

EJEMPLO 10

Expresión del anticuerpo anti-PD-L1 en células de mamífero

Este ejemplo ilustra la preparación de formas potencialmente glicosiladas de anticuerpo anti-PD-L1 mediante expresión recombinante en células de mamífero.

El vector, pRK5 (ver EP 307,247, publicada en Marzo 15 de 1989), se emplea como el vector de expresión. Opcionalmente, el ADN que codifica para la cadena ligera y/o pesada del anticuerpo se liga en pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción de tal ADN utilizando métodos de ligación tales como los descritos en Sambrook et al., supra.

En una modalidad, las células huésped seleccionadas pueden ser células 293. Las células 293 humanas (ATCC CCL 1573) se cultivan para confluir en placas de cultivo de tejido en un medio tal como DMEM suplementado con suero fetal de ternera y opcionalmente, componentes nutritivos y/o antibióticos. Aproximadamente 10 µg del ADN que codifica para el anticuerpo pRK5 se

mezclan con aproximadamente 1 µg del ADN que codifica para el gen ARN VA [Thimmappaya et al., Cell, 31: 543 (1982)] y se disuelve en 500 µl de 1 mM de Tris-HCl, 0.1 mM de EDTA, 0.227 M de $CaCl_2$. A esta mezcla se agrega, por goteo, 500 µl de 50 mM de HEPES (pH 7.35), 280 mM de NaCl, 1.5 mM de $NaPO_4$ y se deja formar un precipitado durante 10 minutos a 25°C. El precipitado se suspende y se agrega a las células 293 y se deja reposar durante aproximadamente cuatro horas a 37°C. El medio de cultivo se aspira y se agregan 2 ml de glicerol al 20% en PBS durante 30 segundos. Las células 293 se lavan entonces con medio libre de suero, se agrega medio fresco y las células se incuban durante aproximadamente 5 días.

Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, el medio de cultivo se retira y se reemplaza con medio de cultivo (solo) o medio de cultivo conteniendo 200 µCi/ml de ^{35}S-cisteína y 200 µCi/ml de ^{35}S-metionina. Después de una incubación de 12 horas, se recolecta el medio acondicionado, se concentra en un filtro giratorio y se carga en un gel de SDS al 15%. El gel procesado puede secarse y exponerse a la película durante un período de tiempo seleccionado para revelar la presencia del anticuerpo. Los cultivos que contienen células transfectadas pueden experimentar una incubación adicional (en medio libre de suero) y el medio se prueba en bioensayos seleccionados.

En una técnica alternativa, el anticuerpo puede introducirse en células 293 transitoriamente utilizando el método de dextrano sulfato descrito por Somparyrac et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981). Las células 293 se cultivan a densidad máxima en un matraz giratorio y se agregan 700 µg del ADN que codifica para el anticuerpo pRK5. Las células se concentran primeramente desde el matraz giratorio mediante centrifugación y se lavan con PBS. El precipitado de ADN-dextrano se incuba en el gránulo celular durante cuatro horas. Las células se tratan con glicerol al 20% durante 90 segundos, se lavan con medio de cultivo de tejido y se reintroducen en el matraz giratorio conteniendo medio de cultivo e tejido, 5 µg/ml de insulina bovina y 0.1 µg/ml de transferrina bovina. Después de aproximadamente cuatro días, el medio acondicionado se centrifuga y se filtra para retirar las células y polvo. La muestra que contiene el anticuerpo expresado puede entonces concentrarse y purificarse mediante cualquier método seleccionado, tal como diálisis y/o cromatografía de columna.

En otra modalidad, el anticuerpo puede expresarse en células CHO. El ADN que codifica para el anticuerpo ligado en pRK5 puede transferirse en células CHO utilizando reactivos tales como $CaPO_4$ o DEAE-dextrano. Como se

describió anteriormente. Los cultivos celulares pueden incubarse y reemplazar el medio con medio de cultivo (solo) o con un medio conteniendo una radioetiqueta tal como ^{35}S-metionina. Después de determinar la presencia del anticuerpo, el medio de cultivo puede reemplazarse con medio libre de suero. Preferentemente, los cultivos se incuban por aproximadamente 6 días y después el medio acondicionado se cosecha. El medio conteniendo el anticuerpo expresado puede concentrarse entonces y purificarse mediante cualquier método seleccionado.

Las variantes de epítope del anticuerpo también pueden expresarse en células CHO huésped. El ADN que codifica para el anticuerpo ligado en pRK5 puede subclonarse fuera del vector de pRK5. El inserto de subclon puede experimentar PCR para fusión en marco con una etiqueta de epítope seleccionada tal como una etiqueta de poli-his en un vector de expresión de baculovirus. El ADN etiquetado con poli-his que codifica para el inserto de anticuerpo puede subclonarse en un vector activado con SV40 conteniendo un marcador de selección tal como DHFR para la selección de clones estables. Finalmente, las células CHO pueden transfectarse (como se describió anteriormente) con el vector activado con SV40. El etiquetado puede llevarse a cabo, como se describió anteriormente, para verificar la expresión. El medio de cultivo que contiene el anticuerpo etiquetado con poli-His expresado puede concentrarse y purificarse después mediante cualquier método seleccionado, tal como cromatografía de afinidad con quelado Ni^{2+}.

El anticuerpo también puede expresarse en células CHO y/o COS mediante un procedimiento de expresión transitoria o en células CHO mediante otro procedimiento de expresión estable.

La expresión estable en células CHO se lleva a cabo utilizando el siguiente procedimiento. Las proteínas se expresan como una construcción IgG (inmunoadhesina), en la cual las secuencias de codificación para las formas solubles (e.g., los dominios extracelulares) de las proteínas respectivas se fusionan a una secuencia de región constante de IgG1 que contiene la articulación, los dominios CH2 y CH2 y/o una forma etiquetada con poli-His.

Después de la amplificación PCR, los ADNs respectivos se subclonan en un vector de expresión de CHO utilizando técnicas estándar como se describe en Ausubel et al., Current Protocols of Molecular Biology., Unidad 3.16, John Wiley and Sons (1997). Los vectores de expresión de CHO se construyen para tener sitios de restricción compatibles 5= y 3= del ADN de interés para permitir un recocido conveniente de ADNc=s. El vector utilizado en la expresión

de células CHO es como se describe en Lucas et al., Nucl. Acids Res., 24:9 (1774-1779 (1996) y utiliza el promotor/mejorador primario de SV40 para activar la expresión del ADNc de interés y de dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de DHFR permite la selección para el mantenimiento estable del plásmido después de la transfección.

Doce microgramos del ADN de plásmido deseado se introducen en aproximadamente 10 millones de células CHO utilizando reactivos de transfección comercialmente disponibles SUPERFECT® (Quiagen), DOSPER®, o FUGENE® (Boehringer Mannheim). Las células se cultivan como se describe en Luca et al., supra. Aproximadamente 3 x 10^{-7} células se congelan en una ámpula para su crecimiento y producción adicional como se describe más adelante.

Las ámpulas que contienen el ADN de plásmido se descongelan mediante su colocación en un baño de agua y se mezclan mediante giro. Los contenidos se pipetean en un tubo de centrífuga conteniendo 10 ml de medio y se centrifugan a 1000 r.p.m. durante 5 minutos. El sobrenadante se aspira y las células se re-suspenden en 10 ml de medio selectivo (0.2 □m de PS20 filtrado con 5% 0.2 □m de suero fetal bovino diafiltrado). Las células se alicuotan después en un mezclador de giro de 100 ml conteniendo 90 ml de medio selectivo. Después de 1 a 2 días, las células se transfieren a un mezclador de giro de 250 ml relleno con 150 ml de medio de crecimiento selectivo y se incuban a 37°C. Después de otros 2 a 3 días, se siembran mezcladores de giro de 250 ml, 500 ml y 2000 ml con 3 x 10^5 células/ml. El medio celular se intercambia con medio fresco mediante centrifugación y re-suspensión en el medio de producción. Aunque puede emplearse

Cualquier medio CHO adecuado, puede utilizarse realmente un medio de producción descrito en la Patente de E.U. No. 5,122,469, expedida en Junio 16, 1992. Un mezclador de giro de producción de 3 litros se siembra a 1.2 x 10^6 células/ml. En el día 0 se determina el número de células y el pH. En el día 1, se muestrea el mezclador de giro y comienza el rociado con aire filtrado. En el día 2, se muestrea el mezclador de giro, se cambia la temperatura a 33°C y se toman 30 ml de 500 g/l de glucosa y 0.6 ml de antiespumante al 10% (e.g., emulsión de polidimetilsiloxano al 35%, Dow Corning emulsión de grado médico 365). A través de toda la producción, el pH se ajusta según sea necesario para mantenerlo alrededor de 7.2. Después de 10 días, o hasta que la viabilidad caiga por debajo de 70%, el cultivo celular se cosecha mediante centrifugación y se filtra a través de un filtro de 0.22 □m. El filtrado ya sea se almacenó a 4°C o se cargó

inmediatamente en columnas para su purificación.

Para las construcciones etiquetadas con poli-His, las proteínas se purifican utilizando una columna Ni-NTA (Quiagen). Antes de la purificación, se agrega imidazol al medio acondicionado a una concentración de 5 mM. El medio acondicionado se bombea sobre una columna Ni-NTA de 6 ml equilibrada a 4°C en 20 mM de amortiguador HEPES, pH 7.4, conteniendo 0.3 M de NaCl y 5 mM de imidazol a una tasa de flujo de 4 a 5 ml/minuto. Después de cargarse, la columna se lava con amortiguador de equilibrado adicional y la proteína se eluye con amortiguador de equilibrado conteniendo 0.25 M de imidazol. La proteína altamente purificada se desala subsecuentemente en un amortiguador de almacenado conteniendo 10 mM de HEPES, 0.14 M de NaCl y manitol al 4%, pH 6.8, con una columna G25 Superfine de 25 ml (Pharmacia) y se almacena a -80°C.

Las construcciones de inmunoadhesina (conteniendo Fc) se purifican a partir del medio acondicionado como sigue. El medio acondicionado se bombea sobre una columna de proteína A de 5 ml (Pharmacia) que se ha equilibrado en 20 mM de amortiguador de fosfato Na, pH 6.8. Después de la carga, la columna se lava extensivamente con amortiguador de equilibrado antes de la elusión con 100 mM de ácido cítrico, pH 3.5. la proteína eluida se neutraliza inmediatamente recolectando fracciones de 1 ml en tubos conteniendo 275 □l de 1 M de amortiguador Tris, pH 9. La proteína altamente purificada se desala subsecuentemente en amortiguador de almacenado como se describió anteriormente para las proteínas etiquetadas con poli-His. La homogeneidad se evalúa mediante geles de poliacrilamida SDS y mediante secuenciado de aminoácido de terminal N mediante degradación Edman.

EJEMPLO 11

Expresión del anticuerpo anti-PD-L1 en E. coli

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma no glicosilada del anticuerpo anti-PD-L1 mediante expresión recombinante en E. coli.

La secuencia de ADN que codifica para el anticuerpo anti-PD-L1 se amplifica inicialmente utilizando iniciadores de PCR selectos. Los iniciadores deben contener sitios de enzima de restricción que corresponden a los sitios de enzima de restricción en el vector de expresión seleccionado. Puede emplearse una variedad de vectores de expresión. Un ejemplo de un vector adecuado es pBR322 (derivado de E. coli; ver Bolivar et al., Gene, 2:95 (1977)) que contiene genes para resistencia a ampicilina y tetraciclina. El vector se digiere con enzima de restricción y se desfosforila. Las secuencias amplificadas con PCR se ligan

entonces en el vector. El vector incluirá preferentemente secuencias que codifican para un gen de resistencia al antibiótico, un promotor de trp, un guía poli-his (incluyendo los primeros seis codones STII, la secuencia polihis y el sitio de división de enterocinasa), la región de codificación de NPOR, el terminador transcripcional lambda, y un gen argU.

La mezcla de ligación se utiliza entonces para transformar una cepa de E. coli seleccionada utilizando los métodos descritos en Sambrook et al., supra. Los transformadores se identifican por su capacidad para crecer en placas LB y entonces se seleccionan las colonias resistentes al antibiótico. El ADN de plásmido puede aislarse y confirmarse mediante análisis de restricción y secuenciado de ADN.

Los clones seleccionado pueden cultivarse durante la noche en medio de cultivo líquido tal como caldo LB suplementado con antibióticos. El cultivo nocturno puede utilizarse subsecuentemente para inocular un cultivo a mayor escala. Las células se cultivan entonces a una densidad óptica deseada, durante lo cual el promotor de expresión se activa.

Después de cultivar las células durante varias horas más, las células pueden cosecharse mediante centrifugación. El gránulo celular obtenido mediante la centrifugación puede solubilizarse utilizando diversos agentes conocidos en la técnica, y el anticuerpo solubilizado puede purificarse entonces utilizando una columna de quelado metálica bajo condiciones que permitan un enlace estrecho del anticuerpo.

El anticuerpo anti-PD-L1 también puede expresarse en E. coli en una forma etiquetada con poli-His, utilizando el siguiente procedimiento. El ADN que codifica para el anticuerpo se amplifica inicialmente utilizando iniciadores de PCR seleccionados. El iniciador contiene sitios de enzima de restricción que corresponden con los sitios de enzima de restricción en el vector de expresión seleccionado y otras secuencias útiles que proporcionan un inicio de translación eficiente y confiable, una rápida purificación en una columna de quelado metálica y el retiro proteolítico con enterocinasa. Las secuencias etiquetadas con poli-His amplificadas mediante PCR se ligan entonces en un vector de expresión, que se utiliza para transformar un huésped de E. coli en base a la cepa 52 (W3110 fuhA(tonA) lon galR rpoHts(htpRtd) clpP(laclq). Los transformadores se cultivan primero en LB conteniendo 50 mg/ml de carbenicilina a 30°C con agitación hasta alcanzar una O.D. de 600 de 3 a 5. Después se diluyen los cultivos de 50 a 100 veces en medio CRAP (preparado mezclando 3.57 g $(NH_4)_2SO_4$, 0.71 g de citrato

de sodio $A2H_2$=, 1.07 g de KCl, 5.36 g de extracto de levadura Difco, 5.36 g de hicasa SF Sheffield en 500 ml de agua, así como 110 mM de MPOS, pH 7.3, 0.55% (peso/volumen) de glucosa y 7 mM de $MgSO_4$) y se cultivan durante aproximadamente 20 a 30 horas a 30°C con agitación. Las muestras se retiran para verificar la expresión mediante análisis SDS-PAGE y el cultivo en volumen se centrifuga para granular las células. Los gránulos celulares se congelan hasta su purificación y replegado.

La pasta de E. coli de fermentaciones de 0.5 a 1 litro (gránulos de 6 a 10 g) se re-suspende en 10 volúmenes (peso/volumen) en 7 M de guanidina, 20 mM de Tris, amortiguador pH 8. Se agrega sulfito de sodio sólido y tetrationato de sodio para producir concentraciones finales de 0.1 M y 0.02 M respectivamente, y la solución se agita durante la noche a 4°C. Esta etapa da como resultado una proteína desnaturalizada con todos los residuos de cisteína bloqueados por la sulfitolización. La solución se centrifuga a 40,000 r.p.m. en una ultracentrífuga Beckman durante 30 minutos. El sobrenadante se diluye con 3 a 5 volúmenes de amortiguador de columna de quelado metálica (6 M de guanidina, 20 mM de Tris, pH 7.4) y se filtra a través de filtros de 0.22 micras para clarificarse. Dependiendo de la condición, el extracto clarificado se carga sobre una columna de quelado metálica Ni-NTA Quiagen de 5 ml equilibrada en el amortiguador de columna de quelado metálica. La columna se lava con amortiguador adicional conteniendo 50 mM de imidazol (Calbiochem, grado Utrol), pH 7.4. La proteína se eluye con amortiguador conteniendo 250 mM de imidazol. Las fracciones que contienen la proteína deseada se depositaron y se almacenaron a 4°C. La concentración de proteína se estima por medio de su absorbencia a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción calculado en base a su secuencia de aminoácidos.

Las proteínas se repliegan diluyendo la muestra lentamente en amortiguador de replegado recién preparado que consiste de: 20 mM de Tris, pH 8.6, 0.3 M de NaCl, 2.5 M de urea, 5 mM de cisteína, 20 mM de glicina y 1 mM de EDTA. Los volúmenes de replegado se seleccionan de tal manera que la concentración de proteína esté entre 50 y 100 microgramos/ml. La solución replegada se agita suavemente a 4°C durante 12 a 36 horas. La reacción de replegado se templa mediante la adición de TFA hasta una concentración final de 0.4% (pH de aproximadamente 3). Antes de la purificación de la proteína, la solución se filtra a través de un filtro de 0.22 micras y se agrega acetonitrilo hasta una concentración final de 2 a 10%. La proteína replegada se cromatografía en una columna de fase inversa Poros R1/H utilizando un amortiguador móvil de TFA

al 0.1% con elusión con un gradiente de acetonitrilo de 10 a 80%. Los alícuotas de las fracciones con absorbencia A280 se analizan en geles de poliacrilamida SDS y las fracciones que contienen proteína replegada homogénea se depositan. Generalmente, las especies apropiadamente replegadas de la mayoría de las proteínas se eluyen a las concentraciones más bajas de acetonitrilo dado que esas especies son más compactas con sus interiores hidrófobos protegidos de la interacción con la resina de fase inversa. Las especies agregadas se eluyen comúnmente a concentraciones de acetonitrilo más altas. Además de disolver las formas no plegadas de proteínas a partir de la forma deseada, la etapa de fase inversa también retira la endotoxina de las muestras.

Las fracciones que contienen los anticuerpos anti-PD-L1 plegados deseados se depositan y se retira el acetonitrilo utilizando una corriente suave de nitrógeno dirigida a la solución. Las proteínas se formulan en 20 mM de HEPES, pH 6.8, con 0.14 M de cloruro de sodio y manitol al 4% mediante diálisis o mediante filtración de gel utilizando resinas G25 Superfine (Pharmacia) equilibradas en el amortiguador de formulación y filtradas de manera estéril.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en donde:

(a) la secuencia HVR-H1 es GFTFSX$_1$SWIH (SEQ ID NO: 1);

(b) la secuencia HVR-H2 es AWIX$_2$PYGGSX$_3$YYADSVKG (SEQ ID NO: 2);

(c) la secuencia HVR-H3 es RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 3);

en donde además: X_1 es D o G; X_2 es S o L; X_3 es T o S.

2. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde X_1 es D; X_2 es S y X_3 es T.

3. El polipéptido de la reivindicación 1, que comprende además secuencias marco de región variable de cadena pesada yuxtapuestas entre las HVRs de acuerdo con la fórmula: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4).

4. El polipéptido de la reivindicación 3, en donde las secuencias marco se derivan de secuencias humanas de estructura de consenso.

5. El polipéptido de la reivindicación 4, en donde las secuencias marco son estructuras de consenso del subgrupo III de VH.

6. El polipéptido de la reivindicación 5, en donde una o más de las secuencias marco 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 WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 7).

7. El polipéptido aislado de cadena pesada de la reivindicación 1, en combinación con una cadena ligera de región variable que comprende una HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, en donde:

(a) la secuencia HVR-L1 es RASQX$_4$X$_5$X$_6$TX$_7$X$_8$A (SEQ ID NO: 8);

(b) la secuencia HVR-L2 es SASX$_9$LX$_{10}$S (SEQ ID NO: 9);

(c) la secuencia HVR-L3 es QQX$_{11}$X$_{12}$X$_{13}$X$_{14}$PX$_{15}$T (SEQ ID NO: 10);

en donde además: X_4 es D o V; X_5 es V o I; X_6 es S o N; X_7 es A o F; X_8 es V o L; X_9 es F o T; X_{10} es Y o A; X_{11} es Y, G, F o S; X_{12} es L, Y, F o W; X_{13} es Y, N, A, T, G, F o I; X_{14} es H, V, P, T o I; X_{15} es A, W, R, P o T.

8. El polipéptido de la reivindicación 7, en donde X_4 es D; X_5 es V; X_6 es S; X_7 es A; X_8 es V; X_9 es F; X_{10} es Y; X_{11} es Y; X_{12} es L; X_{13} es Y; X_{14} es

H; X_{15} es A.

9. El polipéptido de la reivindicación 7, que comprende además secuencias marco de cadena ligera de región variable yuxtapuestas entre las HVRs de acuerdo con la fórmula: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4).

10. El polipéptido de la reivindicación 9, en donde las secuencias marco se derivan de secuencias humanas de estructura de consenso.

11. El polipéptido de la reivindicación 10, en donde las secuencias marco son la estructura de consenso kappa I de VL.

12. El polipéptido de la reivindicación 11, en donde una o más de las secuencias marco es la siguiente:

LC-FR1 es DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 11)

LC-FR2 es WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 12)

LC-FR3 es GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 13)

LC-FR4 es FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 14).

13. Un anticuerpo anti-PD-L1 aislado o fragmento de enlace al antígeno que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y una de cadena ligera en donde:

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

(i) la secuencia HVR-H1 es GFTFSX_1SWIH (SEQ ID NO: 1)

(ii) la secuencia HVR-H2 es AWIX_2PYGGSX_3YYADSVKG (SEQ ID NO: 2)

(iii) la secuencia HVR-H3 es RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 3) y

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

(iv) la secuencia HVR-L1 es RASQ$X_4X_5X_6TX_7X_8$A (SEQ ID NO: 8);

(v) la secuencia HVR-L2 es SASX_9LX_{10}S (SEQ ID NO: 9);

(vi) la secuencia HVR-L3 es QQ$X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}PX_{15}$T (SEQ ID NO: 10);

en donde: X_1 es D o G; X_2 es S o L; X_3 es T o S; X_4 puede ser D o V; X_5 puede ser V o I; X_6 puede ser S o N; X_7 puede ser A o F; X_8 puede ser V o L; X_9 puede ser F o T; X_{10} puede ser Y o A; X_{11} puede ser Y, G, F o S; X_{12} puede ser L, Y, F o W; X_{13} puede ser Y, N, A, T, G, F o I; X_{14} puede ser H, V, P, T o I; X_{15} puede ser A, W, R, P o T.

14. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación

13, en donde X_1 es D; X_2 es S y X_3 es T.

15. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 13, en donde X_4 = D; X_5 = V; X_6 = S; X_7 = A; y X_8 = V; X_9 = F; y X_{10} = Y; X_{11} = Y; X_{12} = L; X_{13} = Y; X_{14} = H; y X_{15} = A.

16. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 13, en donde X_1 = D; X_2 = S y X_3 = T, X_4 = D; X_5 = V; X_6 = S; X_7 = A, y X_8 = V; X_9 = F; y X_{10} = Y; X_{11} = Y; X_{12} = L; X_{13} = Y; X_{14} = H y X_{15} = A.

17. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, que comprende además:

(a) secuencias marco de cadena pesada de región variable yuxtapuestas entre las HVRs de acuerdo con la fórmula: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4) y

(b) secuencias marco de cadena ligera de región variable yuxtapuestas entre las HVRs de acuerdo con la fórmula: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4).

18. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 17, en donde las secuencias marco se derivan de secuencias humanas de estructura de consenso.

19. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 18, en donde las secuencias marco de cadena pesada de región variable son la estructura de consenso del subgrupo III de VH.

20. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 19, en donde una o más de las secuencias marco 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 WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 7).

21. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 18, en donde las secuencias marco de cadena ligera de región variable son la estructura de consenso kappa I de VL.

22. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 21, en donde una o más de las secuencias marco es la siguiente:

LC-FR1 es DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 11)

LC-FR2 es WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 12)

LC-FR3 es GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID

NO: 13)

LC-FR4 es FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 14).

23. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 18, en donde:

(a) las secuencias marco de cadena pesada variable son las siguientes:

(i) HC-FR1 es EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 4);

(ii) HC-FR2 es WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 5);

(iii) HC-FR3 es RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 6);

(iv) HC-FR4 es WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 7); y

(b) las secuencias marco de cadena ligera variable son las siguientes:

(i) LC-FR1 es DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 11);

(ii) LC-FR2 es WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 12);

(iii) LC-FR3 es GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 13);

(iv) LC-FR4 es FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 14).

24. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 23, que comprende además una región constante humana.

25. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 24, en donde la región constante se selecciona del grupo que consiste de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4.

26. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 25, en donde la región constante es IgG1.

27. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 23, que comprende además una región constante murina.

28. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 27, en donde la región constante se selecciona del grupo que consiste de IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3.

29. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 28, en donde la región constante es IgG2A.

30. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de las reivindicaciones 25 ó 28 que tiene una función efectora reducida o mínima.

31. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación

30, en donde la mínima función efectora resulta de una mutación de Fc no efectora.

32. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 31, en donde la mutación de Fc no efectora es N297A.

33. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 31, en donde la mutación de Fc no efectora es D265A/N297A.

34. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 30, en donde la mínima función efectora resulta de la aglicosilación.

35. Un anticuerpo o fragmento de enlace al anticuerpo que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y una de cadena ligera, en donde:

(a) la cadena pesada comprende una secuencia HVR-H1, HVR-H2 y una HVR-H3 que tiene una identidad de secuencia total de al menos 85% para GFTFSDSWIH (SEQ ID NO: 15), AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 16) y RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 3), respectivamente, y

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

36. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 35, en donde la identidad de secuencia es de al menos 90%.

37. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 36, que comprende además:

(a) secuencias marco de cadena pesada de región variable (VH) yuxtapuestas entre las HVRs de acuerdo con la fórmula: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4); y

(b) secuencias marco de cadena ligera de región variable (VL) yuxtapuestas entre las HVRs de acuerdo con la fórmula: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4).

38. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 37, que comprende además una región de estructura VH y VL derivada de una secuencia humana de consenso.

39. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 38, en donde la secuencia marco VH se deriva de la secuencia del subgrupo Kabat I, II o III.

40. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación

39, en donde la secuencia marco VH es una secuencia marco de consenso del subgrupo Kabat III.

41. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 40, en donde las secuencias marco VH son las siguientes:

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 WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 7).

42. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 38, en donde la secuencia marco VL se deriva de una secuencia del subgrupo I, II, III o IV Kabat kappa.

43. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 42, en donde la secuencia marco VL es una secuencia marco de consenso kappa I Kabat.

44. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 43, en donde las secuencias marco VL son las siguientes:

LC-FR1 es DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 11)

LC-FR2 es WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 12)

LC-FR3 es GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 13)

LC-FR4 es FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 14).

45. Un anticuerpo anti-PD-L1 aislado o fragmento de enlace al antígeno que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y una de cadena ligera, en donde:

(a) la secuencia de cadena pesada tiene una identidad de secuencia de al menos 85% para la secuencia de cadena pesada: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISP YGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDY WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 20); y

(b) la secuencia de cadena ligera tiene una identidad de secuencia de al menos 85% para la secuencia de cadena ligera: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 21).

46. El anticuerpo o fragmento de enlace al antígeno de la

reivindicación 45, en donde la identidad de secuencia es de al menos 90%.

47. Un anticuerpo anti-PD-L1 aislado o fragmento de enlace al antígeno que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y una de cadena ligera, en donde:

(a) la cadena pesada comprende la secuencia: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISP YGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDY WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 20); y

(b) la cadena ligera comprende la secuencia: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 21).

48. Una composición que comprende el anticuerpo anti-PD-L1 o fragmento de enlace al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 47 y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

49. Un ácido nucleico aislado que codifica para el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

50. Un ácido nucleico aislado que codifica para una secuencia variable de cadena ligera o de cadena pesada de un anticuerpo anti-PD-L1 o fragmento de enlace al antígeno, en donde:

(a) la cadena pesada comprende además una secuencia HVR-H1, HVR-H2 y una HVR-H3 que tiene una identidad de secuencia de al menos 85% para GFTFSDSWIH (SEQ ID NO: 15), AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 16) y RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 3), respectivamente, o

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

51. El ácido nucleico de la reivindicación 50, en donde la identidad de secuencia es de 90%.

52. El ácido nucleico de la reivindicación 50, en donde el anticuerpo anti-PD-L1 comprende además una región de estructura VL y una VH derivadas de una secuencia humana de consenso.

53. El ácido nucleico de la reivindicación 52, en donde la secuencia VH se deriva de una secuencia del subgrupo Kabat I, II o III.

54. El ácido nucleico de la reivindicación 52, en donde la

secuencia VL se deriva de una secuencia del subgrupo kappa I, II, III o IV Kabat.

55. El ácido nucleico de la reivindicación 50, en donde el anticuerpo anti-PD-L1 comprende una región constante derivada de un anticuerpo murino.

56. El ácido nucleico de la reivindicación 50, en donde el anticuerpo anti-PD-L1 comprende una región constante derivada de un anticuerpo humano.

57. El ácido nucleico de la reivindicación 56, en donde la región constante es IgG1.

58. El ácido nucleico de la reivindicación 57, que tiene una función efectora reducida o mínima.

59. El ácido nucleico de la reivindicación 58, en donde la mínima función efectora resulta de una mutación de Fc no efectora.

60. El ácido nucleico de la reivindicación 59, en donde la mutación de Fc no efectora es N297A.

61. Un vector que comprende el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 49 a 60.

62. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 61.

63. La célula huésped de la reivindicación 62 que es eucariótica.

64. La célula huésped de la reivindicación 63 que es de mamífero.

65. La célula huésped de la reivindicación 64, que es una célula de ovario de hámster Chino (CHO).

66. La célula huésped de la reivindicación 62, que es procariótica.

67. La célula huésped de la reivindicación 66 que es de E. coli.

68. Un proceso para producir un anticuerpo anti-PD-L1 que comprende cultivar la célula huésped de cualquiera de las reivindicaciones 62 a 67 bajo condiciones adecuadas para la expresión del vector que codifica para el anticuerpo anti-PD-L1 o fragmento de enlace al antígeno, y recuperar el anticuerpo o fragmento.

69. Un artículo de manufactura que comprende la composición de la reivindicación 48 y al menos una molécula de BNCA.

70. Un artículo de manufactura que comprende la composición de la reivindicación 48 y al menos un agente quimioterapéutico.

71. El artículo de manufactura de acuerdo con la reivindicación 70, en donde el agente quimioterapéutico es gemcitabina.

72. Un artículo de manufactura que comprende la composición de la reivindicación 48 y al menos un agonista para una molécula co-estimuladora positiva.

73. El artículo de manufactura de acuerdo con la reivindicación 72, que comprende además un antagonista de BMCA.

74. Un artículo de manufactura que comprende la composición de la reivindicación 48 y al menos un antibiótico.

75. El artículo de manufactura de acuerdo con la reivindicación 74, en donde el antibiótico es un agente antiviral.

76. El artículo de manufactura de acuerdo con la reivindicación 75, en donde el agente antiviral es un inhibidor de transcriptasa inversa.

77. El artículo de manufactura de acuerdo con la reivindicación 76, en donde el inhibidor de transcriptasa inversa es un inhibidor de polimerasa.

78. El artículo de manufactura de acuerdo con la reivindicación 75, en donde el agente antiviral es un inhibidor de proteasa.

79. Un artículo de manufactura que comprende la composición de la reivindicación 48 y al menos una vacuna.

80. Un método para mejorar la función de las células T que comprende la administración de una cantidad efectiva de la composición de la reivindicación 48 a una célula T disfuncional.

81. Un método para tratar un trastorno disfuncional de células T que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición de la reivindicación 48 a un paciente que sufre de un trastorno disfuncional de células T.

82. El método de la reivindicación 81, en donde el trastorno disfuncional de células T es infección.

83. El método de la reivindicación 82, en donde la infección es crónica.

84. El método de la reivindicación 81, en donde el trastorno disfuncional de células T es inmunidad tumoral.

85. El método de la reivindicación 83, en donde la infección crónica es persistente.

86. El método de la reivindicación 83, en donde la infección crónica es latente.

87. El método de la reivindicación 83, en donde la infección crónica es lenta.

88. El método de la reivindicación 82, en donde la infección resulta de un patógeno seleccionado del grupo que consiste de bacterias, virus, hongos y protozoarios.

89. El método de la reivindicación 88, en done el patógeno es una bacteria y el método comprende además la administración de un agente anti-bacteriano.

90. El método de la reivindicación 88, en donde el patógeno es un virus y el método comprende además la administración de un agente antiviral.

91. El método de la reivindicación 88, en donde el patógeno es un hongo y el método comprende además la administración de un agente anti-fungal.

92. El método de la reivindicación 88, en donde el patógeno es un protozoario y el método comprende además la administración de un agente anti-protozoarios.

93. El método de la reivindicación 88, que comprende además la administración de una vacuna.

94. El método de la reivindicación 84, en donde el método comprende además la aplicación de un régimen de tratamiento seleccionado del grupo que consiste de: terapia de radiación, quimioterapia, terapia dirigida, inmunoterapia, terapia hormonal, inhibición de angiogénesis y cuidados paliativos.

95. El método de la reivindicación 84, en donde la inmunidad tumoral resulta de un cáncer seleccionado del grupo que consiste de: cáncer de mama, pulmón, colon, ovario, melanoma, vejiga, riñón, hígado, salival, estomacal, gliomas, tiroides, tímico, epitelial, cánceres de cabeza y cuello, gástricos y pancreáticos.

Coestimulación de la Familia B7

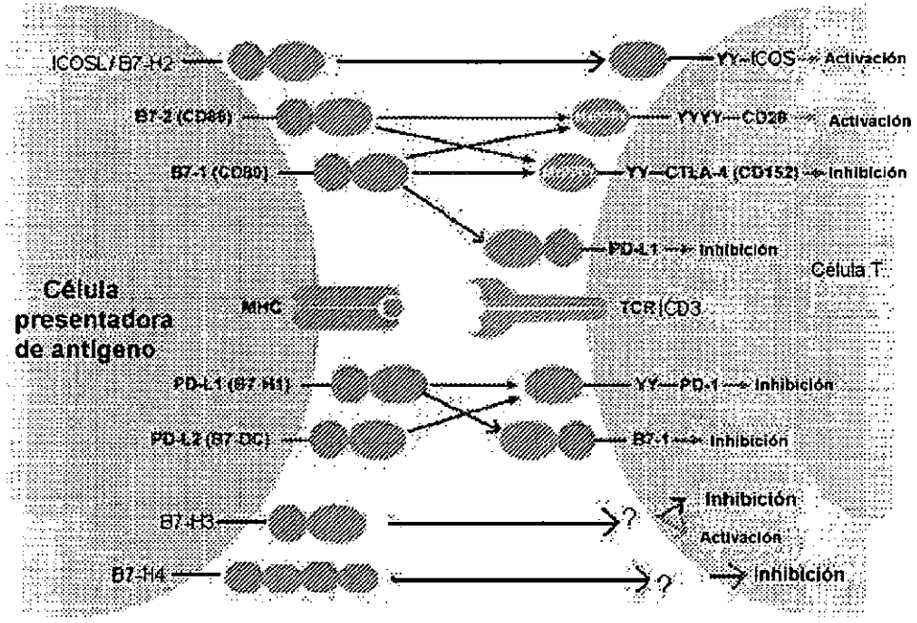


Figura 1

Valoración de células PMEL/B16 *in vitro*

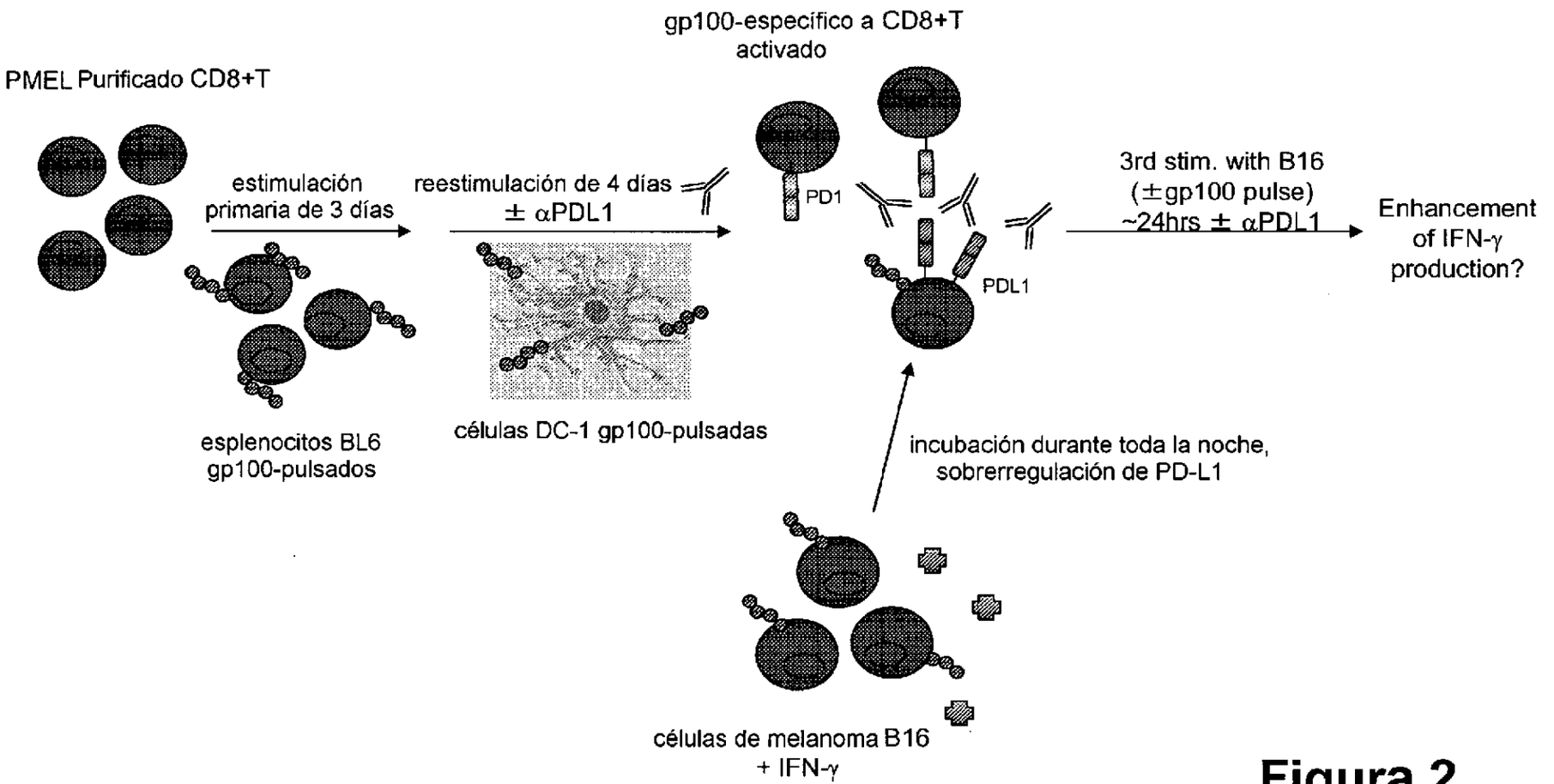


Figura 2

Efecto del anticuerpo Anti-PDL1 sobre la producción IFN-γ PMEL CD8+ células T

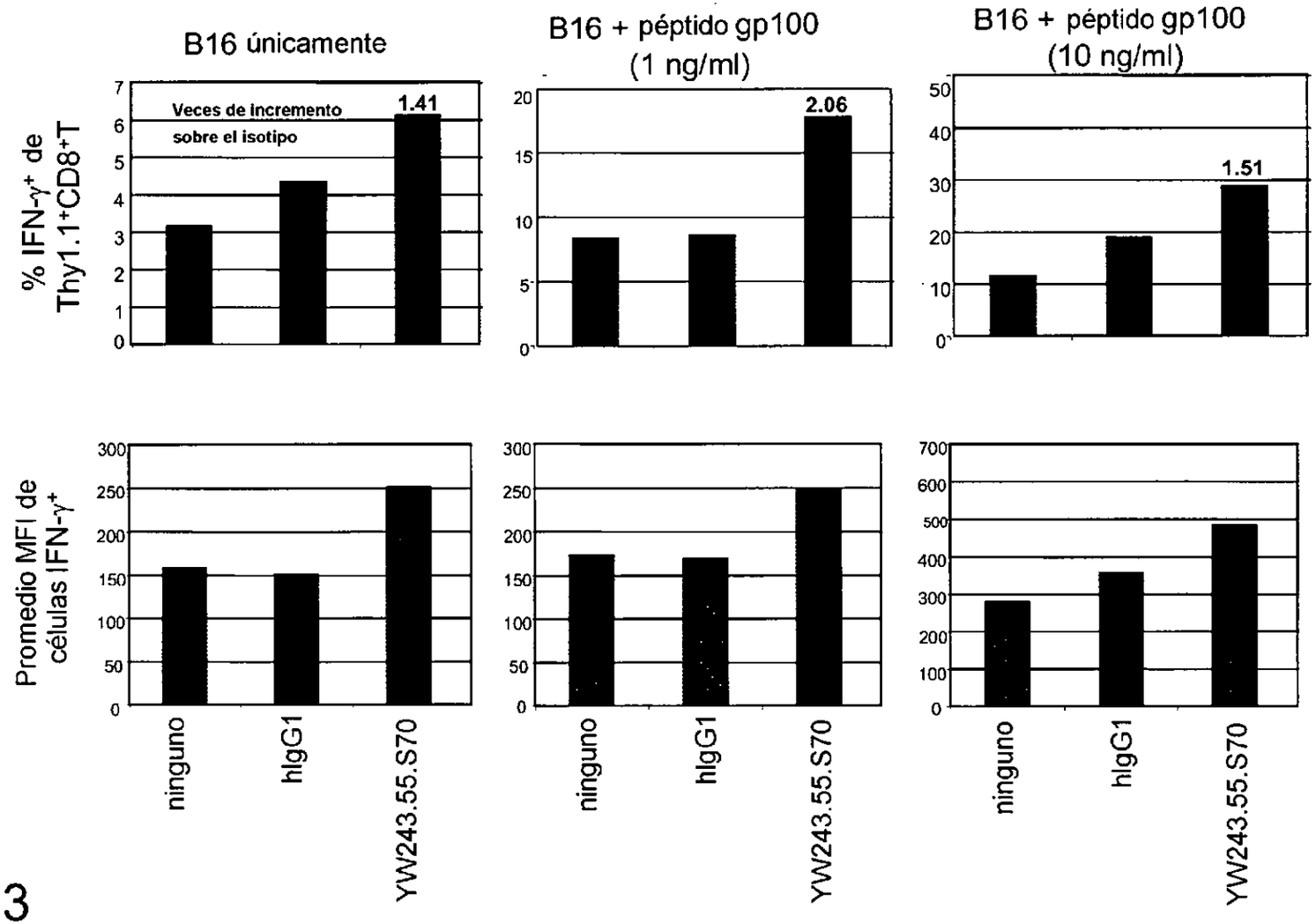


Figura 3

Efecto del anticuerpo Anti-PD-L1 sobre la proliferación de células CD4-T presente bajo estimulación secundaria

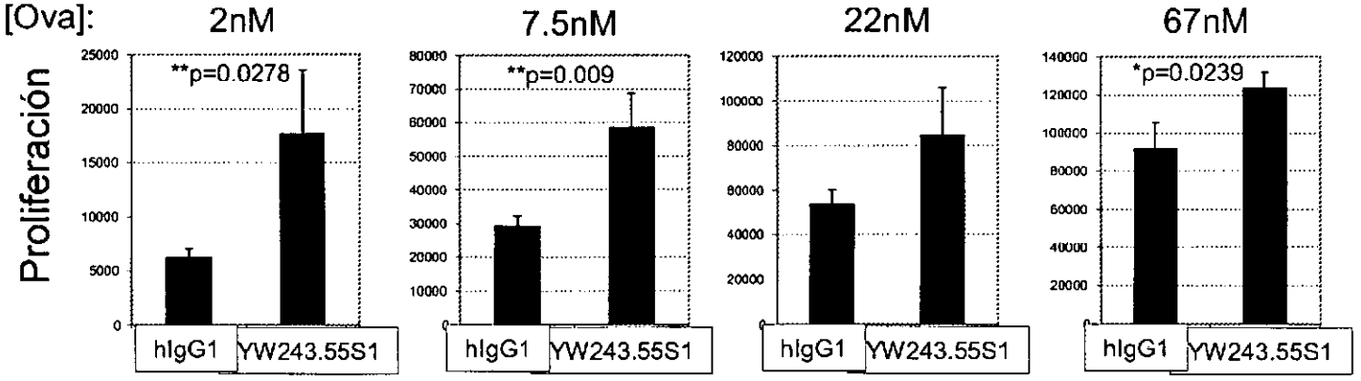


Figura 4

Efecto de Anti-PD-L1 Ab sobre la proliferación de células T CD8 de humano en la reacción de mezcla de linfocitos

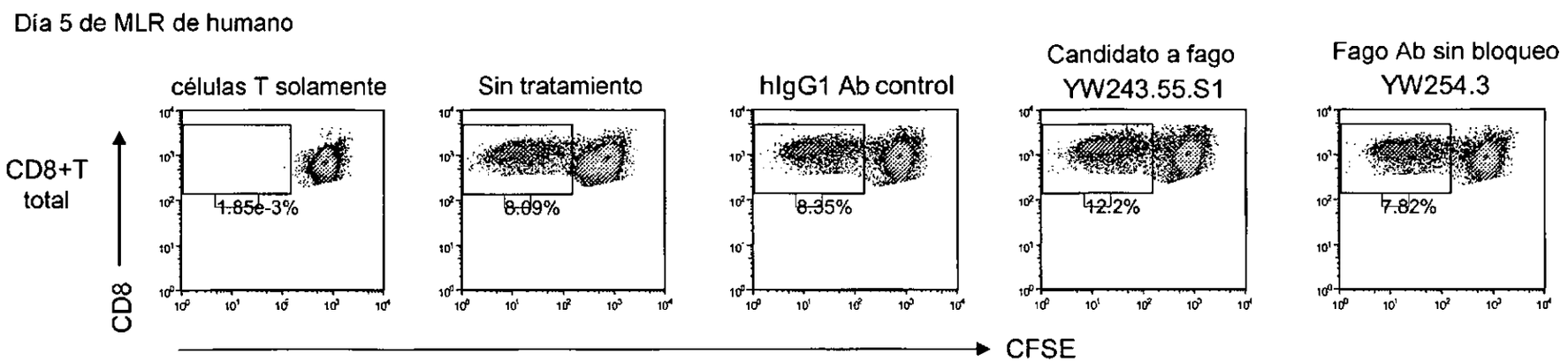


Figura 5

Anti-PDL1 en coriomeningitis linfocítica crónica infección del virus (LCMV) (Clon13)

Grupos:
- Cepa crónica del clon 13 de LCMV (2E6/ratón)
  1. IgG1 testigo: n=5 ratones
  2. anti-PD-L1 YW243.55.S70 H/m: n=5 ratones

- Cepa aguda de Armstrong LCMV (2E6/ratón)
- No infectados

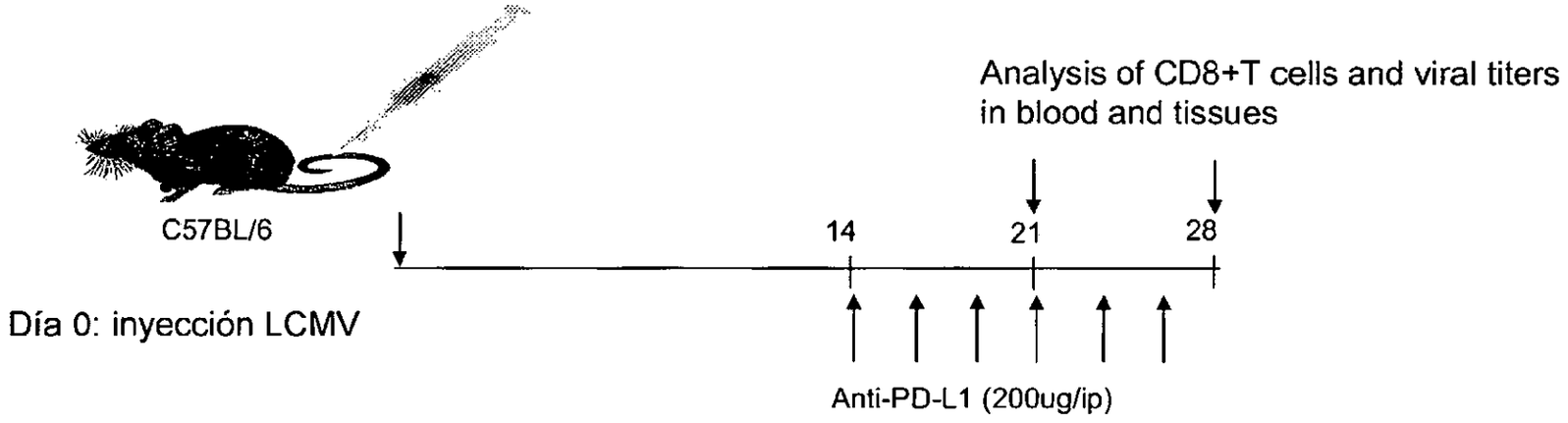


Figura 6

Efecto del Anti-PD-L1 Ab sobre la función efectora de CD8 en ratones tratados con anti-PDL1

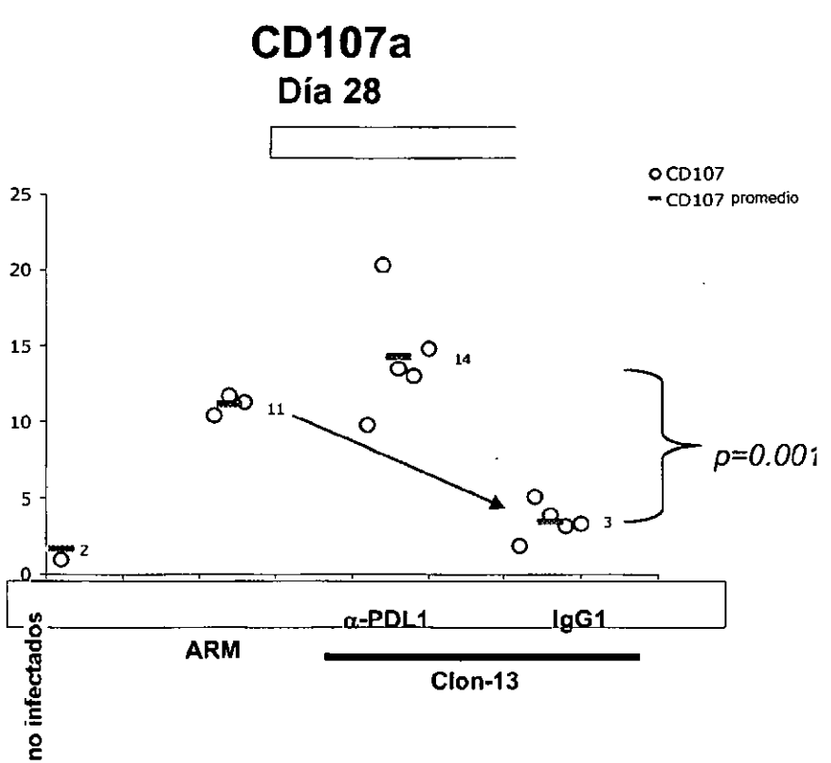


Figura 7A

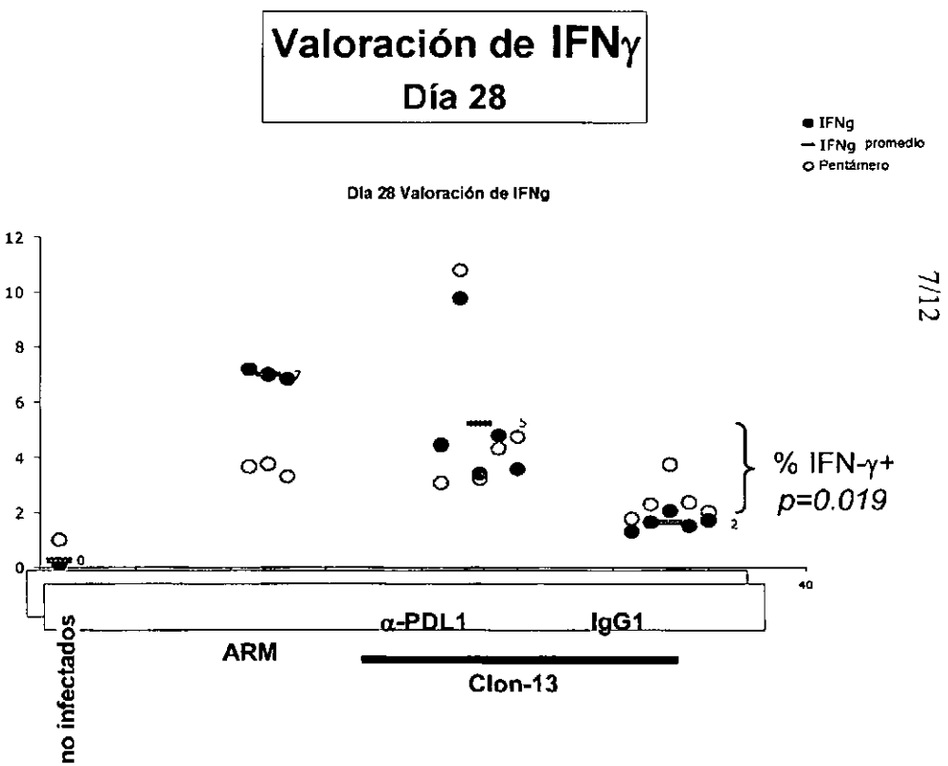
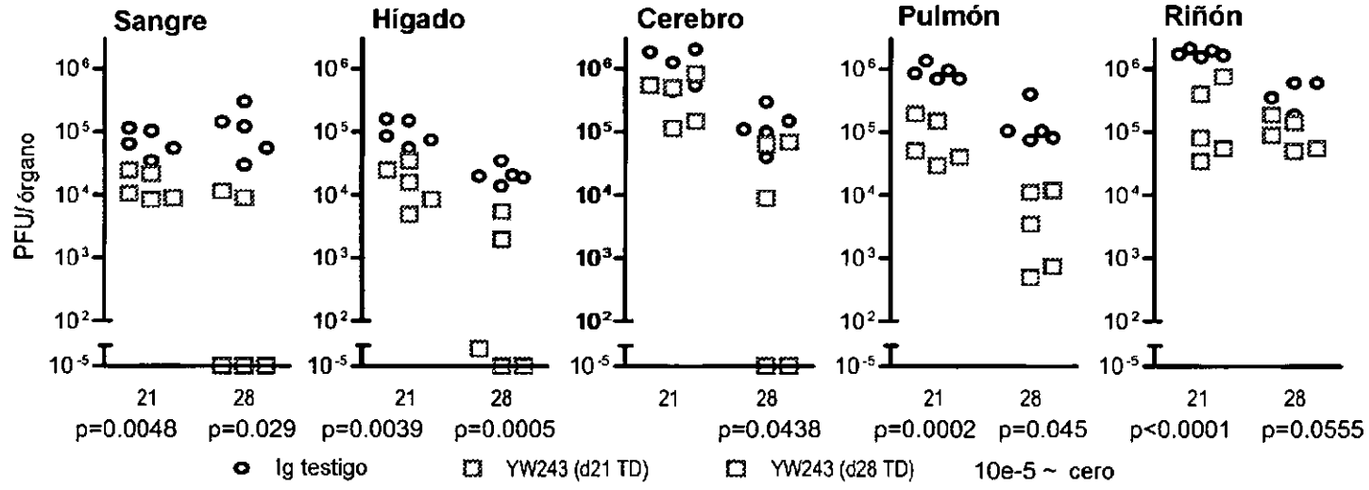


Figura 7B

Reducción de titulaciones virales en suero de tejidos en ratones tratados con α-PD-L1



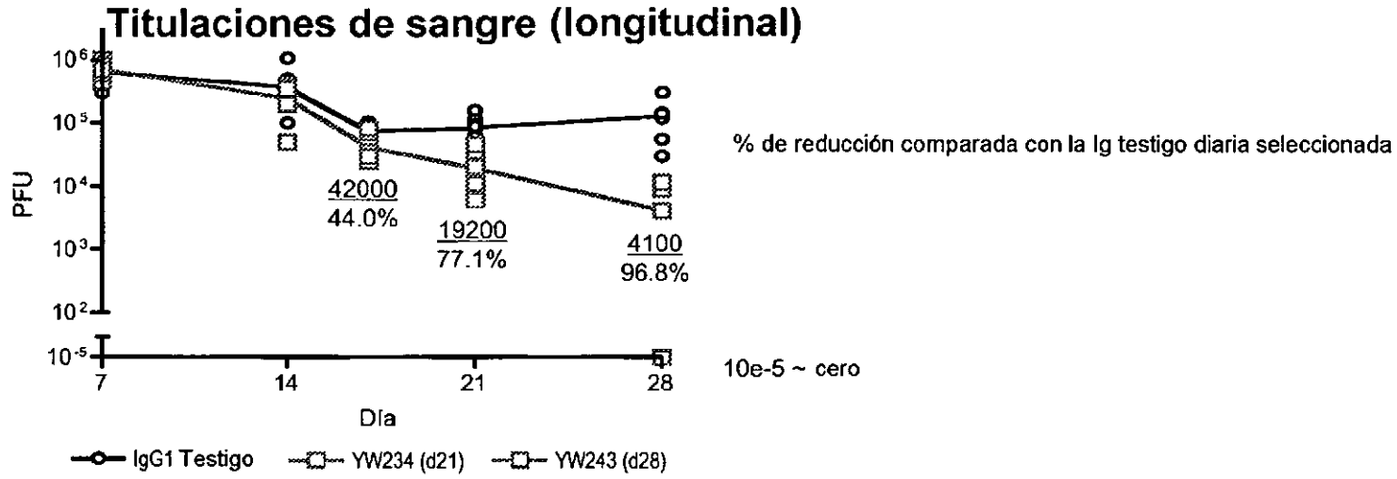


Figura 8

Efecto de la última intervención con tratamiento con anti-PDL1 en un modelo colorrectal de células MC38.Ova

células MC38-Ova expresadas en PD-L1

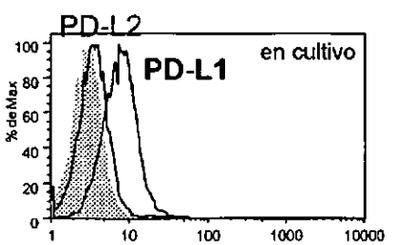


Figura 9B

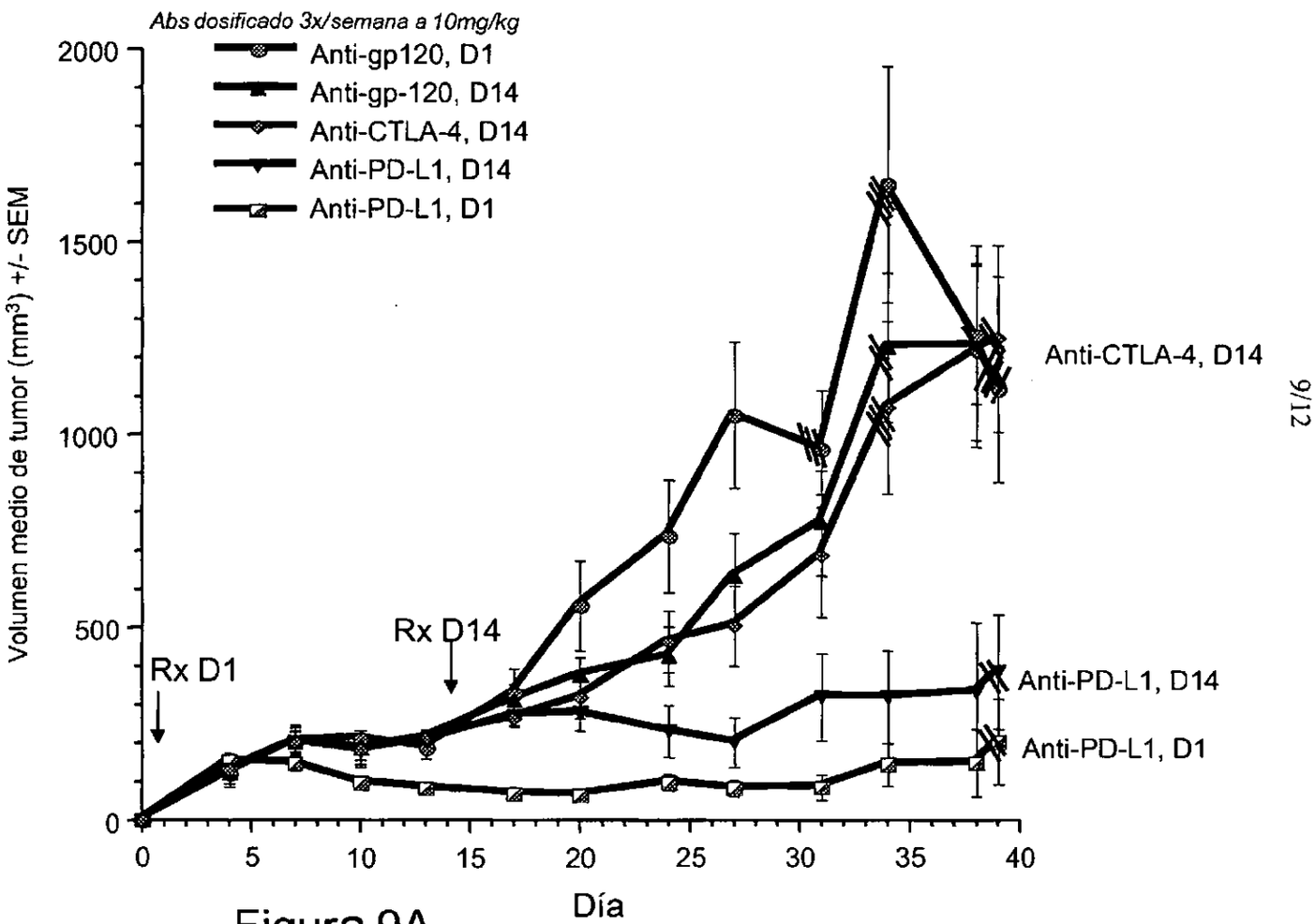


Figura 9A

Efecto del tratamiento de PD-L1 bloqueado solo y en combinación con anti-VEGF o Gemcitabina

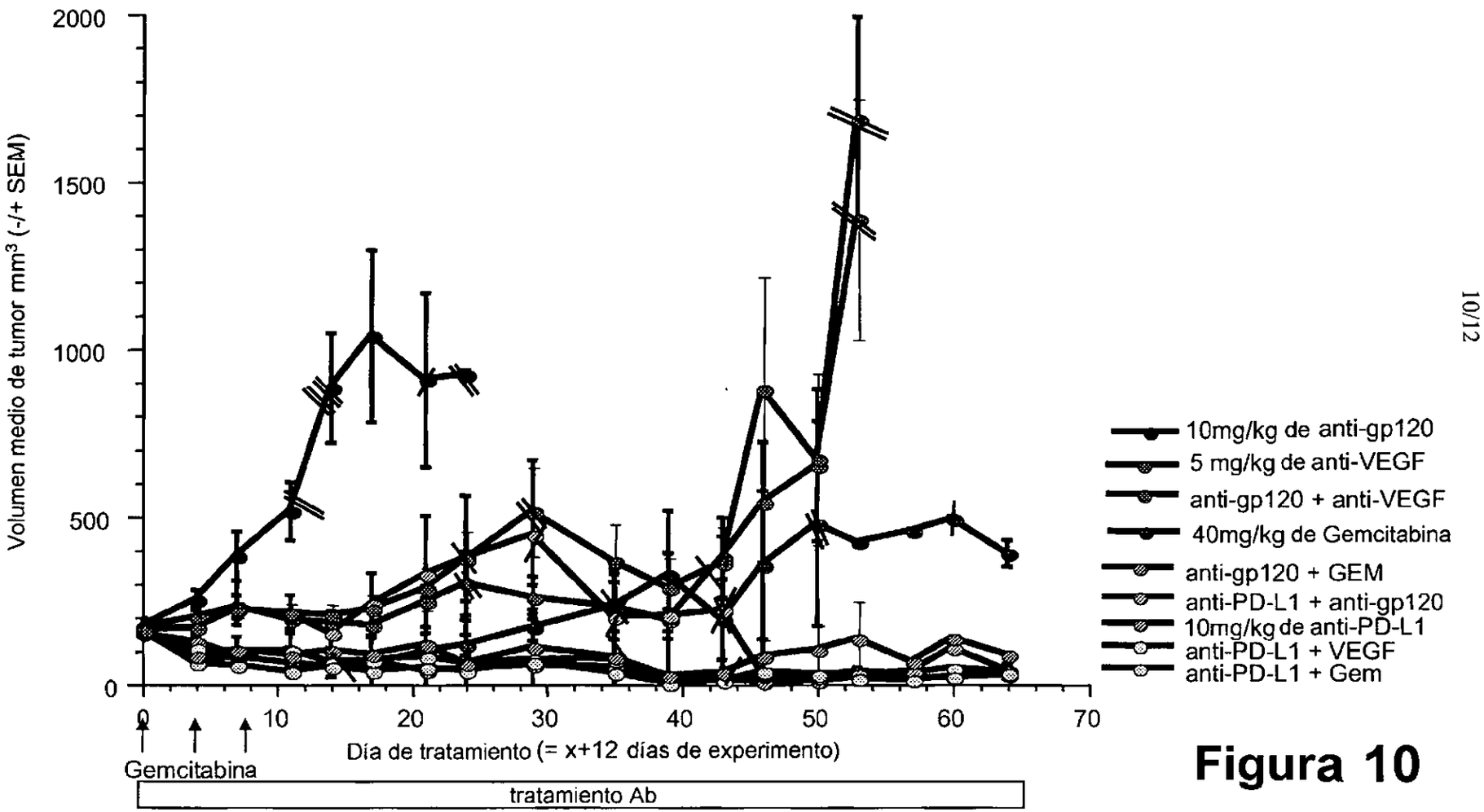


Figura 10

Cadenas pesadas

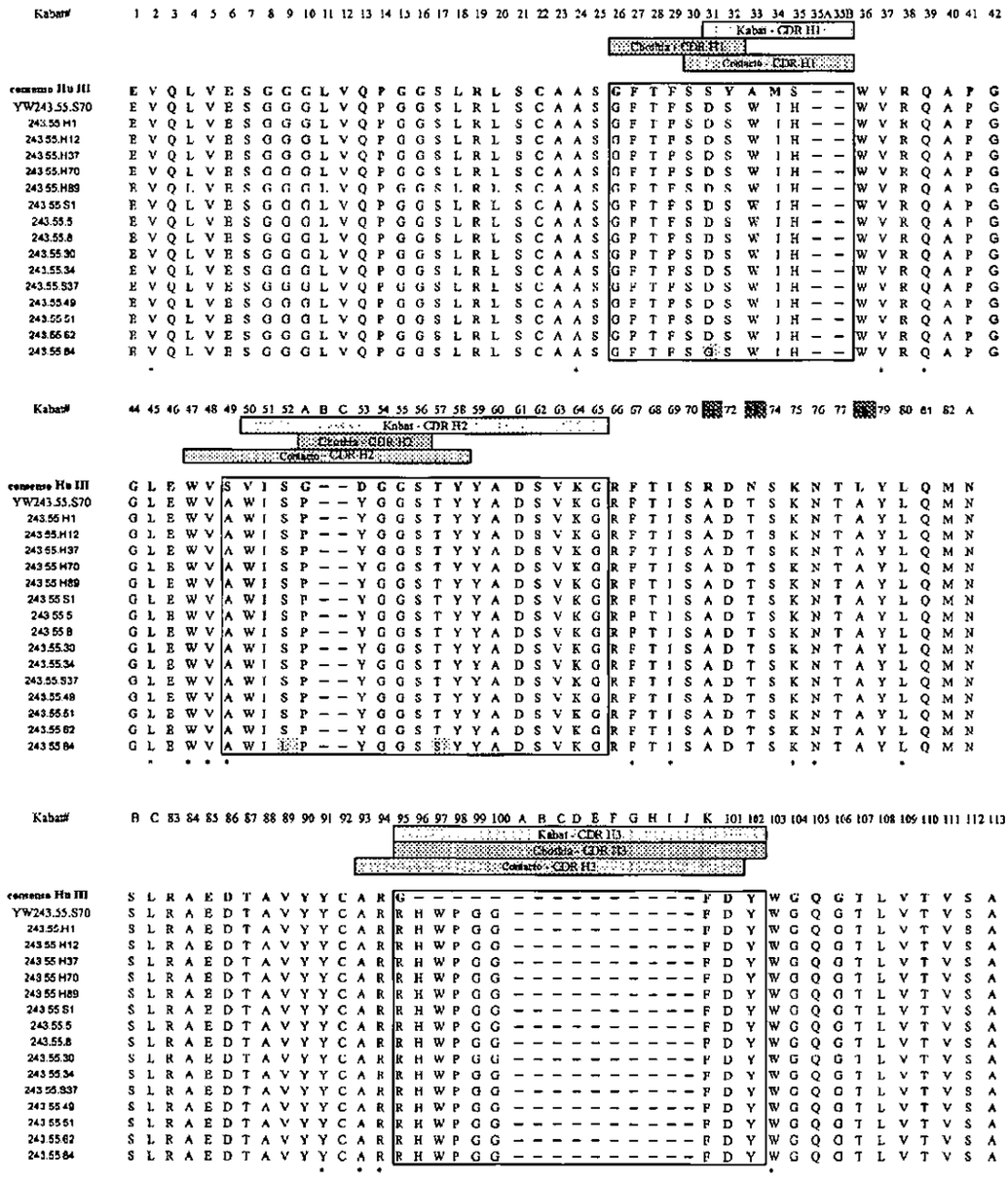


Figura 11A

Cadenas ligeras

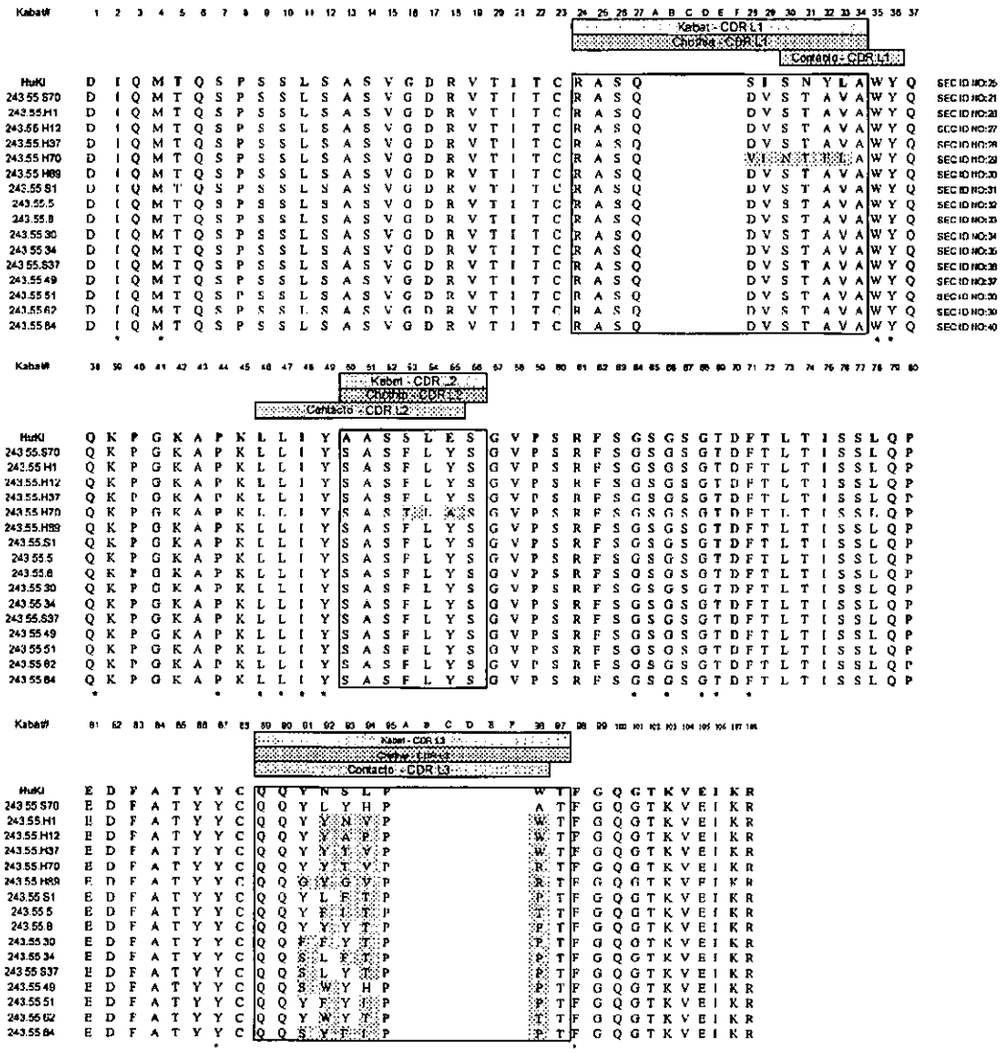


FIGURA 11B

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Irving, Bryan
Chiu, Henry
Maecker, Heather
Mariathasan, Sanjeev
Lehar, Sophie M.
Wu, Yan
Cheung, Jeanne

<120> ANTICUERPOS ANTI-PD-L1 Y SU USO PARA MEJORAR LA FUNCIÓN DE CÉLULAS T

<130> P4192R2

<150> US 61/121,092
<151> 2008-12-09

<160> 40

<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<220>
<221> variante
<222> 6
<223> el residuo es D o G

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

<210> 2
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<220>
<221> variante
<222> 4
<223> el residuo es S o L

<220>
<221> variante
<222> 10

<223> el residuo es T o S

<400> 2
Ala Trp Ile Xaa Pro Tyr Gly Gly Ser Xaa Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

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

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

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 4
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

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

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

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

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

<220>

<223> la secuencia está sintetizada

<400> 6
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

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

Ala Arg

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

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

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

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

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<220>
<221> variante
<222> 5
<223> el residuo es D o V

<220>
<221> variante
<222> 6
<223> el residuo es V o I

<220>
<221> variante
<222> 7
<223> el residuo es S o N

<220>
<221> variante
<222> 9
<223> el residuo es A o F

<220>
<221> variante

<222> 10
<223> el residuo es V o L

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

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

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<220>
<221> variante
<222> 4
<223> el residuo es F o T

<220>
<221> variante
<222> 6
<223> el residuo es Y o A

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

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

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<220>
<221> variante
<222> 3
<223> el residuo es Y, G, F o S

<220>
<221> variante
<222> 4
<223> el residuo es L, Y, F, o W

<220>
<221> variante
<222> 5
<223> el residuo es Y, N, A, T, G, F o I

<220>
<221> variante

<222> 6
<223> el residuo es H, V, P, T o I

<220>
<221> variante
<222> 8
<223> el residuo es A, W, R, P o T

<400> 10
Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr
5

<210> 11
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 11
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 12
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 13
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 13
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

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

Tyr Cys

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 14
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
5 10

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 15
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His
5 10

<210> 16
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 16
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 17
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
5 10

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 18
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

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

<210> 20
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 20
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe
95 100 105

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
110 115

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

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 21
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 22
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
110

<210> 23
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 23
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe
95 100 105

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
110 115

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

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 24

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

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

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

Glu Trp Val Ala Trp Ile Leu Pro Tyr Gly Gly Ser Ser Tyr Tyr
50 55 60

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe
95 100 105

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
110 115

<210> 25
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 26
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 26
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Tyr Tyr Asn Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 27
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 27
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Tyr Tyr Ala Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 28
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 28
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Tyr Tyr Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

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

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 29

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

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

Thr Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Tyr Tyr Thr Val Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 30
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 30
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Gly Tyr Gly Val Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 31
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 31
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Tyr Leu Phe Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 32
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 32
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Tyr Phe Ile Thr Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 33
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 33
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Tyr Tyr Tyr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 34
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia está sintetizada

<400> 34
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Phe Phe Tyr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 35
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 35
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Ser Leu Phe Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 36
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 36
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Ser Leu Tyr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 37
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 37
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Ser Trp Tyr His Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 38
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 38
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Tyr Phe Tyr Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 39
<211> 108
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 39
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Tyr Trp Tyr Thr Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 40
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 40
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

116576
230

PATENT COOPERATION TREATY

OCC|CGS|EC

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

Genentech, Inc.
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

RECEIVED
FEB 15 2011
GENENTECH, INC.
LEGAL DEPT.

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY
(PCT Rule 71.1)

Date of mailing *(day/month/year)*	09.02.2011
Applicant's or agent's file reference: P4192R2WO	**IMPORTANT NOTIFICATION**

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2009/067104	08.12.2009	09.12.2008

Applicant: Genentech, Inc.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.

2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.

3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. **REMINDER**

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the international preliminary examining authority:	Authorized Officer
European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465	Borinski, Wolfgang Tel. +49 89 2399-8237

Form PCT/IPEA/416 (January 2004)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P4192R2WO	**FOR FURTHER ACTION**	See Form PCT/IPEA/416
International application No. PCT/US2009/067104	International filing date *(day/month/year)* 08.12.2009	Priority date *(day/month/year)* 09.12.2008
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. C07K16/28		
Applicant Genentech, Inc.		

1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 9 sheets, including this cover sheet.
3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising:
   a. ☒ *sent to the applicant and to the International Bureau)* a total of 17 sheets, as follows:
      ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions).
      ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box.
   b. ☐ *(sent to the International Bureau only)* a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3*bis* of Annex C of the Administrative Instructions).

4. This report contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the report
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand	Date of completion of this report
2010-10-04	09.02.2011
Name and mailing address of the international preliminary examining authority: European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized officer Pérez-Mato, Isabel Telephone No. +49 89 2399-2128

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US2009/067104

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on

☒ the international application in the language in which it was filed

☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
- ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
- ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))

2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

Description, Pages

1-148 as originally filed

Sequence listings, SEQ ID NO

1-40 as originally filed

Claims, Numbers

1-95 as originally filed

Drawings, Sheets

1/17-17/17 filed with the demand for preliminary international examination

☒ a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing *(specify)*:
- ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since either they are considered to go beyond the disclosure as filed, or they were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rules 70.2(c) and (c-bis)):
- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing *(specify)*:

5. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 70.2 (e)).

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US2009/067104

6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) have been received and taken into account in drawing up this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	1-95
	No:	Claims	
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-95
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-95
	No:	Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US2009/067104

Supplemental Box relating to Sequence Listing

Continuation of Box I, item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)

   ☐ on paper

   ☒ in electronic form

   b. (time)

   ☒ in the international application as filed

   ☐ together with the international application in electronic form

   ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination

   ☐ to this Authority as an amendment on

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

* *If item 4 in Box No. I applies, the sequence listing, which forms part of the basis of the report, may be marked "superseded."*

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY (SEPARATE SHEET)

International application No.
PCT/US2009/067104

Summary

The present application relates to antibodies specific for programmed cell death ligand 1 (PDL-1, also known as B7-H1 and CD274) and their use (alone or in combination with other therapeuticals) in the treatment of cancer and infectious diseases.

Cited documents

Reference is made to the following documents:

D1 WO 2008/071447 A2 (ABLYNX NV [BE]; HERMANS GUY [BE]; VERHEESEN PETER [BE]; DOLK EDWARD [N) 19 June 2008 (2008-06-19)

D2 DAVIES J ET AL: "Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding"IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL LNKD- DOI: 10.1016/ S1380-2933 (96) 00045-0, vol. 2, no. 3, 1 September 1996 (1996-09-01) , pages 169-179, XP004070292 ISSN: 1380-2933

D3 US 2003/039653 A1 (CHEN LIEPING [US] ET AL) 27 February 2003 (2003-02-27)

D4 HIRANO FUMIYA ET AL: "Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity"CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER REREARCH, US, vol. 65, no. 3, 1 February 2005 (2005-02-01) , pages 1089-1096, XP002419626 ISSN: 0008-5472

D5 DONG HAIDONG ET AL: "Tumor- associated B7- H1 promotes T- cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion"NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 8, no. 8, 24 June 2002 (2002-06-24) , pages 793-800, XP002397368 ISSN: 1078-8956

D6 EP 1 537 878 A1 (ONO PHARMACEUTICAL CO [JP]; HONJO TASUKU [JP]) 8 June 2005 (2005-06-08)

D7 BARBER DANIEL L ET AL: "Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection"NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB LNKD- DOI:10.1038/NATURE04444, vol. 439, no. 7077, 9 February 2006 (2006-02-09), pages 682-687, XP002419629 ISSN: 0028-0836

D8 YAMAZAKI TOMOHIDE ET AL: "Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC"JOURNAL OF IMMUNOLOGY, AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 169, no. 10, 15 November 2002 (2002-11-15), pages 5538-5545, XP002398158 ISSN: 0022-1767

D9 LATCHMAN YVETTE ET AL: "PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation"NATURE IMMUNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB LNKD- DOI: 10.1038/85330, vol. 2, no. 3, 1 March 2001 (2001-03-01), pages 261-268, XP001064842 ISSN: 1529-2908

D10 WO 2008/085562 A2 (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; PARDOLL DREW [US]; CHEN LIEPING [US]; DRAKE C) 17 July 2008 (2008-07-17)

D11 WO 2006/042237 A2 (MAYO FOUNDATION [US]; CHENG LIEPING [US]; STROME SCOTT E [US]; KWON EU) 20 April 2006 (2006-04-20)

D12 WARK K L ET AL: "Latest technologies for the enhancement of antibody affinity"ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL LNKD- DOI:10.1016/J.ADDR.2006.01.025, vol. 58, no. 5-6, 7 August 2006 (2006-08-07), pages 657-670, XP024892147 ISSN: 0169-409X [retrieved on 2006-08-07]

D13 DONG HAIDONG ET AL: "B7-H1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity"JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE, SPRINGER VERLAG, DE LNKD- DOI: 10.1007/S00109-003-0430-2, vol. 81, no. 5, 1 May 2003 (2003-05-01), pages 281-287, XP002520498 ISSN: 0946-2716 [retrieved on 2003-04-30]

D14 WO 03/042402 A2 (DANA FARBER CANCER INST INC [US]; BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL [US]) 22 May 2003 (2003-05-22)

D15 SHIELDS R L ET AL: "High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R"JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC, US LNKD- DOI: 10.1074/JBC.M009483200, vol. 276, no. 9, 2 March 2001 (2001-03-02) , pages 6591-6604, XP002495886 ISSN: 0021-9258 [retrieved on 2000-11-28] cited in the application

Article 34(2)(b) PCT

The amendments filed with them demand are considered to meet the requirements of **Article 34(2)(b) PCT**, in that they do not appear to introduce subject-matter extending beyond the content of the application as originally filed.

Re Item V

Novelty, inventive step and industrial applicability

1 Claims 1-95 can be considered novel (**Article 33(2) PCT**).

No isolated heavy chain variable regions polypeptides or anti- PD- L1 antibodies were found in the prior art to comprise the claimed sequences.

2 The present application, however, does not meet the criteria of **Article 33(1) PCT**, because the subject-matter of claims 1-95 does not involve an inventive step in the sense of **Article 33(3) PCT**.

2.1 D1 is regarded as being the closest prior art to the subject-matter of claims 1-6 and discloses anti- PD- L1 nanobodies (i.e.: heavy chain antibodies obtained from camelids), see pages 349-351, table B-5 on page 374 and figures 11-13.

The subject- matter of claim 1 differs from this known D1 in that the polypeptides encoding the isolated heavy chain variable region have different sequences. There is no technical effect derived from said difference, however, since the claimed polypeptides appear to have no function whatsoever. This is

due to the fact that isolated heavy chain variable regions very rarely have antibody activity by themselves, having said activity usually when they are either isolated from camelids or engineered to have certain camelid residues at certain positions (see D2, page 171). The heavy chain variable regions of the application are neither derived from camelid nor engineered to resemble camelid antibodies, and no data regarding the functional characterization of the claimed polypeptides in terms of antibody activity is provided.

The problem to be solved may therefore be regarded as the provision of alternative polypeptides encoding a heavy chain variable region.

The solution, as provided in claim 1, cannot be considered inventive in the sense of **Article 33 (3) PCT**, due to the following. In the absence of any technical effect, the provision of a polypeptide cannot be considered as involving any inventive activity. The same reasoning applies to claims 2-6.

2.2 D1 is also considered the closest prior art to the subject-matter of claims 7-95, disclosing anti-PDL-1 antibodies, including nanobodies.

The subject-matter of independent claims 13, 35, 45 and 47 therefore differs from this known D1 in that the antibodies have different sequences. There is no apparent technical effect derived from said difference, however.

The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as the provision of further anti-PDL-1 antibodies.

The solution proposed in claims 13, 35, 45 and 47 of the present application cannot be considered as involving an inventive step (**Article 33(3) PCT**) for the following reasons. PD-L1 was known in the art and several antibodies specific for this protein have already been obtained, see D3- D10, which disclose PD-L1 antibodies along with methods to obtain them (see D3, page 10; D4, page 1090; D5, page 798; D6, page 13; D7, page 686; D8, page 5539; D9, page 267; D10, page 37). In view of these teachings, the skilled person would consider obvious obtaining further antibodies against this known target.

2.3 The same reasoning applies, mutatis mutandis, to the subject-matter of the corresponding independent claims 48-50, 61, 62, 68-70, 72, 74 and 79-81, which therefore are also considered not inventive. The cited prior art documents disclose compositions (and articles of manufacture) comprising

said antibodies and their use to treat cancer and infections (D1, D3-D11) and DNA encoding the antibodies, along with vectors and host cells used to express them (see D1).

2.4 Dependent claims 7-12, 14-34, 36-44, 46, 51-60, 63-67, 71, 73, 75-78 and 82-95 do not contain any features which, in combination with the features of any claim to which they refer, meet the requirements of the **PCT** in respect of inventive step, see documents D1-D15 and the corresponding passages cited in the search report.

3 Claims 80-95 relate to subject- matter considered by this Authority to be covered by the provisions of **Rule 39.1(iv)/67.1(iv) PCT**.

The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The **EPO**, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

Patentability, in particular novelty and inventive step, of claims 80-95 has been assessed on the basis of a purpose-limited product claim taking into account the alleged effects of the compound/composition.

TRATADO SOBRE COOPERACIÓN DE PATENTES

De la
ADMINISTRACIÓN DEL EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

Para:

Genentech, Inc.
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Estados Unidos de América

PCT

NOTIFICACIÓN DE TRANSMISIÓN DEL INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD

(Regla PCT 71.1)

Fecha de Envío
(día/mes/año) 09.02.2011

Expediente de Referencia del Solicitante o Agente
P4192R2WO

NOTIFICACIÓN IMPORTANTE

Solicitud Internacional No.	Fecha de Solicitud Internacional *(día/mes/año)*	Fecha Prioridad *(día/mes/año)*
PCT/US2009/067104	**08.12.2009**	**09.12.2008**

Solicitante

GENENTECH, INC.

1. El solicitante queda notificado por el presente que la Administración Encargada del Examen Preliminar Internacional transmite aquí el informe preliminar internacional sobre la patentabilidad y sus anexos, si hay, establecidos en la solicitud internacional.

2. Una copia del informe y sus anexos, si hay, está siendo transmitida a la Oficina Internacional para comunicación a todas las Oficinas elegidas.

3. Cuando sea requerido por cualquiera de las Oficinas Elegidas, la Oficina Internacional preparará una traducción al inglés del informe (pero no de los anexos) y transmitirá dicha traducción a esas Oficinas.

4. **RECORDATORIO**

El solicitante deberá entrar a fase nacional ante cada oficina elegida realizando ciertos actos (presentar traducciones y pagando tarifas nacionales) dentro de 30 meses de la fecha de prioridad (o más tarde en algunas oficinas) (Artículo 39(1)) (ver también el recordatorio enviado por la Oficina Internacional con el Formato PCT/IB/301).

Donde se requiera enviar una traducción de la solicitud internacional a una Oficina elegida, esa traducción deberá contener una traducción de cualquier anexo al informe preliminar internacional sobre la patentabilidad. Es responsabilidad del solicitante preparar y enviar dicha traducción directamente a cada Oficina elegida que le concierna.

Para más detalles sobre tiempos límites aplicables y requerimientos de las Oficinas elegidas, ver Volumen II de la *Guía del Solicitante PCT*.

Se remite al solicitante al Artículo 33(5), el cual establece que los criterios de novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial como se describen en el Artículo 33(2) a (4) solo tienen como objeto el examen preliminar internacional y que "cualquier Estado Contratante puede aplicar criterios adicionales o diferentes para decidir si, en ese Estado, la invención reivindicada es patentable o no" (ver también Artículo 27(5)). Tales criterios adicionales pueden relacionarse, por ejemplo, a exenciones de patentabilidad, requerimientos para permitir la divulgación, claridad y soporte de las reivindicaciones.

Nombre y dirección de correspondencia de la Administración del examen preliminar internacional:

Oficina de Patentes Europea
D-80298 Munich
Tel: +49 89 2399-0
Fax: +49 89 2399 - 4465

Funcionario Autorizado

Borinski, Wolfgang

Teléfono +49 89 2399-8237

TRATADO SOBRE COOPERACIÓN DE PATENTES
PCT
INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD

(Capitulo II del Tratado de Cooperación de Patentes)
(Artículo 36 y Regla 70 PCT)

Expediente de Referencia del Solicitante o Agente P4192R2WO	PARA PROCEDIMIENTO POSTERIOR	Véase Forma PCT/IPEA/416
Solicitud Internacional No. PCT/US2009/067104	Fecha de Solicitud Internacional *(día/mes/año)* 08.12.2009	Fecha Prioridad *(día/mes/año)* 09.12.2008
Clasificación Internacional de Patente (IPC) o Clasificación Nacional e IPC INV. C07K 16/28		
Solicitante GENENTECH, INC.		

1. Este informe es el informe de examen preliminar internacional elaborado por la Administración Encargada del Examen Preliminar Internacional bajo el Artículo 35 y enviado al solicitante según Artículo 36.

2. Este INFORME comprende un total de 9 hojas, incluyendo esta portada.

   Este INFORME también viene acompañado de ANEXOS que comprenden:

3. a. ☒ *(enviados al solicitante y a la Oficina Internacional)* un total de 17 hojas, como sigue:

   ☒ hojas de la descripción, reivindicaciones y/o dibujos que han sido corregidas y son la base para este informe y/o hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Autoridad (ver regla 70.16 y Sección 607 de las Instrucciones Administrativas)

   ☐ hojas que sustituyen hojas anteriores, pero las cuales esta Autoridad considera contienen una corrección que excede la divulgación en la solicitud internacional como se presentó, según se indica en el ítem 4 de la Casilla I y la Casilla Suplementaria.

   b. ☐ *(enviado solamente a la Oficina Internacional)* un total de (indique tipo y número de portador(es) electrónico(s)) _____, que contienen un listado de secuencias, en formato electrónico únicamente, como se indica en la Casilla Suplementara relacionada con el Listado de Secuencias (ver Sección 802 de las Instrucciones Administrativas).

4. Este informe contiene datos con respecto a los siguientes puntos:

☒	**Casilla No. I**	Base del Informe
☐	**Casilla No. II**	Prioridad
☐	**Casilla No. III**	Sin elaboración de un dictamen sobre novedad, nivel inventivo y aplicación industrial
☐	**Casilla No. IV**	Carencia de nivel inventivo
☒	**Casilla No. V**	Declaración justificada según Artículo 35(2) con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial; documentos y explicaciones que sustentan esta declaración
☐	**Casilla No. VI**	Ciertos documentos enumerados
☐	**Casilla No. VII**	Ciertas deficiencias en la solicitud internacional
☐	**Casilla No. VIII**	Ciertas observaciones relacionadas con la solicitud internacional

Fecha de presentación de la petición	Fecha de la preparación de este informe
2010-10-04	09.02.2011
Nombre y dirección de correspondencia de la Administración del examen preliminar internacional: Oficina de Patentes Europea D-80298 Munich Tel: +49 89 2399-0 Fax: +49 89 2399 - 4465	Funcionario Autorizado Pérez-Mato, Isabel Teléfono No. +49 89 2399-2128

INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD

Solicitud Internacional No. PCT/US2009/067104

Casilla No. I Base del informe.

1. Respecto al **idioma**, este informe se basa en:

☒ La solicitud internacional en el idioma en el que fue presentada originalmente

☐ Una traducción de la solicitud internacional al _____ el cual es el idioma de una traducción presentada con el objeto de:

- ☐ búsqueda internacional (Reglas 12.3(a) y 23.1(b))
- ☐ publicación de la solicitud internacional (Regla 12.4(a))
- ☐ examen preliminar internacional (bajo las Reglas 55.2 (a) y/o 55.3 (a))

2. Respecto a los **elementos** de la solicitud internacional este informe se basa en:
(Las hojas de reemplazo que han sido presentadas ante la Oficina receptora en respuesta a una invitación bajo el Artículo 14 se referencian en este informe como "presentadas originalmente" y no se anexan a este informe):

Descripción, páginas

1-148 como se presentaron originalmente

Listado de secuencias, SEQ ID NO

1-40 como se presentaron originalmente

Reivindicaciones, números

1-95 como se presentaron originalmente

Dibujos, hojas

1/17-17/17 presentados con la demanda para el examen internacional preliminar

☒ Un listado de secuencias – Ver Casilla Suplementaria relacionada con el Listado de Secuencias.

3. ☐ Las modificaciones han dado como resultado la cancelación de

- ☐ la descripción, páginas _____
- ☐ las reivindicaciones, Nos. _____
- ☐ los dibujos, hojas/figs _____
- ☐ el listado de secuencias *(especificar)* _____
- ☐ cualquier tabla(s) relacionada(s) con el listado de secuencias *(especificar)* _____

4. ☐ Este informe se ha establecido como si (algunas de) las modificaciones anexas a este informe y enumeradas debajo no se hubieran hecho, ya que se consideran que exceden la divulgación presentada o no iban acompañadas por una carta que indicara la base de las modificaciones en la solicitud como fue presentada, según se indica en la casilla Suplementaria (Reglas 70.2(c) y (c-bis)):

- ☐ la descripción, páginas _____
- ☐ las reivindicaciones, Nos. _____
- ☐ los dibujos, hojas _____
- ☐ el listado de secuencias *(especificar)* _____

5. ☐ Este informe se ha establecido teniendo en cuenta la rectificación de un error obvio autorizado por o notificado a esta Autoridad bajo la Regla 91 (Regla 70.2 (e)).

INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD

Solicitud Internacional No.
PCT/US2009/067104

6. ☐ El informe(s) de Búsqueda Internacional Complementario de la(s) Autoridad(es) _____ ha sido recibido y tenido en cuenta en la realización de este reporte (Regla 45bis.8 (b) y (c)).

** Si el ítem 4 aplica, algunas o todas estas hojas pueden ser marcadas como "sustituta".*

Casilla No. V Declaración justificada según Artículo 35(2) con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial; documentos y explicaciones que sustentan esta declaración.

1. Declaración

Novedad (N)	SI:	Reivindicaciones	1-95
	NO:	Reivindicaciones	
Nivel Inventivo (NI)	SI:	Reivindicaciones	1-95
	NO:	Reivindicaciones	
Aplicabilidad Industrial (AI)	SI:	Reivindicaciones	1-95
	NO:	Reivindicaciones	

2. Citas y explicaciones (Regla 70.7)

Ver hoja separada

INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD

Solicitud Internacional No.
PCT/US2008/0851337

Casilla suplementaria relacionada con el listado de secuencias.

1. Con relación a cualquier secuencia de nucleótidos y/o amino ácidos divulgados en la solicitud internacional y necesarios para la invención reclamada, se ha establecido esta opinión sobre la base de un listado de secuencias presentado o suministrado:

a. (mediante)

☐ en papel

☒ en formato electrónico

b. (tiempo)

☒ en la solicitud internacional tal como fue presentada
☐ junto con la solicitud internacional en formato electrónico
☐ posteriormente a esta Administración para fines de búsqueda y/o examen
☐ a esta Administración como una modificación del mismo

2. ☒ Adicionalmente, en el evento de que se haya presentado o suministrado mas una versión o copia de un listado de secuencias, se presentaron las declaraciones requeridas en relación a que la información en las copias posteriores o adicionales es idéntica a la de la solicitud tan como fue presentada o no exceden la solicitud como fue presentada, cuando se considere adecuado.

3. Comentarios adicionales:

- Si el ítem 4 en la Casilla No. I aplica, el listado de secuencias, que forma parte de la base de este reporte, se puede marcar como *"sustituido"*.

Resumen

La presente solicitud se relaciona con anticuerpos específicos para ligando 1 de muerte programada (PDL-1, también conocido como B7-H1 y CD274) y su uso (solo o en combinación con otros terapéuticos) en el tratamiento de cáncer y enfermedades contagiosas.

Documentos citados

Se hace referencia a los siguientes documentos:

D1 WO 2008/071447 A2 (Ablynx NV [BE]; Hermans Guy [BE]; Verheesen Peter [BE]; Dolk Edward [N] 19 de junio de 2008 (2008-06-19)

D2 Davis J. et al: "Affinity improvement of single antibody VH domains: resudies in all three hypervariable regions affect antigen binding" Immunotechnology, Elsevier Science Publishers BV, NL LNKD-DOI: 10.1016/S1380-2933(96) 00045-0, vol. 2, No. 3, 1 septiembre 1996 (1996-09-01), páginas 169-179, XP004070292 ISSN: 1380-2933

D3 US 2003/039653 A1 (Chen Lieping [US] et al) 27 de febrero de 2003 (2003-02-27)

D4 Hirano Fumiya et al.: "Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity", Cancer Research, American Association for Cancer Research, US, vol. 65, No. 3, 1 de febrero de 2005 (2005-02-01), páginas 1089-1096, XP002419626 ISSN: 0008-5472.

D5 Dong Haidong et al.: "Tumor- associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion", Nature Medicine, Nature Publishing Group, New York, NY, US, vol. 8, No. 8, 24 de junio de 2002 (2002-06-24), páginas 793-800, XP002397368 ISSN: 1078-8956.

D6 EP 1 537 878 A1 (Ono Pharmaceutical Co [JP]; Honjo Tasuku [JP]) 8 de junio de 2005 (2005-06-08).

D7 Barber Daniel L. et al: "Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection", Nature Medicine, Nature Publishing Group, Londres, GB LNKD-DOI: 10.1038/Nature0444, vol. 439, No. 7077, 9 de febrero de 2006 (2006-02-09), páginas 682-687, XP002419629 ISSN: 0028-0836.

D8 Yamazaki Tomohide et al.: "Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC", Journal of Immunology, American Association of Immunologists, US, vol. 169, No. 10, 15 de noviembre de 2002 (2002-11-15), páginas 5538-5545, XP002398158 ISSN: 0022-1767.

D9 Latchman Yvette et al.: "PD-L2 is a second ligand for PD- and inhibits T cell activation", Nature Immunology, Nature Publishing Group, GB LNKD-DOI: 10.1038/85330, vol. 2, No. 3, 1 de marzo de 2001 (2001-03-01), páginas 261-268, XP001064842 ISSN: 1529-2908.

D10 WO 2008/085562 A2 (Univ. Johns Hopkins [US]; Pardoll Drew [US]; Chen Lieping [US]; Drake C) 17 de Julio de 2008 (2008-07-17).

D11 WO 2006/042237 A2 (Mayo Foundation [US]; Cheng Lieping [US]; Strome Scott E. [US]; Kwon EU) 20 de abril de 2006 (2006-04-20).

D12 Wark K. L et al.: "Latest technologies for the enhacement of antibody affinity", Advanced Drug Delivery Reviews, Elsevier BV, Amsterdam, NL LNKD-DOI: 10.1016/J.ADDR.2006.01.025, vol. 58, No. 5-6, 7 de agosto de 2006 (2006-08-07), páginas 657-670, XP024892147 ISSN: 0169-409X [recuperado el 2006-08-07].

D13 Dong Haidong et al.: "B7-H1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity", Journal of Molecular Medicine, Springer Verlag, DE LNKD-DOI: 10.1007/S00109-003-0430-2, vol. 81, No. 5, 1 de mayo de 2003 (2003-05-01), páginas 281-287, XP002520498 ISSN: 0946-2716 [recuperado el 2003-04-30].

D14 WO 03/042402 A2 (Dana Farber Cancer Inst. Inc. [US]; Brigham & Womens Hospital [US]) 22 de mayo de 2003 (2003-05-22).

D15 Shields R. L. et al: "High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and RcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R", Journal of Biological Chemistry, American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc, US LNKD-DOI: 10.1074/JBC.M009483200, vol. 276, No. 9, 1 de marzo de 2001 (2001-03-02), páginas 6591-6604, XP002495886 ISSN: 0021-9258 [recuperado el 2000-11-28] citado en la solicitud.

Artículo 34(2)(b) del PCT

Se considera que las modificaciones presentadas con la demanda cumplen con los requisitos del **Artículo 34(2)(b) del PCT** en el sentido de que aparentemente no incluyen materia objeto que exceda el contenido de la solicitud tal como fue presentada originalmente.

Relacionado con la casilla V

Novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial

1. Las reivindicaciones 1-95 pueden ser consideradas novedosas (Artículo 33(2) del PCT)

   No se encontraron polipéptidos de región variable de cadena pesada aislados o anticuerpos anti-PD-L1 en el arte previo que comprendan las secuencias reivindicadas.

2. La presente solicitud, sin embargo, no cumple con el criterio del **Artículo 33(1) del PCT,** ya que la materia objeto de las reivindicaciones 1-95 no involucra nivel inventivo en el sentido del **Artículo 33(3) del PCT**.

   2.1 Se considera a D1 como el arte previo más cercano a la materia objeto de las reivindicaciones 1-6 y divulga nanoanticuerpos anti-PD-L1 (i.e.: anticuerpos de cadena pesada obtenidos de los camélidos), ver páginas 349-351, tabla B5 de la página 374 y figuras 11-13.

   La materia objeto de la reivindicación 1 difiere de los conocido en D1 en que los polipéptidos que codifican la región variable de cadena pesada aislada tienen diferentes secuencias. No hay un efecto técnico derivado de dicha diferencia, sin embargo, ya que al parecer los polipéptidos reivindicados no tienen ninguna función en absoluto. Esto se debe al hecho de que las regiones variables de cadena

pesada aislada muy rara vez tienen actividad anticuerpo por ellas mismas, puesto que tienen dicha actividad normalmente cuando están ya sea aisladas de los camélidos o tramadas para tener ciertos residuos de camélidos en ciertas posiciones (ver D2, página 171). Las regiones variables de cadena pesada de la solicitud ni se derivan de los camélidos ni están tramadas para semejarse a los anticuerpos de los camélidos y no hay datos en relación con la caracterización funcional de los polipéptidos reivindicados en términos de que se suministra actividad anticuerpo.

El problema a solucionar puede considerarse, por lo tanto, como el suministro de polipéptidos alternativos que codifiquen una región variable de cadena pesada.

La solución, tal como se ofrece en la reivindicación 1, no se puede considerar inventiva en el sentido del **Artículo 33(3) del PCT**, debido a lo siguiente: en ausencia de cualquier efecto técnico, el suministro de un polipéptido no se puede considerar como si involucrara alguna actividad inventiva. La misma razón aplica para las reivindicaciones 2-6.

2.2 D1 también se considera como el arte previo más cercano a la materia objeto de las reivindicaciones 7-95, la cual divulga anticuerpos anti-PDL-1, incluídos nanocuerpos.

El problema a solucionar por la presente invención puede considerarse, por lo tanto, como el suministro de anticuerpos anti-PDL-1 adicionales.

La solución propuesta en las reivindicaciones 13, 35, 45 y 47 de la presente solicitud no puede considerarse como si involucrara nivel inventivo (**Artículo 33(3) del PCT**) por las siguientes razones: PD-L1 era conocido en el arte y algunos anticuerpos específicos para esta proteína ya se habían obtenido, ver D2-D10, los cuales divulgan anticuerpos PD-L1 junto con los métodos para obtenerlos (ver D3, página 10; D4, página 1090; D5, página 798; D6, página 13; D7, página 686; D8, página 5539; D9, página 267; D10, página 37). En vista de estas enseñanzas, la persona versada en el arte podría considerar obvio obtener anticuerpos adicionales contra este objetivo conocido.

2.3 El mismo criterio aplica, *mutatis mutandis*, a la materia objeto de las reivindicaciones independientes correspondientes 48-50, 61, 62, 68-70, 72, 74 y 79-81, las cuales, por lo tanto, se consideran carentes de inventiva. Los documentos del arte previo citado divulgan composiciones (y artículos de fabricación) que comprenden dichos

anticuerpos y su uso para tratar cáncer e infecciones (D1, D3-D11) y DNA que codifica los anticuerpos junto con los vectores y células huésped usadas para expresarlos (ver D1).

2.4 Las reivindicaciones dependientes 7-12, 14-34, 36-44, 46, 51-60, 63-67, 71, 73, 75-78 y 82-95 no contienen ninguna característica que, en combinación con las características de cualquier reivindicación a la cual se refieren, cumplan con los requisitos del PCT con respecto al nivel inventivo, ver documentos D1-D15 y los apartes correspondientes citados en este informe de búsqueda.

3. Las reivindicaciones 80-95 se relacionan con materia objeto que esta Administración considera está amparada por las previsiones de la **Regla 39.1(iv)/67.1(iv) del PCT**.

La patentabilidad puede ser dependiente de la formulación de las reivindicaciones. La EPO (por sus siglas en inglés) por ejemplo, no reconoce como patentable las reivindicaciones por el uso de un compuesto en tratamientos médicos, pero puede permitir las reivindicaciones para un producto, en particular sustancias o composiciones para uso en un primer tratamiento médico o adicional.

La patentabilidad, en particular la novedad y el nivel inventivo, de las reivindicaciones 80-95 se ha evaluado sobre la base de una reivindicación de producto con propósito limitado teniendo en cuenta los presuntos efectos del compuesto/composición.

258

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *Country: United States of America*
   This public document
2. *has been signed by AIDA MICLAT GUIAM*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of AIDA MICLAT GUIAM, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 15th day of December 2005*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 267083*
9. *Seal/Stamp:*

10. Signature

Secretary of State

NP-24-A (REV. 4-05)

OSP 05 90772

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia con el original que se ha tenido a la vista.
06 MAYO 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Norby Fernando Mora

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California
County of: San Mateo } SS.

On December 6, 2005 (Date) before me, Aida Miclat Guiam (Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public"))

personally appeared Timothy R. Schwartz (Name(s) of Signer(s))

☐ personally known to me
☒ proved to me on the basis of satisfactory evidence

to be the person(s) whose name(s) is/~~are~~ subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/~~she/they~~ executed the same in his/~~her/their~~ authorized capacity(~~ies~~), and that by his/~~her/their~~ signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

WITNESS my hand and official seal.

Aida Miclat Guiam
Signature of Notary Public

AIDA MICLAT GUIAM
Commission # 1455662
Notary Public - California
San Mateo County
My Comm. Expires Dec 9, 2007

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: _____

Document Date: _____ Number of Pages: _____

Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: _____

☐ Individual
☐ Corporate Officer — Title(s): _____
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney-in-Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____

RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER
Top of thumb here

© 1999 National Notary Association • 9350 De Soto Ave., P.O. Box 2402 • Chatsworth, CA 91313-2402 • www.nationalnotary.org Prod. No. 5907 Reorder: Call Toll-Free 1-800-876-6827

En la Notaría Cuarenta de este Círculo cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
06 MAYO 2011
NOTARIO CUARENTA (E)
Bogotá, D.C., Colombia
Norby Fernando Mora S.

360

Brigard & Castro

BOGOTA - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros)

domiciliado(s) en

Nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **BEATRIZ JARAMILLO** y/o **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** y/o **HECTOR GÓMEZ MEJIA**, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseñas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo especifico, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **BEATRIZ JARAMILLO** y/o **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** y/o **HECTOR GOMEZ MEJIA**., domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de

Firma

Nombre
Cargo

POWER OF ATTORNEY

I (We) **Genentech, Inc.**
1 DNA Way

domiciled in **South San Francisco, California 94080-4990**
USA

Hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **BEATRIZ JARAMILLO** and/or **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** and/or **HECTOR GOMEZ MEJIA**, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems; registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or explotation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages; claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **BEATRIZ JARAMILLO** and/or **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** and/or **HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciled in Carrera 7 No. 16-56, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Granted and signed in **South San Francisco, California USA**

day: 01 December 2005

Signature:

Name: Timothy R. Schwartz, Ph.D.
Title: Section Patent Counsel
Authorized Corporate Signatory
Genentech, Inc.

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
06 MAYO 2011
NOTARIO CUARENTA (E)
Bogotá, D.C., Colombia
Norby Fernando Mora S.

AUTHORIZATION

Genentech, Inc. hereby authorizes any of Janet E. Hasak, Mark T. Kresnak, Jeffrey S. Kubinec and Timothy R. Schwartz, for so long as they remain employees of Genentech, Inc., to execute, on its behalf, any submissions associated with the filing, prosecution, granting, and extension and maintenance of grant of patent and trademark applications in the U.S. and foreign countries, contracts relating to biological deposits with the American Type Culture Collection, and assignments to publishers of copyrights covering works authored by Genentech employees.

August 27, 2002
Dated

Sean Johnston
Sean A. Johnston
Vice President, Intellectual Property
Genentech, Inc.



93 33

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Poder otorgado por **Genentech, Inc.** domiciliada en **1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, Estados Unidos de América.**

ESTADO DE CALIFORNIA
SECRETARIA DE ESTADO

APOSTILLA
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1 País: Estados Unidos de América
Esta documento público
2. ha sido firmado por AIDA MICLAT GUIAM
3. actuando en capacidad de Notario Público, Estado de California
4. lleva el sello/timbre de AIDA MICLAT GUIAM, Notario Público Estado de California

CERTIFICADO

5. en Sacramento, California
6. el 15 de diciembre de 2005
7. por el Secretario de Estado Delegado, Estado de California
8. No. 267083
9. Sello/Timbre

10. Firma

(Firma)
Secretario de Estado

En la Notaría Cuarenta de este Círculo cotejó la presente fotocopia que consta de ( ) folios con el original que se ha tenido a la vista. Bogotá, D.C. 06 MAYO 2011
NOTARIO CUARENTA (E)
Norby Fernando Mo[illegible] S.

RECONOCIMIENTO TODO-PROPOSITO DE CALIFORNIA

Estado de California)
} ss.
Condado de San Mateo)

El 6 de diciembre de 2005, ante mi, AIDA MICLAT GUIAM, apareció personalmente Thimoty R. Schwartz

☐ a quien conozco personalmente

☒ quien demostró ante mi en base a evidencia satisfactoria ser la persona cuyo nombre esta suscrito en el instrumento y quien reconoció ante mi que ejecutó el mismo en su capacidad autorizada, y que por su firma en el instrumento la persona o la entidad a nombre de la cual la persona actuó, ejecutó el instrumento.

Hay un sello que dice:
AIDA MICLAT GUIAM
COMISIÓN # 14556612
Notario Público-California
Condado de San Mateo
Mi comisión expira Dic. 9 de 2007

Atestigua mi firma y sello oficial,

AIDA MICLAT GUIAM

----------OPCIONAL----------

Aunque la información en esta sección no es requerida por la ley, puede probar ser valiosa para las personas que se basan en el documento y puede prevenir la remoción y readhesión fraudulenta de esta forma a otro documento

Descripción adicional de cualquier documento anexo

Título o tipo de documento: _____

Fecha del Documento: _____ Número de páginas: _____

Firmante(s) diferente(s) a (los) nombrado(s) arriba: _____

Capacidad(es) Reivindicada(s) por el (los) firmante(s)

Nombre del firmante: _____

☐ Individuo
☐ Funcionario Corporativo – Título(s): _____
☐ Socio - ☐ Limitado ☐ General
☐ Abogado de hecho
☐ Fideicomisario
☐ Guardián o conservador
☐ Otro: _____

El firmante representa: _____

Huella Índice derecho del firmante
Parte alta del dedo aquí

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
06 MAYO 2011
NOTARIO CUARENTA (E)
Bogotá, D.C. Colombia
Norby Fernando Mora S.

AUTORIZACION

Genentech, Inc. por la presente autoriza a cualquiera de Janet E. Hasak, Mark T. Kresnak, Jeffrey S. Kubinec y Thomity R. Schwartz, mientras permanezcan como empleados de Genentech, Inc., a ejecutar, a su nombre, cualquier solicitud asociada con presentación, procesamiento, consecución, y extensión y mantenimiento de concesión de solicitudes de patente y marca registrada en los Estados Unidos y países extranjeros, contratos relacionados con depósitos biológicos con la Colección Americana de Tipo de Cultivo, y cesiones a publicistas de derechos de autor que cubran los trabajos de autoría de los empleados de Genentech.

27 de Agosto de 2002
Fechado

(Firma)
Sean A. Johnston
Vicepresidente, Propiedad Intelectual
Genentech, Inc.



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

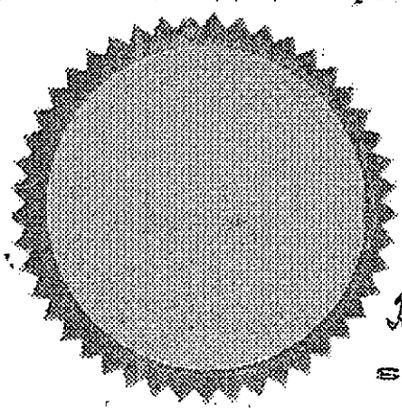
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254030

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

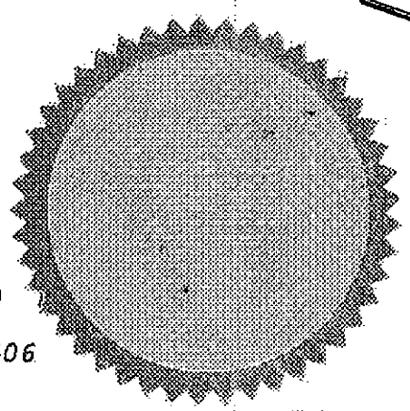


Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE RESTATED CERTIFICATE OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TWENTY-SECOND DAY OF JULY, A.D. 1999, AT 9 O'CLOCK A.M.





Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

2112549

050426506

AUTHENTICATION: 3900384

DATE: 05-24-05

AMENDED AND RESTATED

CERTIFICATE OF INCORPORATION

GENENTECH, INC.

Genentech, Inc. (the "Corporation"), a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware, does hereby amend the Certificate of Incorporation of the Corporation, which was originally filed on December 23, 1986 under the name "Genentech Delaware, Inc.", and subsequently amended.

The Certificate of Incorporation of the Corporation is hereby restated and further amended to read in its entirety as follows:

ARTICLE 1

The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

ARTICLE 2

The address of the registered office of the Corporation in the State of Delaware is Corporation Service Company, 1013 Centre Road, City of Wilmington, County of New Castle, Delaware 19805. The name of its registered agent at such address is Corporation Service Company.

ARTICLE 3

The purpose of the Corporation is to engage in any lawful act or activity for which corporations may be organized under the General Corporation Law of the State of Delaware as the same exists or may hereafter be amended ("Delaware Law").

STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 09:00 AM 07/22/1999
991302331 - 2112549

En la Notaría Cuarenta [illegible] Círculo
cotejó la presente fotocopia con el
el original que se ha tenido a la vista
06 MAYO 2011
NOTARIO CUARENTA (E)
Bogotá, D.C., Colombia
Norby Fernando Mora S.

ARTICLE 4

SECTION 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is four hundred million (400,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("Preferred Stock"). Three hundred million (300,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("Common Stock") The Common Stock of the Corporation shall be all of one class.

(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the provisions of Section 242(b)(2) of Delaware Law.

SECTION 4.02. *Common Stock.* (a) *Issuance and Consideration.* Any unissued or treasury shares of the Common Stock may be issued for such consideration as may be fixed in accordance with applicable law from time to time by the Board of Directors.

(b) *Dividends.* Subject to the rights of holders of the Preferred Stock, the holders of the Common Stock shall be entitled to receive, when and as declared by the Board of Directors, out of the assets of the Corporation which are by law available therefor, dividends payable either in cash, in property, or in shares of stock and the holders of the Preferred Stock shall not be entitled to participate in any such dividends (unless otherwise provided by the Board of Directors in any resolution providing for the issue of a series of Preferred Stock).

SECTION 4.03. *Preferred Stock.*

(a) *Series and Limits of Variations between Series.* Any unissued or treasury shares of the Preferred Stock may be issued from time to time in one or more series for such consideration as may be fixed from time to time by the Board of Directors. Before any shares of Preferred Stock of any particular series shall be issued, a certificate shall be filed with the Secretary of State of Delaware setting forth the designation, rights, privileges, restrictions, and conditions to be attached to the Preferred Stock of such series and such other matters as may be required, and the Board of Directors shall fix and determine, and is hereby expressly empowered to fix and determine, in the manner provided by law, the particulars of

En la Notaría Cuarenta de este Círculo
cotejó la presente fotocopia que coincide con
el original que se ha tenido a la vista.
06 MAYO 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Norby Fernando Mora S.

the shares of such series (so far as not inconsistent with the provisions of this Article 4 applicable to all series of Preferred Stock), including, but not limited to, the following:

(i) the distinctive designation of such series and the number of shares which shall constitute such series, which number may be increased (except where otherwise provided by the Board of Directors in creating such series) or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) from time to time by like action of the Board of Directors;

(ii) the annual rate of dividends payable on shares of such series, the conditions upon which such dividends shall be payable and the date from which dividends shall be cumulative in the event the Board of Directors determines that dividends shall be cumulative;

(iii) whether such series shall have voting rights, in addition to the voting rights provided by law and, if so, the terms of such voting rights;

(iv) whether such series shall have conversion privileges and, if so, the terms and conditions of such conversion, including, but not limited to, provision for adjustment of the conversion rate upon such events and in such manner as the Board of Directors shall determine;

(v) whether or not the shares of such series shall be redeemable and, if so, the terms and conditions of such redemption, including the date or dates upon or after which they shall be redeemable, and the amount per share payable in case of redemption, which amount may vary under different conditions and at different redemption dates;

(vi) whether such series shall have a sinking fund for the redemption or purchase of shares of that series and, if so, the terms and amount of such sinking fund;

(vii) the rights of the shares of such series in the event of voluntary or involuntary liquidation, dissolution or winding up of the Corporation, and the relative rights of priority, if any, of payment of shares of that series; and

(viii) any other relative rights, preferences and limitations of such series.

En la Notaría ... Círculo se cotejó la presente ... que coincide con el original que se ha ... 06 MAY ... NOTARIO CUAR... (E) Bogotá, D.C., Colombia ... Norby Fernando Mora...

ARTICLE 5

SECTION 5.01. *Amendment of Bylaws by Directors.* (a) In furtherance and not in limitation of the powers conferred by statute, the Board of Directors is expressly authorized to make, alter, amend, repeal and rescind the bylaws of the Corporation, subject to Sections 5.01(b) and 5.01(c) hereof.

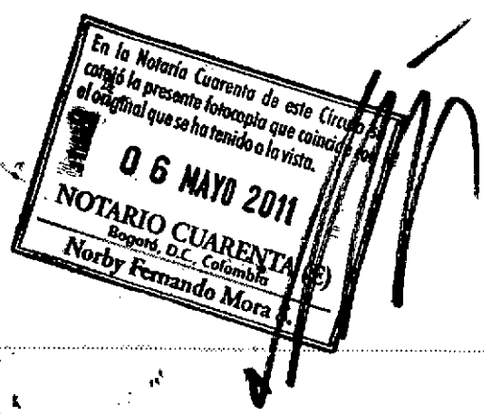
(b) Sections 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, and 5.06 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon.

(c) Sections 3.03(c) and 3.15 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

SECTION 5.02. *Amendment of Certificate of Incorporation.* Section 5.01(b) of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon. Section 5.01(c) and Articles 8 and 9 of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

ARTICLE 6

SECTION 6.01. *Election of Directors by Holders of Preferred Stock.* During any period when the holders of any Preferred Stock or any one or more series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect a specified number of directors, by reason of dividend arrearages or other provisions giving them the right to do so, then and during such time as such right continues (i) the then otherwise authorized number of directors shall be increased by such specified number of directors, and the holders of such Preferred Stock or such series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect the additional directors so provided for, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series; (ii) each such additional director shall serve for such term, and have such voting powers, as shall be stated in the provisions pertaining to such Preferred Stock or series; and (iii) whenever the holders of any such Preferred Stock or series thereof are



divested of such rights to elect a specified number of directors, voting as a class, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series, the terms of office of all directors elected by the holders of such Preferred Stock or series, voting as a class pursuant to such provisions or elected to fill any vacancies resulting from the death, resignation or removal of directors so elected by the holders of such Preferred Stock or series, shall forthwith terminate and the authorized number of directors shall be reduced accordingly.

SECTION 6.02. *Ballots*. Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

SECTION 6.03. *Elimination of Certain Personal Liability of Directors*. (a) A director of the Corporation shall not be liable to the Corporation or its stockholders for monetary damages for breach of fiduciary duty as a director to the fullest extent permitted by Delaware Law.

(b) Each person (and the heirs, executors or administrators of such person) who was or is a party or is threatened to be made a party to, or is involved in any threatened, pending or completed action, suit or proceeding, whether civil, criminal, administrative or investigative, by reason of the fact that such person is or was a director of the Corporation or is or was serving at the request of the Corporation as a director of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise, shall be indemnified and held harmless by the Corporation to the fullest extent permitted by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall also include the right to be paid by the Corporation the expenses incurred in connection with any such proceeding in advance of its final disposition to the fullest extent authorized by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall be a contract right.

(c) The Corporation may, by action of its Board of Directors, provide indemnification to such of the officers, employees and agents of the Corporation to such extent and to such effect as the Board of Directors shall determine to be appropriate and authorized by Delaware Law.

(d) The Corporation shall have power to purchase and maintain insurance on behalf of any person who is or was a director, officer, employee or agent of the Corporation, or is or was serving at the request of the Corporation as a director, officer, employee or agent of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise against any expense, liability or loss incurred by such person in any such capacity or arising out of his status as such, whether or

En la Notaría Cuarenta de Bogotá se cotejó la presente fotocopia con el original que se ha tenido a la vista
06 MAYO 2011
NOTARIO CUARENTA (E)
Bogotá, D.C., Colombia
Norby Fernando Mora S.

not the Corporation would have the power to indemnify him against such liability under Delaware Law.

(e) The rights and authority conferred in this Section 6.03 shall not be exclusive of any other right which any person may otherwise have or hereafter acquire.

(f) Neither the alteration, amendment, repeal or recission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect of this Section 6.03 in respect of any acts or omissions occurring prior to such alteration, amendment, repeal, recission, adoption or modification.

ARTICLE 7

SECTION 7.01. *Section 203 of Delaware Law.* The Corporation hereby elects not to be governed by Section 203 of Delaware Law.

ARTICLE 8

SECTION 8.01. *Relationship With Roche.* In anticipation that the Corporation will cease to be a wholly owned subsidiary of Roche Holdings, Inc., but that Roche (as defined in Section 8.05) will remain a stockholder of the Corporation, and in anticipation that the Corporation (as defined in Section 8.05) and Roche may engage in the same or similar activities or lines of business and have an interest in the same areas of corporate opportunities, and in recognition of (i) the benefits to be derived by the Corporation through its continued contractual, corporate and business relations with Roche (including service of officers and directors of Roche as directors of the Corporation) and (ii) the difficulties attendant to any director, who desires and endeavors fully to satisfy such director's fiduciary duties, in determining the full scope of such duties in any particular situation, the provisions of this Article 8 are set forth to regulate, define and guide the conduct of certain affairs of the Corporation as they may involve Roche and its officers and directors, and the powers, rights, duties and liabilities

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista
06 MAYO 2014
NOTARIO CUARENTA (E)
Bogotá, D.C., Colombia
Norby Fernando Mora S.

of the Corporation and its officers, directors and stockholders in connection therewith.

SECTION 8.02. *Similar Business Activities.* Except as Roche Holdings, Inc. may otherwise agree in writing,

(a) Roche shall not have a duty to refrain from engaging directly or indirectly in the same or similar business activities or lines of business as the Corporation, and

(b) neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty by reason of any such activities of Roche or of such person's participation therein.

In the event that Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for both Roche and the Corporation, Roche shall have no duty to communicate or offer such corporate opportunity to the Corporation and shall not be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty as a stockholder of the Corporation or controlling person of a stockholder by reason of the fact that Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself, directs such corporate opportunity to another person or entity, or does not communicate information regarding, or offer, such corporate opportunity to the Corporation.

SECTION 8.03. *Corporate Opportunities.* In the event that a director, officer or employee of the Corporation who is also a director, officer or employee of Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for the Corporation and Roche (whether such potential transaction or matter is proposed by a third-party or is conceived of by such director, officer or employee of the Corporation), such director, officer or employee shall be entitled to offer such corporate opportunity to the Corporation or Roche as such director, officer or employee deems appropriate under the circumstances in his sole discretion, and no such director, officer or employee shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that (i) such director, officer or employee offered such corporate opportunity to Roche (rather than the Corporation) or did not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation or (ii) Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself or directs such corporate opportunity to another person or does not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation.



SECTION 8.04. *Deemed Consent of Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 8.

SECTION 8.05. *Definitions.* For purposes of this Article 8 and Article 9 only, (i) the term "**Corporation**" shall mean the Corporation and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests, and (ii) the term "**Roche**" shall mean Roche Holdings, Inc. and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities (other than the Corporation, defined in accordance with clause (i) of this Section 8.05) that are "affiliates" (as defined in Rule 12b-2 under the Securities Exchange Act of 1934, as amended) of Roche Holdings, Inc.

SECTION 8.06. *Termination; Binding Effect.* Notwithstanding anything in this Certificate of Incorporation to the contrary, the foregoing provisions of this Article 8 shall expire on the date that Roche ceases to own beneficially Common Stock representing at least 5% of the number of outstanding shares of Common Stock of the Corporation and no person who is a director or officer of the Corporation is also a director or officer of Roche. Neither such expiration, nor the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 8 nor the adoption of any provision of this Amended and Restated Certificate of Incorporation inconsistent with any provision of this Article 8 shall eliminate or reduce the effect of this Article 8 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 8, would accrue or arise, prior to such expiration, alteration, amendment, repeal or adoption.

SECTION 8.07. *Article 9.* The provisions of this Article 8 are in addition to the provisions of Article 9.

ARTICLE 9

SECTION 9.01. *Contracts Not Void.* No contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) between the Corporation and Roche shall be void or voidable solely for the reason that Roche is a party thereto, or solely because any directors or officers of the Corporation who are affiliated with Roche are present at or participate in the

En la Notaría Cuarenta de esta Ciudad se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
06 MAYO 201
NOTARIO CUARENTA (E)
Bogotá, D.C., Colombia
Norby Fernando Mo... S.

meeting of the Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) shall be governed by the provisions of this Amended and Restated Certificate of Incorporation, the Corporation's Bylaws, Delaware Law and other applicable law. For purposes of this Article 9, the terms the "**Corporation**" and "**Roche**" have the meanings set forth in Section 8.05.

SECTION 9.02. *Quorum.* Directors of the Corporation who are also directors or officers of Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of the Board of Directors or of a committee that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof). Outstanding shares of Common Stock owned by Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of stockholders that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof).

SECTION 9.03. *No Liability For Good Faith Actions.* Neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that Roche or an officer of director thereof in good faith takes any action or exercises any rights or gives or withholds any consent in connection with any agreement or contract between Roche and the Corporation. No vote cast or other action taken by any person who is an officer, director or other representative of Roche, which vote is cast or action is taken by such person in his capacity as a director of this Corporation, shall constitute an action of or the exercise of a right by or a consent of Roche for the purpose of any such agreement or contract.

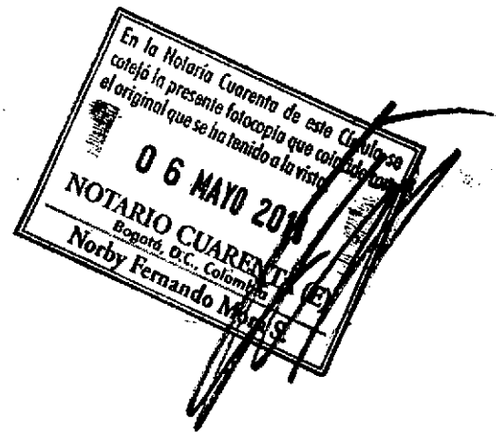
SECTION 9.04. *Deemed Consent by Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 9.

SECTION 9.05. *Contracts Covered.* For purposes of this Article 9, any contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation or any corporation, partnership, joint venture, association or other entity in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests shall be deemed to be a contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation.



SECTION 9.06. *Binding Effect.* Neither the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 9 nor the adoption of any provision inconsistent with any provision of this Article 9 shall eliminate or reduce the effect of this Article 9 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 9, would accrue or arise, prior to such alteration, amendment, change, repeal or adoption.

SECTION 9.07. *Article 8.* The provisions of this Article 9 are in addition to the provisions of Article 8.



IN WITNESS WHEREOF, this Amended and Restated Certificate of Incorporation, having been duly adopted in accordance with Sections 242 and 245 of the General Corporation Law of the State of Delaware and by the written consent of the sole stockholder of the Corporation in accordance with Section 228 of the General Corporation Law of the State of Delaware, has been executed this 22nd day of July, 1999.

GENENTECH, INC.

By: /s/ Stephen G. Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President,
General Counsel and Secretary



TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Incorporación de Genentech, Inc.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

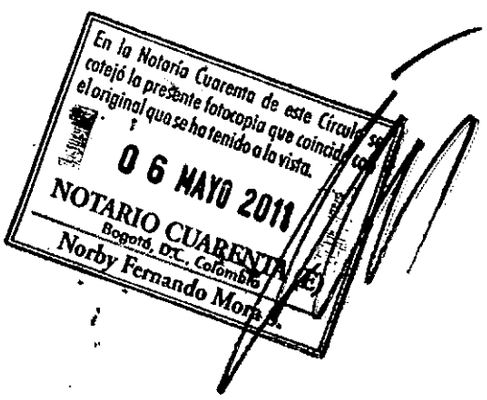
1. País: Estados Unidos de América
   Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254030
9. Sello/timbre

10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL VIGÉSIMO SEGUNDO DÍA DE JULIO, A. D. 1999, A LAS 9 EN PUNTO DE LA MAÑANA.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900384

FECHA: 05 – 24 – 05

CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
GENENTECH, INC.

Genentech, Inc (la "**Corporación**"), una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, por la presente corrige el Certificado de Incorporación, el fue presentado originalmente el 23 de diciembre de 1986, bajo el nombre "Genentech Delaware, Inc.", y corregido subsiguientemente.

Por la presente se vuelve a redactar el certificado de incorporación de la Corporación y se corrige aun más para que diga en su totalidad lo que sigue:

ARTICULO 1

El nombre de la Corporación es: Genentech, Inc.

ARTICULO 2

La dirección de la oficina registrada de la Corporación en el Estado de Delaware es Corporation Service Company, 1013 Centre Road, Ciudad de Wilmington, Condado de New castle, Delaware 19805. El nombre de su agente registrado en tal dirección es Corporation Service Company.

ARTICULO 3

El propósito de a Corporación es el de participar en cualquier acto o actividad legal para las cuales las corporaciones pueden ser organizadas bajo la Ley General de Corporación del Estado de Delaware como puede ser modificada la misma en adelante ("**Delaware Law**").

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se autoriza la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista
06 MAYO 2011
NOTARIO CUARENTA (E)
Bogotá, D.C., Colombia
Norby Fernando

ARTICULO 4

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de cuatrocientos millones (400,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones

preferenciales, por un valor de $0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Trecientos millones (300,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de $0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de acciones puede incrementarse o disminuirse (pero no por debajo del número del número de acciones de las mismas que en su momento están vigentes) por el voto afirmativo de una mayoría con poder de votación de las acciones vigentes de la Corporación con derecho a votar por la misma independiente de las consideraciones de la Sección 242(b)(2) de la Ley de Delaware.

SECCION 4.02. *Acción Común.* (a) *Emisión y Consideración.* Cualquier acción sin emitir o del tesoro del las Acciones Comunes puede emitirse para tal consideración como pueda fijarse de acuerdo con la ley aplicable cada cierto tiempo por la Junta Directiva.

(b) *Dividendos.* Sujeto a los derechos de los accionistas de las Acciones Preferenciales, los accionistas de Acciones Comunes deberán tener el derecho a recibir, cuando y como se declare por la Junta Directiva, de los activos de la Corporación los cuales están disponibles para ello por ley, dividendos pagables ya sea en dinero, propiedad, o acciones y los accionistas de la Acción Preferencial no tendrán derecho a participar en tales dividendos (a menos que la Junta Directiva determine lo contrario en cualquier resolución que condiciona la emisión de una serie de Acciones Preferenciales).

SECCIÓN 4.03. *Acción Preferencial*

(a) *Series y Límites de Variaciones entre Series.* Cualquier acción no emitida o del tesoro de las Acciones Preferenciales puede emitirse cada cierto tiempo en una o más series para tal consideración como pueda ser fijada cada cierto tiempo por la Junta Directiva. Antes de que se emita cualquier acción de las Acciones Preferenciales de cualquier serie particular, se deberá presentar un certificado ante el Secretario de Estado de Delaware estableciendo las designaciones, derechos, privilegios, restricciones, y condiciones que irán anexas a las Acciones Preferenciales de tal serie y tales otras cuestiones como puedan requerirse, y la Junta Directiva deberá fijar y determinar, y por la presente está expresamente autorizada para fijar y determinar, en la forma provista por la ley, los

En la Notaría Cuarenta del Círculo de Bogotá D.C. cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista
06 MAYO 2011
NOTARIO CUARENTA (E)
Bogotá, D.C., Colombia
Norby Fernando Mora S.

particulares de las acciones de tal serie (siempre y cuando no sean inconsistentes con las condiciones de este Artículo 4 aplicables a todas las series de Acciones Preferenciales), incluyendo, pero sin limitarse a, las siguientes:

(i) la designación distintiva de tal serie y el número de las acciones que han de constituir tal serie, numero que puede incrementarse (excepto cuando lo determine de otro modo la Junta Directiva al crear tal serie) o reducida (pero no por debajo del número de acciones de las mismas que están vigentes) cada cierto tiempo por una acción semejante de la Junta Directiva;

(ii) la tasa anual de dividendos a pagar sobre las acciones de tal serie, las condiciones sobre las cuales se pagarán tales dividendos y le fecha a partir de la cual los dividendos serán acumulativos en el evento que la Junta Directiva determine que los dividendos serán acumulativos;

(iii) si la serie tendrá o no derechos de voto, además de los derechos de voto provistos por la ley, y de ser así, los términos de tales derechos de voto;

(iv) si tal serie tendrá o no privilegios de conversión y, de ser así, los términos y condiciones de tal conversión, incluyendo, pero sin estar limitado a, la condición para ajuste de la tasa de conversión en tales eventos y de tal forma como la Junta Directiva lo determine;

(v) si las acciones de tal serie serán o no redimibles y, de ser así, los términos y condiciones de tal redención, incluyendo la fecha o fechas en las cuales o después de las cuales pueden ser redimibles, y la cantidad a pagar por acción en caso de redención, cantidad que podrá variar bajo diferentes condiciones y en diferentes fechas de redención;

(vi) si tal serie tendrá o no un fondo de inversión para redención o compra de acciones de esa serie y, de ser así, los términos y la cantidad de tal fondo de inversión;

(vii) los derechos de las acciones de tal serien caso de una liquidación, disolución o cierre voluntaria o involuntaria de la Corporación, y

Notaría ... Consulado ... fotocopia que consta de ... folio(s) útil(es) ... 06 MAYO 2011 ... NOTARIO(A) CUARENTA Y UNO ... Adolfo Fernando Mora S.

los derechos relativos de prioridad, de haber, de pago de acciones de esa serie; y

(viii) cualquier otro derecho relativo, preferencia y limitación de tal serie.

ARTICULO 5

SECCION 5.01. *Enmiendas a los estatutos por los Directores.* (a) En adición y no limitando los poderes conferidos por estatutos, la Junta Directiva esta expresamente autorizada para hacer, alterar, enmendar, rechazar y rescindir los estatutos de la Corporación, sujetos a las secciones 5.01(b) y 5.01(c) a continuación.

(b) Las secciones 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.04, 3.05, 3.14 y 5.06 de los estatutos solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 60% de las acciones con derecho a votar las mismas.

(c) Las secciones 3.03(c) y 3.15 de los estatutos solo pueden ser alteradas, enmendadas, repelidas, o rescindidas por le voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 90% de las acciones con derecho a votar las mismas.

SECCION 5.02. *Enmienda del Certificado de Incorporación.* La sección 5.01 (b) de este Certificado de Incorporación solo puede ser alterada, enmendada, repelida, o rescindida por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a voto sobre la misma que representen a más del 60% de las acciones con derecho a votar la misma. La sección 5.01(c) y los Artículos 8 y 9 de este Certificado de Incorporación solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar la misma que representen más del 90% de las acciones con derecho a votar la misma.

ARTICULO 6

SECCION 6.01. *Elección del Directorio por los Accionistas de Acción Preferencial.* Durante cualquier periodo cuando los accionistas de cualquier

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
06 MAYO 2011
NOTARIO CUARENTA (E)
Bogotá, D.C., Colombia
Norby Fernando Mora S.

acción preferencial cualquiera de una o más series de las mismas, que voten como una clase, tengan derecho a elegir un número específico de directores, por razón a atrasos en los dividendos u otras condiciones que les dan el derecho a hacerlo, entonces y durante el tiempo que continúe el derecho (i) el número de directores autorizado de otro modo será incrementado por tal número de directores especificado, y los accionistas de tales Acciones Preferenciales o tales series de las mismas, que votan como una clase, tendrán derecho a elegir los directores adicionales para lo que se provee, de acuerdo con las condiciones de tales Acciones Preferenciales o series; (ii) cada uno de tales directores adicionales servirá durante tal termino, y tendrá tales poderes de voto, como se han de otorgar en las provisiones pertinentes a tales Acciones Preferenciales o series; y (iii) siempre que los accionistas de cualquiera de tales Acciones Preferenciales o series de las mismas están desprovistos de tales derechos a elegir un número especifico de directores, votando como clase, de acuerdo con las condiciones de tales Acciones preferenciales o series, los términos de oficio de todos los directores elegidos por los accionistas de tales Acciones preferenciales o series, que votan como clase, de acuerdo con las condiciones o elegidos para llenar cualquier vacante resultante de la muerte, renuncia o remoción de directores así elegidos por los accionistas de tales Acciones Preferenciales o series, terminarán en adelante y el número autorizado de directores será reducido en concordancia.

SECCION 6.02. *Votaciones.* Las elecciones de directores en una reunión anual o especial de accionistas necesaria no serán por votos escritos a menos que los estatutos de la Corporación digan lo contrario.

SECCION 6.03. *Eliminación de cierta responsabilidad personal de los directores.* (a) Un director de la Corporación no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por daños monetarios por violación del deber fiduciario como director hasta donde lo permita la Ley de Delaware.

Notaría Cuarenta de Bogotá D.C.
Consejo la presente fotocopia que consta de ( ) folio(s) útil(es) es fiel y auténtica del original que he tenido a la vista.
06 MAYO 20
NOTARIO CUARENTA (E)
Bogotá, D.C. - Colombia
Norby Fernando Mo

(b) Cada persona (y sus herederos, ejecutores o administradores de dicha persona) quien fue o es una parte o esta amenazado de ser parte de, o está involucrado en cualquier acción, demanda o proceso amenazado, pendiente o completado, ya sea civil, criminal, administrativo o investigativo, por razón del hecho de que esa persona es o fue un director de la Corporación o es o estaba sirviendo por solicitud de la Corporación como un director de otra corporación, sociedad, sociedad de riesgo compartido, fideicomiso u otra empresa, será indemnizado y completamente protegido por la Corporación hasta donde lo

permita la Ley de Delaware. El derecho a la indemnización concedido en esta sección 6.03 también debe incluir el derecho a que la Corporación le pague los gastos incurridos en conexión cuna cualquiera de tales procesos por adelantado de su decisión final hasta donde los autoriza la Ley de Delaware. El derecho a indemnización conferido en esta sección 6.03 será un derecho contractual.

(c) La Corporación puede, por acción de su Junta Directiva, proporcionar indemnización a tales funcionarios, empleados y agentes de la Corporación hasta tal punto y a tal efecto como lo determine apropiado la Junta Directiva y lo autorice la Ley de Delaware.

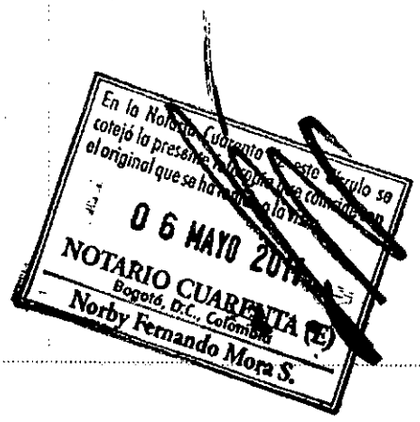
(d) La Corporación tendrá el poder de comprar y mantener un seguro a nombre de cualquier persona quien es o fue director, funcionario, empleado o agente de la corporación, o esta o estuvo en servicio por pedido de la Corporación como director, funcionario, empleado o agente de otra corporación, sociedad, sociedad de riesgo compartido, fideicomiso u otra empresa contra cualquier gasto, responsabilidad o pérdida incurrida por tal persona en cualquier capacidad o que surge de su estado como tal, ya sea si la Corporación tiene o no el poder de indemnizarlo contra tal responsabilidad bajo la ley de Delaware.

(e) Los derechos y autoridad conferidos en esta Sección 6.03 no serán exclusivos de ningún otro derecho el cual cualquier otra persona pueda tener o adquirir de aquí en adelante.

(f) Ni la alteración, enmienda, rechazo o rescisión de esta Sección 6.03, ni la adopción de ninguna condición de este Certificado de Incorporación o de los Estatutos de la Corporación, ni, hasta donde lo permite la Ley de Delaware, ninguna modificación de la ley, debe eliminar o reducir el efecto de esta Sección 6.03 respecto a ninguno de los actos u omisiones que ocurran antes de tal alteración, enmienda, rechazo, rescisión, adopción o modificación.

ARTICULO 7

SECCION 7.01, *Sección 203 de la Ley de Delaware.* Por la presente la Corporación elige no ser gobernada por la Sección 203 de la Ley de Delaware.



ARTICULO 8

SECCION 8.01. *Relación con Roche.* Anticipándose a que la Corporación cese de ser un subsidiaria completamente de propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se define en la sección 8.05) permanezca siendo un accionista de la Corporación, y anticipándose a que la Corporación (como se define en la Sección 8.05) y Roche puede entrar en actividades o líneas de negocios semejantes o similares y tener un interés en las mismas áreas de oportunidades corporativas, y en reconocimiento de (i) los beneficios a ser derivados por la Corporación a través de sus relaciones contractuales, corporativas y de negocios con Roche (incluyendo el servicio de funcionarios y directores de Roche como directores de la Corporación) y (ii) las dificultades concomitantes a cualquier director, quien desea y se propone satisfacer completamente tales deberes fiduciarios del director, al determinar el alcance completo de tales deberes en cualquier situación particular, las condiciones de este artículos 8 se establecen para regular, definir y guiar la conducta de ciertas cuestiones de la Corporación ya que pueden involucrar a Roche y sus funcionaros y directores, y los poderes, derechos, deberes y responsabilidades de la Corporación y sus funcionarios, directores y accionistas en conexión con éste.

SECCION 8.02. *Actividades en Negocios Similares.* Excepto que Roche Holdings, Inc. pueda de otra forma acordarlo por escrito,

(a) Roche no tendrá el deber de abstenerse de entrar directamente o indirectamente en actividades de negocios o líneas de negocios semejantes o similares a las de la Corporación, y

(b) ni Roche ni ninguno de sus funcionarios o director de la misma será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar cualquier deber fiduciario por razón de alguna de tales actividades de Roche o de la participación de tal persona en las mismas.

En la Notaría Cuarenta de esta ciudad se hizo constar que la presente fotocopia es fiel y exacta del original que se ha tenido a la vista
06 MAYO 20
NOTARIO CUARENTA (E)
Bogotá, D.C.
Norby Fernando Mo

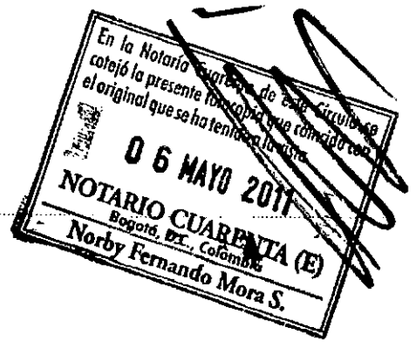
En el evento que Roche adquiera conocimientos de una transacción en materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa tanto para Roche como para la Corporación, Roche no tendrá el deber de comunicar u ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación y no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario como accionista de la Corporación o la persona que controla a un accionista por razón del hacho

que Roche prosigue o adquiere tal oportunidad corporativa para sí misma, dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o entidad, o no comunica información respecto, u ofrece, tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCION 8.03. *Oportunidades Corporativas.* En el evento que un director, funcionario o empleado de la Corporación quien también es director, funcionario o empleado de Roche adquiera conocimiento de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa para la Corporación y Roche (ya se si esta transacción o materia potencial es propuesta por un tercero o es concebida por tal director, funcionario o empleado de la Corporación o no), tal director, funcionario o empleado debe tener el derecho a ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación o Roche como tal director, funcionario o empleado los considere apropiado bajo las circunstancias de su discreción, y tal director, funcionario o empleado no será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario o deber de lealtad o faltar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de ningún beneficio personal inapropiado por razón del hecho que (i) tal director, funcionario o empleado ofreció tal oportunidad corporativa a Roche (en lugar de a la Corporación) o no comunicó información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación o (ii) Roche busca o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma o dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o no comunica información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCION 8.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo adquiera algún interés en cualquiera de las acciones de capital de la Corporación ha tenido noticia o ha estado de acuerdo con las condiciones de este Artículo 8.

SECCION 8.05. *Definiciones.* Para propósitos de este Artículo 8 y el Artículo 9 solamente, (i) el término ***"Corporación"*** debe significar la Corporación y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido y otras entidades en las cuales la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poder de voto o intereses de voto similares, y (ii) el término ***"Roche"*** debe significar Roche Holdings, Inc y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido, asociaciones y otras entidades (diferentes a la Corporación, definida de acuerdo con la cláusula (i) de esta sección 8.05) que son ***"afiliados"*** (como se



define en la Regla 12b-2 bajo el Acta de Intercambio de Valores de 1934, como se enmendó) de Roche Holdings, Inc.

SECCION 8.06, *Finalización: Efecto Obligante.* Son consideración con nada en este Certificado de Incorporación que lo contradiga, las condiciones anteriores de este Artículo 8 deberán expirar en la fecha que Roche cese de poseer con beneficios Acciones Comunes que representen al menos 5% del número de acciones vigentes de las Acciones Comunes de la Corporación y nadie que se director o funcionario de la Corporación sea también director o funcionario de Roche. Ni tal vencimiento, ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 8 así como tampoco ninguna condición de este Certificado de Incorporación Enmendado y Vuelto a Redactar inconsistente con alguna de las condiciones de este Artículo 8 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 8 respecto a cualquier materia, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, excepto por este Artículo 8, pueda acaecer o surgir, antes de tal vencimiento, alteración, enmienda o adopción.

SECCION 8.07. *Artículo 9.* Las condiciones de este Artículo son adicionales a las condiciones del Artículo 9.

ARTICULO 9

SECCION 9.01. *Contratos no nulos.* Ningún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización de los mismos) entre la Corporación y Roche será nulo u anulable solamente por razón de que Roche es parte del mismo, o solamente porque cualquiera de los directores o funcionarios de la Corporación quienes están afiliados a Roche están presentes en o participan en la reunión de la Junta Directiva o comité de la misma que autoriza el contrato, acuerdo, arreglo, transacción, enmienda, modificación o finalización o solamente porque su o sus votos se cuentan para tal propósito, pero cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo) estará gobernado por las condiciones de este Cerificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, los Estatutos de la Corporación, la Ley de Delaware y otras leyes aplicables. Para propósitos de este Artículo 9, los términos "***Corporación***" y "***Roche***" tienen los significados establecidos en la Sección 8.05.

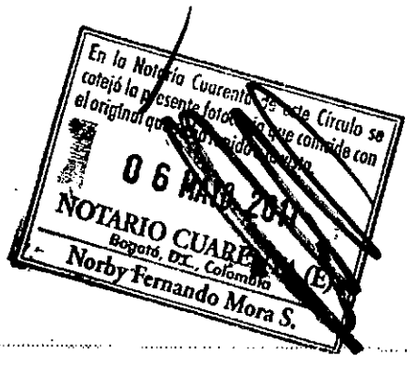
En la Notaría Cuarenta de [illegible] Círculo [illegible] cotejó la presente fotocopia que [illegible] con el original que se ha tenido a la vista.
06 MAYO 20[illegible]
NOTARIO CUARENTA (E)
Bogotá, D.C. Colombia
Norby Fernando Mo[illegible]

SECCION 9.02. *Quórum.* Los Directores de la Corporación que son también directores o funcionarios de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de la Junta Directiva o de un comité que autoriza o aprueba cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo). Las acciones vigentes de las Acciones Comunes de propiedad de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de accionistas que autorice o apruebe tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo).

SECCION 9.03. *No responsabilidad por acciones de buena fe.* Ni Roche ni ningún funcionario o director de la misma será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar cualquiera de los deberes fiduciarios o deberes de lealtad o por fallar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o por derivación de cualquier beneficio personal por razón del hecho que Roche o un funcionario o director de la misma de buena fe tome cualquier acción o ejerza cualquier derecho o de o retenga cualquier consentimiento en conexión con cualquier acuerdo o contrato entre Roche y la Corporación. Ningún voto dado u otra acción tomada por cualquier persona que es un funcionario, director o representante de Roche, donde el voto o acción es tomado por tal persona en su capacidad como director de esta Corporación, constituirá una acción de o el ejercicio de un derecho o un consentimiento de Roche para los propósitos de cualquiera de tal acuerdo o contrato.

SECCION 9.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo adquiera algún interés en cualquiera de las acciones de capital de la Corporación ha tenido noticia o ha estado de acuerdo con las condiciones de este Artículo 9.

SECCION 9.05. *Contratos cubiertos.* Para propósitos de este Artículo 9, cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación o cualquier corporación, sociedad, sociedad de riesgo conjunto, asociación u otra entidad en la cual la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) el cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poderes de voto o intereses de voto similares vigentes se considerará un contrato, acuerdo o transacción con la Corporación.

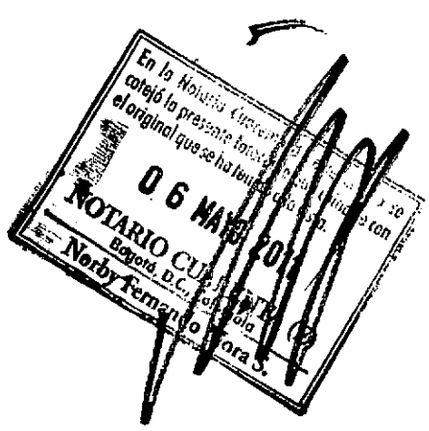


SECCION 9.06. *Efecto obligante.* Ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 9 ni la adopción de alguna condición inconsistente con cualquier condición de este Artículo 9 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 9 respecto a cualquier materia que ocurra, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, a no ser por este Artículo 9, pueda acaecer o surgir, antes de tal alteración, enmienda, cambio, rechazo o adopción.

SECCION 9.07. *Artículo 8.* Las condiciones de este Artículo 9 son adicionales a las condiciones del Artículo 8.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, este Certificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, el cual ha sido adoptado de acuerdo con las secciones 242 y 245 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware y por consentimiento escrito de el único accionista de la Corporación de acuerdo con la sección 228 de Ley General de Corporación del Estado de Delaware, ha sido ejecutado este 22 de Julio de 1999.

GENENTECH, INC.
Por: /s/ Stephen G. Juelsgaard
Nombre: Stephen G. Juelsgaard
Título: Vicepresidente
Consejo General y Secretaría



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

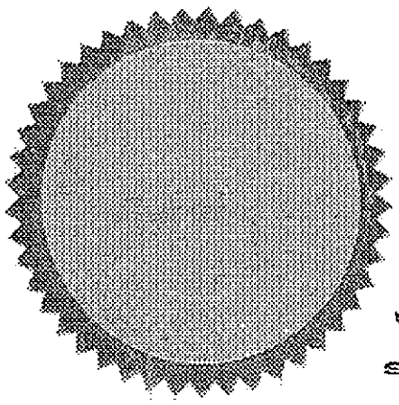
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254031

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE FIFTEENTH DAY OF MAY, A.D. 2000, AT 5 O'CLOCK P.M.

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

2112549

050426506

AUTHENTICATION: 3900385

DATE: 05-24-05

En la Notaría Cuarenta de [illegible] cotejó la presente fotocopia con el original que se ha tenido a la vista.

06 MAYO 2005

NOTARIO CUARENTA (E)

Bogotá, D.C., Colombia

Norby Fernando M[illegible] S.

CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

> "Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is seven hundred million (700,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("Preferred Stock"). Six hundred million (600,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 15th day of May, 2000.

GENENTECH, INC.

By: Stephen Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel
and Secretary

75841

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia con el original que se ha tenido a la vista
06 MAYO 2011
NOTARIO CUARENTA (E)
Bogotá, D.C., Colombia
Norby Fernando Mora S.

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Incorporación de Genentech, Inc.

APOSTILLA

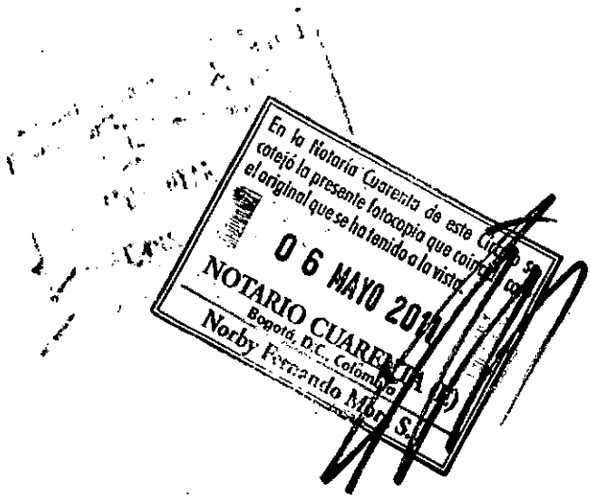
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
   Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254031
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMOQUINTO DIA DE MAYO, A. D. 2000, A LAS 5 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900385

FECHA: 05 – 24 – 05

CERTIFICADO DE ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmiende cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

> SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de setecientos millones (700,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de $0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Seiscientos millones (600,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de $0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario de acciones requerido por los estatutos votaron a favor de la enmienda.

En la Notaría Cuarenta (40) del Círculo se coteja la presente fotocopia con el documento original que se ha tenido a la vista. Bogotá, D.C. 06 MAYO 2011
NOTARIO CUARENTA (E)
Norby Fernando Mora S.

TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 15 de Mayo de 2000.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)
Nombre: Stephen G. Juelsgaard
Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



280

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

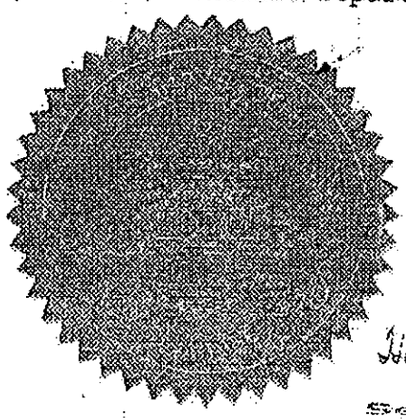
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254033

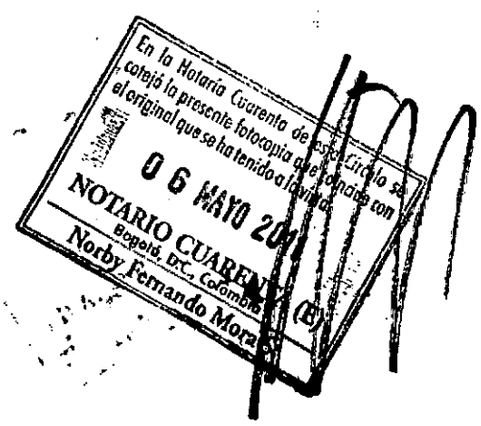
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE SIXTEENTH DAY OF APRIL, A.D. 2004, AT 7:39 O'CLOCK P.M.

2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 3900387

DATE: 05-24-05

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia con el original que se ha tenido a la vista.

06 MAYO 2011

NOTARIO CUARENTA (E)

Bogotá, D.C., Colombia

Norby Fernando Mora S.

State of Delaware
Secretary of State
Division of Corporations
Delivered 07:44 PM 04/16/2004
FILED 07:39 PM 04/16/2004
SRV 040281669 - 2112549 FILE

CERTIFICATE OF THIRD AMENDMENT OF AMENDED AND RESTATED CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc., a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware,

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

> Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is three billion one hundred million (3,100,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("Preferred Stock"). Three billion (3,000,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("Common Stock"). The common stock of the Corporation shall be all of one class.

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Third Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 16th day of April, 2004.

GENENTECH, INC.

By: _____

Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Executive Vice President, General Counsel and Secretary

#163087

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que corresponde al original que se ha tenido a la vista.
06 MAYO 2004
NOTARIO CUARENTA (E)
Bogotá, D.C., Colombia
Norby Fernando Mora

TRÁDUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Enmienda de Genentech, Inc.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
   Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254033
9. Sello/timbre
10. Firma

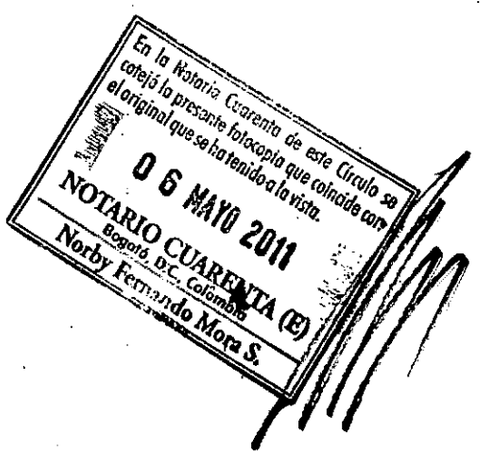
Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMOSEXTO DIA DE ABRIL, A. D. 2004, A LAS 7:39 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor: Secretaria de Estado

CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware,

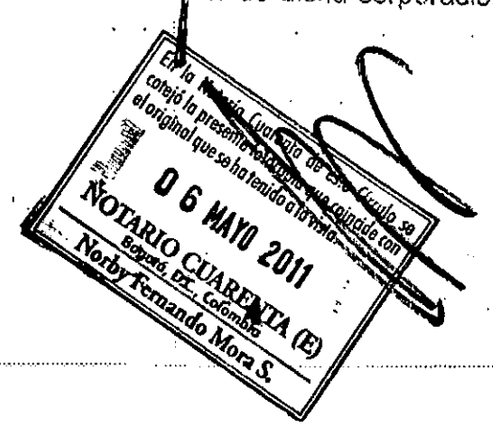
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmiende cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

> SECCION 4.01. *Acciones de Capital*. (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de tres mil cien millones (3,100,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de $0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Tres mil millones (3,000,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de $0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente



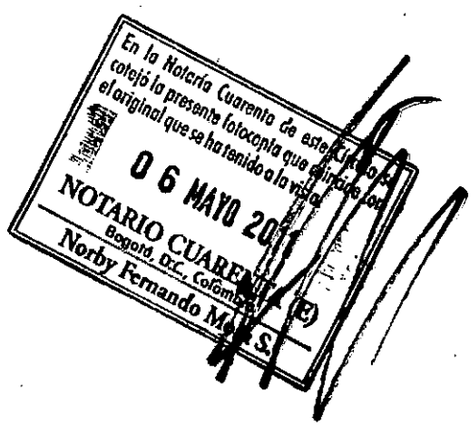
TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 16 de Abril de 2004.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)
Nombre: Stephen G. Juelsgaard
Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

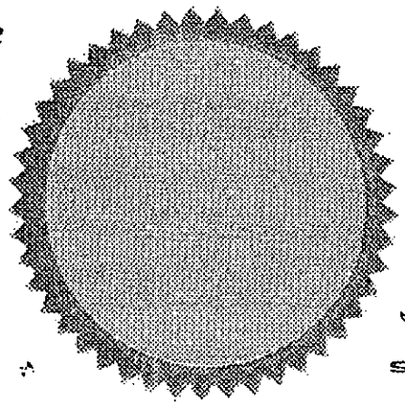
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254032

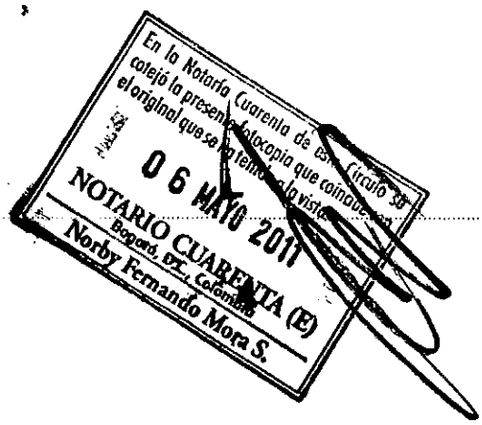
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TENTH DAY OF MAY, A.D. 2001, AT 2:05 O'CLOCK P.M.

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que consta de ___ folio(s) con el original que se ha tenido a la vista. Se expide en Bogotá, D.C., Colombia, hoy 06 MAYO 2005
NOTARIO CUARENTA (E)
Norby Fernando Mora

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

2112549

050426506

AUTHENTICATION: 3900386

DATE: 05-24-05

FILED 01:00 PM 05/10/2001
P ///010226228//F/ZZZZ849////
BY Sandy Miller

CERTIFICATE OF AMENDMENT OF AMENDED AND RESTATED CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

> "Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is one billion three hundred million (1,300,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("Preferred Stock"). One billion two hundred million (1,200,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 10th day of May, 2001.

GENENTECH, INC.

By: _____

Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Senior Vice President, General Counsel and Secretary

86747

En lo Notaría ... cotejó la presente fotocopia con el original que se ha tenido a la vista.

0 6 MAYO 2011

NOTARIO CUARENTA (E)

Bogotá, D.C. Colombia

Norby Fernando Mora S.

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Enmienda de Genentech, Inc.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
   Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254032
9. Sello/timbre
10. Firma

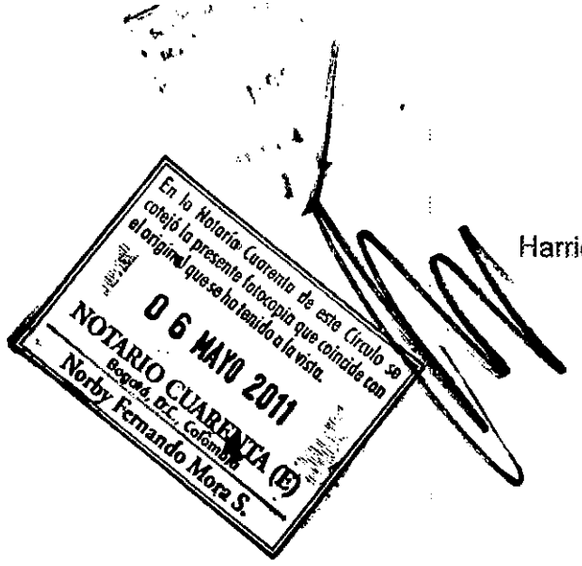
Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMO DIA DE MAYO, A. D. 2001, A LAS 2:05 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900386

FECHA: 05 – 24 – 05

CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

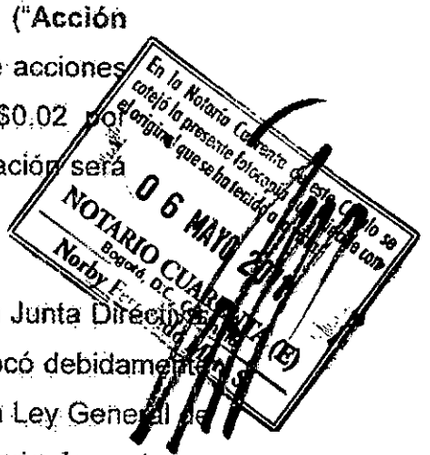
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmiende cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

> SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de mil trescientos millones (1,300,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de $0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Mil doscientos millones (1,200,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de $0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario de acciones requerido por los estatutos votaron a favor de la enmienda.



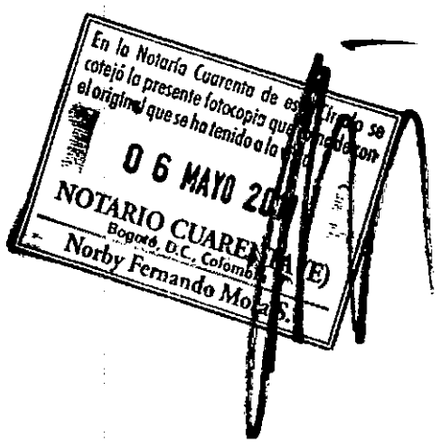
TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 10 de Mayo de 2001.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)
Nombre: Stephen G. Juelsgaard
Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-064204- -00000-0000

Fecha: 2011-05-24 17:06:51 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 286

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☒ **MODELO DE UTILIDAD PCT** ☐ **Art.33 Decisión 486/00, Circular Única**

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ **(Art. 119 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ **(Art. 92 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Prosperidad para todos

Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO
Apoderado(a) y/o Representante de
GENENTECH, INC.

REFERENCIA		
	Radicación No.	11 064204
	Solicitud internacional	PCT/US2009/067104
	Fecha inicio fase nacional	09/06/2011
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	13627

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se consideraró abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (C)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 02 SET 2011.
adpa11